

Aus dem Institut für  
Chirurgische Forschung  
der Ludwig – Maximilians – Universität München  
Komm. Vorstand:  
Prof. Dr. med. U. Pohl

**Experimentelle Untersuchung des in der Herzchirurgie verwendeten,  
bovinen NO – REACT Perikardpatches im Zusammenhang mit  
postoperativ beobachteten Spätkomplikationen.**

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

Vorgelegt von  
Christoph Eimer  
Neuss

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. C. Hammer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. Däbritz  
Priv. Doz. Dr. C. Kupatt  
Priv. Doz. Dr. A. Schober

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. E. Thein

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2007

## VORWORT

Bei der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation wurde mir von vielen Seiten Hilfe zuteil, für die ich an dieser Stelle meinen Dank abstatte.

Für die Überlassung des Themas samt der klinischen Daten sei Herrn Prof. Dr. med. Christian Weinhold herzlich gedankt.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Claus Hammer für seinen permanenten Rat bei im Rahmen der Arbeit angefallenen Problemstellungen und Fragen.

Sehr dankbar bin ich weiterhin Frau Alke Schropp für ihre tatkräftige Hilfe bei der Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Präparate sowie Herrn Dr. Peters für seine Ratschläge bei den statistischen Auswertungen der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt schließlich Herrn Dr. med. vet. Eckart Thein, der mir bei der Strukturierung und beim Verfassen der Doktorarbeit stets eine führende Hand war, ebenso wie Frau Anne – Marie Allmeling für ihre ständige Hilfsbereitschaft und äußerst sympathische Unterstützung im Labor und in persönlichen Fragen.

Neuss, im September 2005

Christoph Eimer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	9
<b>1.1 Das Perikard</b>	9
1.1.1 Aufbau des humanen Perikards	9
1.1.2 Aufbau des bovinen Perikards	10
1.1.3 Funktionen des Perikards	11
<b>1.2 Der Perikardersatz (= Patch)</b>	11
1.2.1 Indikationen und Vorteile der Patchverwendung	11
1.2.2 Material	13
1.2.3 Das Präparationsverfahren	14
1.2.4 Xenogenes Transplantationsgewebe und Ziele einer notwendigen Vorbehandlung	14
1.2.5 Zweifel an der Vorbehandlung	15
<b>1.3 Abstoßung</b>	16
1.3.1 Die xenogene Abstoßung	16
1.3.1.1 Pathogenese	16
1.3.1.2 Bedeutung xenoreaktiver Antikörper	17
1.3.1.3 Bedeutung des Komplementsystems	18
1.3.1.4 Weitere diskutierte Abstoßungsvorgänge	19
<b>1.4 Die Fremdkörperreaktion</b>	20
1.4.1 Allgemeines	20
1.4.2 Pathogenese	21
1.4.3 Histologie	21
<b>1.5 Zytokine</b>	21
1.5.1 Zytokineigenschaften	21
1.5.2 Zytokinwirkungen	22
1.5.3 Proinflammatorische Zytokine: Interleukin – 6 (IL - 6) und Tumor – Nekrose – Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	23
1.5.3.1 IL - 6	23
1.5.3.2 TNF $\alpha$	24
<b>2. THEMATIK</b>	25
<b>2.1 Das No – React - Patch</b>	25
2.1.1 Allgemeine Herstellung und Eigenschaften	25
2.1.2 Die Detoxifikationsmethode und ihre Vorteile	25
2.1.3 Weitere experimentelle Erfahrungen mit No – React Produkten	27
2.1.4 Koblenzer Untersuchungen: Komplikationen nach Implantation von No – React Produkten in Deutschland	30

<b>2.2 Mögliche Ätiologien der Komplikationen</b>	36
2.2.1 Toxische Reaktion auf Fremdkörper	36
2.2.2 Bakterielle Infektion	37
2.2.3 Xenogene Abstoßungsreaktion	37
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	38
<b>3.1 Versuchsaufbau</b>	38
3.1.1 Gewinnung von humanem Serum und mononukleärem Zellkonzentrat (MNK)	38
3.1.2 Blutausstriche	39
3.1.3 Vitalitätsbestimmung	39
3.1.4 Patchmaterial	39
3.1.5 Präparation der Patches	40
3.1.6 Seruminaktivierung	40
3.1.7 Versuchsansätze	40
3.1.7.1 Kulturmedien	41
3.1.7.2 Verteilung des MNK und der Patches (Teilansätze)	41
<b>3.2 Versuchsdurchführung</b>	43
3.2.1 Inkubation und zeitlicher Versuchsverlauf	43
3.2.2 Aufbereitung der Proben	43
3.2.3 Vorbereitung der Patches für die Histologie	44
3.2.4 Histologie	44
3.2.5 Immunhistochemie	44
3.2.6 Zytokinbestimmung (ELISA)	46
<b>3.3 Statistik</b>	46
<b>4. ERGEBNISSE</b>	47
<b>4.1 IL – 6 - Bestimmung</b>	47
4.1.1 Versuchstag 1	47
4.1.2 Versuchstag 3	49
4.1.3 Versuchstag 5	50
4.1.4 Signifikanzen	52
<b>4.2 TNF <math>\alpha</math> - Bestimmung</b>	53
4.2.1 Versuchstag 1	53
4.2.2 Versuchstag 3	54
4.2.3 Versuchstag 5	56
4.2.4 Signifikanzen	57

<b>4.3 Zytokinerggebnisse im Zeitverlauf</b>	58
4.3.1 IL - 6	58
4.3.1.1 RPMI 5%	58
4.3.1.2 Normalserum	59
4.3.1.3 Inaktives Serum	60
4.3.2 TNF $\alpha$	61
4.3.2.1 RPMI 5%	61
4.3.2.2 Normalserum	62
4.3.2.3 Inaktives Serum	63
<b>4.4 Standardabweichung des Medians</b>	63
<b>4.5 Negativkontrollen</b>	64
<b>4.6 Histologie/ Immunhistochemie</b>	64
4.6.1 Nativpräparate	64
4.6.2 Immunhistochemische Färbungen	65
4.6.3 MAC - Färbung	66
4.6.3.1 In RPMI 5% gelagerte Patches	66
4.6.3.2 In Normalserum gelagerte Patches	67
4.6.3.3 In inaktivem Serum gelagerte Patches	68
4.6.4 C3c - Färbung	69
4.6.4.1 In RPMI 5% gelagerte Patches	69
4.6.4.2 In Normalserum gelagerte Patches	71
4.6.4.3 In inaktivem Serum gelagerte Patches	72
4.6.5 Ig - Färbung	73
4.6.5.1 In RPMI 5% gelagerte Patches	73
4.6.5.2 In Normalserum gelagerte Patches	74
4.6.5.3 In inaktivem Serum gelagerte Patches	76
<b>5. DISKUSSION</b>	77
<b>5.1 Versuche</b>	77
5.1.1 Probandenauswahl	77
5.1.2 Gewinnung von Serum und MNK	77
5.1.3 Patches	78
5.1.4 Kulturmedien	79
5.1.4.1 RPMI 5%	79
5.1.4.2 Normales (unverändertes) Serum	79
5.1.4.3 Inaktives (Komplement – defizientes) Serum	79

5.1.4.4 Kontrollgruppen	80
5.1.5 Versuchszeitraum	80
5.1.6 Zytokinauswahl	81
<b>5.2 Mögliche Ursachen der Spät komplikationen</b>	<b>81</b>
5.2.1 Fremdkörperreaktion	81
5.2.2 Bakterielle Infektion	82
5.2.3 Xenogene Abstoßung	84
<b>5.3 Ergebnisse</b>	<b>84</b>
5.3.1 IL – 6	84
5.3.2 TNF $\alpha$	87
5.3.3 Standardabweichungen	89
5.3.4 Histologie/ Immunhistochemie	92
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>94</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>98</b>
<b>8. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN, TABELLEN UND BILDER</b>	<b>112</b>





# „Experimentelle Untersuchung des in der Herzchirurgie verwendeten, bovinen NO – REACT Perikardpatches im Zusammenhang mit postoperativ beobachteten Spätkomplikationen“

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 *Das Perikard:*

#### 1.1.1 Aufbau des humanen Perikards:

Das menschliche Perikardgewebe setzt sich aus einem Netzwerk kollagener Fasern zusammen, die von im Gewebe ansässigen Fibroblasten gebildet werden. Dabei handelt es sich um fibrilläres Protein, das vor allem aus Monoaminosäuren besteht und enzymatisch kaum zerlegt werden kann. Die von den Fibroblasten sezernierten Proteinmoleküle lagern sich extrazellulär als unverzweigte Fibrillen von 0,2 – 0,5 µm Durchmesser zusammen und werden durch eine mucopolysaccharidhaltige Kittsubstanz derart miteinander verknüpft, dass sich daraus die von Sehnen und Bändern bekannte, zähe und stabile Konsistenz ergibt [1]. Des Weiteren findet man bei der histologischen Betrachtung des Perikards wie fast überall im Körper Blutgefäße. Sie bestehen je nach Kalibergröße aus verschiedenen Wandschichten und dem Endothel, das die Grenze zwischen intra – und extraluminal darstellt. Neben der Transportfunktion für die das umliegende, vitale Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgenden und ebenso dem Abtransport von Stoffwechselendprodukten dienenden Blutzellen sind die Blutgefäße ferner unentbehrlich als „Verkehrsweg“ für eine Vielzahl von Zellen, die über den Blutweg ins Interstitium gelangen und sich dort ansiedeln. Zu diesen Zellen, die man permanent im kollagenen Gewebe nachweisen kann, gehören beispielsweise phagozytierende Histozyten [2].

In ihrer Gesamtheit und speziellen Anordnung bilden die Kollagenfasern den Herzbeutel. Diese Fasern vom Kollagentyp II überkreuzen sich mehrmals in verschiedenen Schichten, sodass der Herzbeutel als straffer Bindegewebesack wichtige Funktionen für das Herz übernimmt. Er setzt sich aus zwei verschiedenen Gewebeblättern zusammen: das innere Blatt liegt dem Herzen von außen auf und wird folgerichtig als Epikard bzw. wegen seiner direkten Beziehung zum Organ Herz auch als viszerales Blatt bezeichnet. Das äußere, parietale Blatt erhält seinen Namen durch seine wandständige Lage zum Mediastinum hin [2, 3]. Sowohl Epikard als auch

parietales Blatt werden von einer serösen Haut ausgekleidet, der sogenannten Serosa. Diese wiederum beinhaltet ein einschichtiges, niedrigprismatisches Epithel, welches auch als Mesothel bezeichnet wird. Die Mesothelschicht der Serosa beider Blätter produziert eine bernsteinfarbene Flüssigkeit, die zwischen beide Perikardblätter sezerniert wird, und deren Volumen insgesamt 20 bis 50 ml beträgt.

#### 1.1.2 Aufbau des bovinen Perikards:

Ebenso wie der menschliche Herzbeutel beherbergt der Herzbeutel des Rindes in seiner Höhle, Cavum pericardii, das Herz sowie die Ursprungs – und Mündungsabschnitte der Aorta, des Truncus pulmonalis, der Venae cavae und der Venae pulmonales. Seine Form entspricht der Gestalt, seine Weite den funktionsbedingten Volumenänderungen des Herzens. In vivo und auch postmortal schmiegt sich der Herzbeutel, der innen wie beim Menschen von einer kapillaren Schicht seröser Flüssigkeit benetzt ist, dem Herzen an.

Unter Einbeziehung seines Pleuraüberzuges besteht der Herzbeutel aus drei Schichten: der Pleura pericardiaca, dem Pericardium fibrosum und aus der Lamina parietalis des Pericardium serosum. Die Pleura pericardiaca ist durch lockeres Bindegewebe, in das auch wechselnde Mengen Fettgewebe eingelagert sein können, leicht abziehbar mit dem Pericardium fibrosum verbunden. Dieses wiederum setzt sich aus mehreren Lagen kollagener Fasern unterschiedlicher Verlaufsrichtung zusammen. Die scherengitterartige Anordnung der durch elastische Elemente ergänzten Fasern des Pericardium fibrosum gibt dem Herzbeutel die Fähigkeit, sich den durch die Mechanik der Herzarbeit entstehenden Anforderungen anzupassen.

Die innere Schicht des Herzbeutels, die Lamina parietalis des Pericardium serosum, besteht aus einer reich vaskularisierten und innervierten, elastische Fasern enthaltenden Bindegewebslage sowie einem einschichtigen Mesothel. Ebenfalls wie beim Menschen gilt diese Schicht als Quelle der im Cavum pericardii befindlichen Herzbeutel­flüssigkeit. Auch beim Tier können entzündliche Exsudate zusammen mit einer entzündlich bedingten verminderten Resorption des Exsudates sowie Einblutungen zwischen Herz und zugehörigem Beutel aufgrund der geringen Dehnbarkeit des Perikards zur Tamponade und damit je nach Ausprägung zu geringen bis letalen Einschränkungen der Herzfunktion führen [4, 5, 6].

Im Vergleich der Beschaffenheit von menschlichem und Rinderherzbeutel lässt sich histologisch feststellen, dass der Rinderherzbeutel vorwiegend aus Kollagen Typ I

besteht, während sich das menschliche Perikard hauptsächlich aus Kollagen vom Typ II zusammensetzt.

Ein weiterer Unterschied besteht in der die Spezies letztendlich unterscheidenden Diversität des molekularen Aufbaus der Gewebe, die sich zum einen abhängig von der stammesgeschichtlichen Verwandtschaft in der wenn auch häufig nur geringen Differenz von Aminosäuresequenzen und zum anderen in der molekularen Modifikation der beteiligten Proteine mit verschiedenen Zuckermolekülen niederschlägt [7]. Dieser molekulare Unterschied ist für die zahlreichen Abstoßungsprobleme in allen ihren Variationen im großen Feld der Xenotransplantation verantwortlich [8].

### 1.1.3 Funktionen des Perikards:

Das von der Mesothelschicht produzierte Sekret fungiert als Gleitsubstanz und gewährleistet so eine Verminderung der Reibung, die regelmäßig bei Kontraktion und Erschlaffung des Herzmuskels durch Scherkräfte der sich konträr bewegenden Gewebe entsteht. Sie tritt auf zum einen zwischen parietalem und viszeralem Perikardblatt und zum anderen zwischen Herz und den Strukturen, die dem Herz anliegen wie Pleura, Mediastinum und Diaphragma [3].

Ferner hält das Perikard das Herz in seiner anatomisch ursprünglichen Lage und hemmt dessen muskuläre Überdehnung, wodurch die Kontraktilität des Herzens und dadurch seine mechanische Herzleistung gemäß dem Frank-Starling-Mechanismus in seiner Effizienz optimiert wird. Dieser ökonomisierende Mechanismus kommt vor allem unter Belastungszuständen zum Tragen [9].

Weiterhin dient der Herzbeutel als wichtige Barriere zu umliegenden Geweben dem Schutz des Herzens vor Infektionen oder Entzündungen per continuitatem, die von Lunge und Mediastinum sonst auf das Herz übergreifen könnten [3].

## 1.2 Der Perikardersatz (= Patch)

### 1.2.1 Indikationen und Vorteile der Patchverwendung:

Nach Herzoperationen oder Operationen an herznahen Gefäßen, die eine chirurgische Eröffnung des Herzbeutels bedingen, wird das Perikard nicht wieder an der ursprünglichen Inzisionsstelle durch eine Naht verschlossen. Die Ursache hierfür liegt darin begründet, dass das Herz infolge jeglicher Manipulationen im Operationsgebiet postoperativ ödematös anschwellen und dadurch an Größe zunehmen kann. Ein Perikardverschluss an der primären Eröffnungsstelle würde dementsprechend zu einer

signifikanten Spannungssteigerung des Herzbeutels mit konsekutiver Einengung des Herzens und daraus resultierender Verschlechterung seiner mechanischen Pumpfunktion führen [10, 11].

Stattdessen stehen dem Operateur zwei Möglichkeiten zur weiteren Vorgehensweise zur Verfügung: zum einen kann der Herzbeutel eröffnet belassen werden, zum anderen besteht die Möglichkeit, einen überbrückenden Perikardverschluss mittels eines Patches durchzuführen [12]. Dieser ähnelt in der Funktion einem Flicker, der nach Aufbringung das Volumen des Herzbeutels vergrößert, somit die regelrechte, topographische Lage des Herzens beibehält und zusätzlich einer Leistungseinschränkung des Organs durch externe Druckeinwirkung entgegenwirkt. Ferner trennt der Patch das Operationsgebiet im oder am Herzen räumlich vom thorakalen Zugangsweg des Chirurgen.

Aufgrund der kontinuierlichen Zunahme der Anzahl an Operationen im Bereich der Herzchirurgie in den letzten Jahrzehnten ist es ebenfalls in diesem Bereich zu einer daraus folgend steigenden Zahl an Reoperationen gekommen [12, 13].

Hauptkomplikation dieser Reoperationen stellen Adhäsionen zwischen posteriorer Brustwand und den weiter dorsal gelegenen Strukturen dar [14]. Diese postoperativen Verklebungen erhöhen bei Zweiteingriffen deutlich das Verletzungsrisiko von Herz, großen Gefäßen und von in Primäroperationen bereits angelegten Grafts wie koronaren Bypässen [13, 14].

Untersuchungen haben gezeigt, dass der Einsatz eines überbrückenden Perikardersatzes zum Verschluss des Herzbeutels am Ende der Erstoperation sowohl das Auftreten als auch die Schwere von Adhäsionen signifikant senkt. Auch die damit verbundene Erniedrigung der Komplikationsrate einer eventuell erforderlichen Reoperation im Vergleich zum Offenbelassen des Perikards wird durch einen Perikardersatz erreicht [14].

Patches werden des weiteren eingesetzt in der Kardiovaskular – Chirurgie zur Rekonstruktion von großen Gefäßen wie zum Beispiel des Aortenbogens oder der Pulmonararterien [15, 16].

Außerdem können Patches zum Verschluss eines Bronchialstumpfes, für die Deckung von Diaphragma – Hernien oder zum Verschluss von angeborenen oder traumatischen Thoraxwanddefekten verwendet werden.

Während die hier genannten Indikationen einer heterotopen Anwendung von Perikard - Patches entsprechen, bezeichnet man den überbrückenden Herzbeutelverschluss

mittels eines Patches als orthotop; dies bedeutet, dass der Perikard – Patch an seiner ursprünglichen, anatomischen Position wieder eingesetzt wird.

### 1.2.2 Material:

Für den Perikardersatz stehen eine Vielzahl von Materialien zur Verfügung. Die für den Verschluss von Herzbeuteln genutzten Perikardstücke werden in der Fachsprache Patches genannt.

Einerseits finden synthetische Produkte aus Dacron [17, 18], Gore-Tex Polytetrafluoroethylen [19, 20, 21] oder Polyurethan [14] in der Praxis Anwendung. Andererseits werden auch biologische Implantate verwendet. Hierzu gehören Gewebe, die je nach Abhängigkeit vom Grad der genetischen Differenz zwischen Spender und Empfänger als autolog (Spender und Empfänger sind identisch), syngen (Spender und Empfänger haben identische Erbanlagen wie zum Beispiel eineiige Zwillinge), allogenen (Spender und Empfänger sind genetisch differente Individuen derselben Spezies) oder xenogen (Spender und Empfänger entstammen unterschiedlichen Spezies) bezeichnet werden. Autologe Gewebe wie Fascia lata [22, 23] und Dura mater [24] werden allerdings aufgrund des operativen Zugangswegs für die Gewinnung, der limitierten Verfügbarkeit und des nach Gewinnung entstehenden Gewebedefektes nur sehr begrenzt verwendet. Dieselbe Problematik trifft auch auf syngene und allogene Therapieansätze zu.

Eine weitere Möglichkeit stellt vor allem die weitverbreitete Herstellung von Patches aus xenogenem Perikard dar. Je nach Herkunft werden diese Patches als equin (vom Pferd), porcine (vom Schwein) oder bovine (vom Rind) bezeichnet [12]. Die bevorzugte Verwendung xenogener Perikardpatches lässt sich beispielhaft am Vergleich von Dacron – Patches und Rinderperikard erkennen. So kommt es zu einer signifikant stärkeren Blutung an den Rändern der durch Naht befestigten Dacron - Patches am umliegenden Gewebe, als das bei der Nahtfixierung des tierischen Perikards der Fall ist. Zusätzlich werden die Handhabungseigenschaften der xenogenen Patches von vielen Chirurgen als überlegen gegenüber synthetischen Produkten angesehen [25]. Weiterhin werden auch Unterschiede innerhalb der Gruppe der xenogenen Patches beschrieben, die sich auf die Funktion der jeweiligen Patches beziehen. So sind laut einer japanischen Studie bovine Patches im Hinblick auf Kalzifizierung und Verursachung einer entzündlichen, zellulären Antwort sowohl porcinen als auch equinen Patches überlegen [26].

### 1.2.3 Das Präparationsverfahren:

Die im täglichen operativen Alltag der Herzchirurgen am häufigsten eingesetzten xenogenen, also von einer anderen Spezies als dem Menschen abstammenden Patches, bedürfen vor der Implantation in den Patienten einer grundlegenden Vorbehandlung.

In den letzten Jahrzehnten hat sich eine Methode etabliert, die Glutaraldehyd als Substanz verwendet.

Glutaraldehyd geht auf molekularer Ebene kovalente Bindungen mit Aminosäuren des kollagenen Perikardgewebes ein. Dabei verbinden sich die Aldehydgruppen des Glutaraldehyds mit den Aminogruppen von Lysin, Hydroxylysin, Elastin und Glykoproteinen [27, 28, 29, 30]. Durch die Einlagerung von Glutaraldehydmolekülen in die Struktur des Bindegewebes ergeben sich Änderungen in der räumlichen Konformation des Perikards.

Die Konzentration der Glutaraldehydlösung, die Zusammensetzung im Bezug auf Monomere und Polymerbestandteile, die Fixationszeit, die Temperatur des Verfahrens und der pH – Wert sind dabei von entscheidender Bedeutung. Zu hohe Glutaraldehydkonzentrationen (größer als 1% Glutaraldehyd) sowie zu hohe Temperaturen des Fixationsprozesses können einen frühzeitigen Elastizitätsverlust des Materials verursachen und damit ein funktionelles Versagen des Produktes herbeiführen [31].

### 1.2.4 Xenogenes Transplantationsgewebe und Ziele einer notwendigen Vorbehandlung:

Glutaraldehyd gilt als geeignetstes Mittel in der Präparation xenogenen Materials. Ziel der Vorbehandlung der Rinderpatches mit Glutaraldehyd ist es, eine Fixierung und damit Stabilisierung des Perikards herbeizuführen. Laborexperimente haben gezeigt, dass es ohne Stabilisierung des Implantatgewebes zu Entzündungsreaktionen sich regenerierender Implantatzellen kommt, die letztendlich eine Zerstörung der gesamten Gewebestruktur zur Folge haben [32]. Die Gewebestabilisierung garantiert eine verlängerte Haltbarkeit des Patchmaterials. Ferner verhindert die Fixierung des Perikards den proteolytischen Abbau durch einwirkende Enzyme [33, 34, 35, 32] und gewährleistet zusätzlich neben einer gesteigerten Stabilität den Erhalt von Elastizität und Flexibilität des Materials. Diese Eigenschaften des vorbehandelten Perikards sind für die Funktion als Implantat im menschlichen Körper von grundlegender Bedeutung.

Außerdem verfolgt man mit einer Vorbehandlung der Patches die Absicht, die Antigenizität/Immunogenizität der das Kollagengewebe determinierenden Mucopolysaccharide und Glykoproteine weitestgehend zu minimieren, um eine immunologische Reaktion im Sinne einer Abstoßung zu vermeiden [36].

Im Allgemeinen wird durch Suppression des Immunsystems des Empfängers versucht, einer Abstoßungsreaktion, verursacht durch inkompatible Antigene, vorzubeugen bzw. entgegenzuwirken. Es hat sich unter anderem bei der Implantation von Patches allerdings gezeigt, dass durch chemische Präparation des Implantates selbst eine Verringerung der Antigenizität erreicht werden kann [37], eine Immunsuppression des Empfängers also nicht notwendig ist.

Nicht zuletzt bewirkt der Einsatz von Glutaraldehyd in der Vorbehandlung xenogener Präparate eine Sterilisierung. Sie stellt die Voraussetzung für eine kontaminationsfreie Implantation dar.

Ein weiterer Versuch, transplantiertes Material vor dem Zugriff des Immunsystems des Empfängers zu schützen, besteht darin, das xenogene Gewebe durch Mikroverkapselung mit permeablen, biokompatiblen Membranen gegen seine Umgebung abzuschirmen. Diese Methode hat allerdings bislang den Nachteil, nur für einzelne transplantierte Zellen oder kleinere Zellverbände anwendbar zu sein [38, 39].

#### 1.2.5 Zweifel an der Vorbehandlung:

Verschiedene Studien haben den Beweis erbracht, dass durch die Behandlung des xenogenen Materials mit Glutaraldehyd eine deutliche Reduktion der Antigenizität des tierischen Gewebes erreicht, eine Nicht - Immunogenität aber nicht erzielt werden kann. Dies bedeutet, dass trotz Vorbehandlung noch Antigene im Gewebe vorhanden sind. Laut dieser Studien konnten die noch immunogen wirkenden, intakten Antigene in Glutaraldehyd – vorbehandeltem, xenogenem Gewebe immunologische Reaktionen hervorrufen, wie sie auch bei einem Abstossungsprozess auftreten. Sie äußerten sich neben der Infiltration mit Lymphozyten auch in einer Invasion von bovinem Perikard durch Makrophagen, die histologisch nachweisbar zu einem Abbau des Kollagengewebes führten [40]. Es konnten in diesen Fällen teilweise auch Fremdkörperreaktionen beobachtet werden [41].

### 1.3 Abstoßung:

Bei der Xenotransplantation werden verschiedene Formen der Abstoßung beschrieben: die hyperakute, die akute oder verzögert vaskuläre, die akute zellvermittelte und die chronische Abstoßung [42]. Es ist bekannt, dass sowohl bei der hyperakuten [43, 44, 45] als auch bei der akuten, vaskulären (humoralen) Abstoßung [46, 47, 48] xenoreaktive Antikörper und Komplementaktivierung am Abstoßungsprozess maßgeblich beteiligt sind. Eine Involvement dieser Mechanismen zur Entwicklung einer chronischen Abstoßung wird indes noch untersucht [49, 50].

#### 1.3.1 Die xenogene Abstoßung:

Der Antigen – Antikörper - induzierte Abstoßungsprozess nach der Implantation eines Xenotransplantats läuft folgendermaßen ab:

##### 1.3.1.1 Pathogenese

Zu Beginn der Abstoßung binden präformierte Antikörper des Empfängers an antigene Strukturen, die sich auf den Endothelien der Blutgefäße im transplantierten Gewebe des Spenders befinden. Diese Antigene sind in der Hauptsache endothelständige Epitope der Gal –  $\alpha$  1,3 – Galaktose [51]. Durch die Antigen – Antikörper – Interaktion kommt es zu einer Konformationsänderung des sogenannten konstanten Fragments (Fc – Teil) des Antikörpers, der die Rezeptorstellen für die Initiatorenzyme des klassischen Weges der Komplementaktivierung beherbergt. Aufgrund der molekularen Strukturänderung des Fc – Teils werden die bis dahin maskierten Enzymbindungsstellen demaskiert und so für die Bindung der Komplementfaktoren zugänglich. Die Kaskade der Komplementaktivierung hat ihren Anfang in der Bindung und Aktivierung des Faktors Cq1. Alle sich anschließenden, katalysierten Schritte der Komplementaktivität laufen automatisch ab. Viele der Proteine sind Zymogene, d. h. Proenzyme, die proteolytisch aufgespalten werden müssen, bevor sie ihre enzymatische Aktivität entfalten [52]. Die Endstrecke bildet ein Komplex aus den Faktoren C5b – 9, die zusammen den sogenannten „membrane attack complex“ (MAC) ergeben. Der MAC bildet durch Polymerisierung der einzelnen, teilweise nicht enzymatisch zusammengelagerten Moleküle hydrophobe Domänen aus, die es ihm erlauben, sich als Angriffskomplex in die Doppellipidschicht der Membranen von Zellen einzulagern und Poren zu bilden. Die Poren wiederum bewirken eine Störung des Diffusionsgradienten über die Membran. Durch den Einstrom von Ionen und Wasser



entlang des Konzentrationsgradienten in die betroffene Zelle wird diese schwer beschädigt bzw. zerstört, da sie nicht mehr in der Lage ist, das überlebenswichtige Gleichgewicht von Osmolalität und Osmolarität aufrecht zu erhalten.

Mikroskopisch äußert sich der Vorgang der Zellzerstörung durch das aktivierte Komplementsystem in einer Schädigung des Endothels von Blutgefäßen des Transplantats. Daraus resultiert zum einen ein Austritt von Zellen und Flüssigkeit ins perivasale Interstitium und zum anderen die Bildung von Thromben im Gefäßlumen, die die Blutgefäße verschließen und so eine weitere Durchblutung des Transplantates unmöglich machen. Somit entstehen Hämorrhagien, Thrombosierungen und Ischämie, die zum Untergang des Transplantates führen [53, 54].

Kernhaltige Zellen können gegen den MAC relativ resistent sein, da sie die Fähigkeit besitzen, Teile der eigenen Membran mit dem MAC entweder zu endozytieren oder zu exozytieren. Die Widerstandsfähigkeit hängt davon ab, wie ausgeprägt Antikörper im Rahmen einer Abstoßung ihre zugehörigen Antigene erreichen und binden und so eine äquivalente MAC – Bildung bedingen [52].

#### 1.3.1.2 Bedeutung xenoreaktiver Antikörper:

Dass xenoreaktive Antikörper eine essentielle Rolle in der Initiierung der Abstoßung xenogener Trans – oder Implantate übernehmen, lässt sich aus zweierlei Gründen nachvollziehen:

Die Depletion der natürlichen, xenoreaktiven Antikörper des Empfängers eines Xenotransplantats verlängert das Überleben des Transplantats auch bei intaktem Komplementsystem im Gegensatz zu einer frühzeitigen Abstoßung des Transplantats bei Vorhandensein der natürlichen, xenoreaktiven Antikörper [53, 55, 56]. Außerdem lassen sich bei Transplantatproben, die eine solche Abstoßung durchlaufen haben, histologisch regelmäßig Depositionen von Immunglobulinen zusammen mit Molekülen des klassischen Komplementweges an den Endothelien der Blutgefäße des Empfängers nachweisen [53, 57, 58].

Hauptsächlich können bei Ablagerungen auf dem Transplantatendothel Antikörper vom IgM – Typ gefunden werden und ebenso zu einem geringeren Anteil Antikörper der Klasse IgG [53, 59].

Bei den Antigenen handelt es sich vorzugsweise um Gal -  $\alpha$ , 1,3 – Galaktose [51, 60, 61, 62]. Bei gewissen Spezies wie dem Menschen und Primaten kommen diese Polysaccharide nicht vor, da ihnen das Enzym  $\alpha$ 1,3 – Galactosyltransferase, das die Synthese dieser Polysaccharide katalysiert, fehlt. Dafür besitzen diese Organismen natürlicherweise Antikörper gegen Gal –  $\alpha$ , 1,3 - Gal [63, 64].

### 1.3.1.3 Bedeutung des Komplementsystems:

Die Entwicklung einer Antigen – Antikörper - induzierten Abstoßung hängt größtenteils von der Aktivierung des Komplementsystems ab. In allen bisher vorliegenden experimentellen Studien lässt sich eine eindeutige Korrelation zwischen dem Auftreten einer xenogenen Abstoßung und der Komplementaktivierung im Organismus des Empfängers feststellen [65, 66]. Ist das Komplementsystem inhibiert, so tritt auch keine Antikörper - vermittelte Abstoßung auf.

Neben der unter 1.3.1.1 beschriebenen, direkten, funktionellen Interaktion des Komplements mit den Antikörpern des Empfängers erfüllt es auch weitere, wichtige Funktionen bei der xenogenen Abstoßung.

Die Untereinheiten der Komplementkomponenten C3 – 5 (C3a, C4a, C5a), die auch als Anaphylatoxine bezeichnet werden, zeichnen für eine komplementvermittelte Vasodilatation verantwortlich. Sie üben ihre Funktion über Rezeptoren aus, die sich auf den Membranen von Mastzellen, basophilen und neutrophilen Granulozyten befinden. Die konsekutiv von den genannten Zellen sezernierten Mediatoren wie Histamin und Heparin bedingen eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, woraus zum einen eine Vasodilatation und zum anderen eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität resultiert. Die Vorteile dieser Teilfunktion des Komplementsystems liegen darin, den Blutfluss im Bereich einer Infektion oder Immunantwort zu erhöhen, um den weiteren Zustrom von Antikörpern, Komplementfaktoren und Immunzellen zu gewährleisten.

Neben anderen Substanzen, die eine chemotaktische Funktion aufweisen und die von Immunzellen während einer Entzündungsreaktion sezerniert werden, sind auch die Komplementfaktoren C3a und C5a in der Lage, als lösliche Botenstoffe phagozytierende Zellen wie zum Beispiel Neutrophile oder Monozyten anzulocken und zur Zytokinsynthese zu veranlassen [67]. Diese wandern aus der Blutbahn ins Gewebe aus, wo sie für die Phagozytose und Verdauung von körperfremden Antigenen und Zelldetritus verantwortlich sind.

Monozyten und Makrophagen wiederum produzieren Interleukine (vor allem IL - 6, TNF $\alpha$ ) und sorgen für eine fortlaufende Augmentation der immunologischen Antwort, indem sie über diese Interleukine weitere Immunzellen wie B – und T – Lymphozyten anlocken bzw. diese aktivieren.

Komplementfaktoren unterstützen außerdem neben Antikörpern der Klasse IgG die Opsonierung von körperfremdem Material. So bindet C3b unspezifisch an die Membran des zu verdauenden Materials und dient als Substrat für Rezeptoren auf Phagozyten. Die anschließende Internalisierung (Opsonierung) wird somit erleichtert.

Der klassische Pfad der Komplementaktivierung spielt bei der xenogenen Abstoßung eine übergeordnete Rolle; Komponenten des alternativen Aktivierungsweges werden nur zu einem geringen Prozentsatz nachgewiesen [53, 57, 58].

Die Aktivierung des Komplements nach Xenotransplantation kann auf dreierlei Weise erfolgen:

1. xenoreaktive Antikörper binden an Antigene des Xenotransplantats. Diese Bindung führt zur Aktivierung des Komplementsystems auf dem klassischen Pfad [56].
2. ein quantitativer oder funktioneller Mangel an Faktor H, dessen Funktion normalerweise in der Regulation der C3 – Konvertase des alternativen Weges der Komplementaktivierung besteht, kann zu einer spontanen Aktivierung führen.
3. Zellmembran – assoziierte Komplement - regulierende Proteine (complement regulatory proteins, CRP) des Spenderorgans versagen funktionell in der Inhibierung des Komplementsystems des Empfängerorganismus. Diese intrinsische Empfindlichkeit der CRP des Spenders gegenüber dem Komplementsystem des Empfängers ist spezie – spezifisch, d. h. dass CRP und Komplementsystem verschiedener Spezies bei einem Aufeinandertreffen funktionell nicht im Gleichgewicht stehen, sondern dass die Komplementaktivität überwiegt [68, 69].

Auch wenn sich die Antigen – Antikörper - induzierte Abstoßung nicht aus einem einzigen der drei Mechanismen allein entwickelt, so spielt das Vorhandensein xenoreaktiver Antikörper des Empfängers gegen Antigene des Spendergewebes mit konsekutiver Komplementaktivierung bei der Transplantation tierischen Materials auf den Menschen eine übergeordnete Rolle.

#### 1.3.1.4 Weitere diskutierte Abstoßungsvorgänge:

Über das genaue Zusammenspiel der einzelnen Vorgänge auf molekularer Ebene ist bis heute keine eindeutige Klarheit erlangt worden.

Ein weiterer Mechanismus in der Pathogenese der xenogenen Abstoßung könnte die Komplement – vermittelte Lyse endothelialer Zellen des Spenderimplantats sein. Konsequenz daraus wäre eine Störung der Integrität des betroffenen Blutgefäßes mit Verlust von Blutbestandteilen nach extravasal und insbesondere der Kontakt von unter dem Endothel befindlicher Zellmatrix mit Thrombozyten, aus der Thrombozytenaktivierung, - adhäsion und - aggregation nach dem Prinzip der extrinsischen Gerinnung resultiert. Zusätzlich käme es zu einer Vasokonstriktion ausgelöst durch einen Mangel an NO.

Da aber in einigen Fällen der Abstoßung Endotheldefekte erst spät entdeckt werden können, scheinen auch nicht – zytotoxische Reaktionen für die Auslösung einer Abstoßung auszureichen.

Zu diesen Vorgängen zählen solche, die die endothelialen Funktionen einschränken [70]. Ein erheblicher Verlust an Heparansulfat vom Endothel tritt kurze Zeit nach seiner Exposition mit Antikörpern und Komplement auf [71]. Heparansulfat unterstützt einerseits physiologischerweise die Barrierefunktion des Endothels gegen Blutzellen und Plasmaproteine, andererseits die Antikoagulation und zum dritten den Schutz gegen Oxidantien und Komplement [72]. Dieser Prozess schreitet auch in vivo mit einer solchen Geschwindigkeit fort, dass er einen Teil der Veränderungen der vaskulären Funktion verursachen könnte [73].

Ferner legen Wrenshall et al. in Studien dar, dass Heparansulfat – Proteoglykane, die durch das Zusammenwirken von Antikörpern und Komplement vom Endothel abgetrennt wurden, von Antigen – präsentierenden Zellen aufgenommen und präsentiert werden. Dies trüge zu der Induktion von proliferativen und zytolytischen T – Zellantworten bei [74, 75].

Weiterhin kann eine Veränderung der endothelialen Zellform, ausgelöst durch den Komplementkomplex C5b67 und beschleunigt durch die Wirkung des MAC auftreten, die in der Formation interzellulärer Spalten (Auflösung der sogenannten „gap junctions“) endet [76]. Dadurch kommt es wiederum zum Verlust der Gefäßintegrität und zu Thrombozytenakkumulation entlang der betroffenen Gefäßabschnitte.

Außerdem können die kovalente Bindung der Antikörper an kongruente Epitope, die Aktivierung des Komplementsystems oder die von Thrombozyten sezernierten Produkte eine Expression von P Selectin und von von Willebrand – Faktor auf der Oberfläche der Endothelzellen initiieren [77, 78]. Diese sorgen für eine Adhäsion und Koagulation von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten.

#### *1.4 Die Fremdkörperreaktion:*

##### *1.4.1 Allgemeines:*

Fremdkörperreaktionen treten beim Menschen immer dann auf, wenn korpuskuläre Gebilde in den Organismus gelangen, die entweder kristallin oder metallisch sind oder aus Polymerisaten bestehen, die vom Organismus extrem schlecht abgebaut werden können. Die Aufnahme derartiger Fremdkörper kann dabei per inhalationem, per injectionem, traumatisch oder iatrogen erfolgt sein. Neben diesen echten, von außen in

das Gewebe gelangten Fremdkörpern können auch im Organismus selbst Substrate mit Fremdkörpercharakter entstehen [79].

#### 1.4.2 Pathogenese:

Überall dort, wo das Fremdkörpermaterial im Gewebe liegen bleibt, kommt es zu einer Ansammlung von Makrophagen. Sind die Fremdkörper kleiner als die Makrophagen, werden sie zwar phagozytiert, können aber intrazellulär nicht abgebaut werden. Dadurch verbleiben sie für längere Zeit in den Heterophagievakuolen der Makrophagen. Je nach Oberflächenbeschaffenheit „verklebt“ der Fremdkörper mit der Vakuolenwand, sodass sie mit der Zeit einreißt. Infolgedessen werden gewebserstörende lysosomale Enzyme freigesetzt. Sie versuchen zwar, den Fremdkörper aufzulösen, setzen aber damit eine Entzündungsreaktion in Gang. Diese führt zu einer Zerstörung auch des umgebenden Gewebes.

Sind die Fremdkörper größer als die Makrophagen, können sie nicht phagozytiert werden. In diesem Falle fusionieren die Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen. Sie sind mehrkernig, lagern sich an die übergroßen Fremdpartikel an und setzen lysosomale Enzyme frei.

Auf eine im einzelnen noch ungeklärte Weise wird auch das T – Zellsystem aktiviert, sodass es zu einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ kommt, in deren Verlauf sich eine stenosierende Vaskulitis ausbilden kann.

#### 1.4.3 Histologie:

Durch die Fremdkörperreaktion kommt es zur Granulombildung bestehend aus einer Ansammlung von ungeordneten Riesenzellen. In unmittelbarer Umgebung sieht man bei mikroskopischer Betrachtung die eingewanderten Makrophagen, die von einem lymphozytären Infiltrat zusammen mit einsprossenden Kapillaren und Fibroblasten umringt werden.

### 1.5 Zytokine:

#### 1.5.1 Zytokineigenschaften:

Zytokine sind einfache Polypeptide oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht bis zu 30 kD (manche bilden höhermolekulare Oligopeptide). Ihre Produktion wird auf Transkriptions – und Translationsebene von verschiedenen Stimuli induziert. Im

Vergleich zu Hormonen ist die Produktion von Zytokinen nicht auf jeweils einen bestimmten Zelltyp beschränkt. Ein Zytokin kann normalerweise von mehreren Zelltypen, die bei immunologischen Reaktionen wie der Abstoßung beteiligt sind, synthetisiert werden. So kann Interleukin – 6 von T – Zellen, Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Hepatozyten, Endothelzellen und Neuronen gebildet werden. Als Ausnahme wird Interleukin – 2 nur von T – Zellen produziert [80]. Ferner beschränkt sich der Aktionsradius von Zytokinen auf die unmittelbare Umgebung ihres Sezernierungsortes (autokrin, parakrin) [81]. Zytokine agieren über die Bindung an spezifische, hoch – affine Rezeptoren an der Zelloberfläche der Zielzellen.

#### 1.5.2 Zytokinwirkungen:

Bei Zytokinen handelt es sich um lösliche Botenstoffe. Sie sind für eine Reihe von Effekten verantwortlich, die in ihrer Gesamtheit eine Art Netzwerk bilden [80]. Die wichtigsten immunregulatorischen Wirkungen werden wie folgt zusammengefasst [80, 82, 83]:

1. Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ab. Zur Ausdifferenzierung und Weiterbildung der jeweiligen Zelltypen und zur Regulation dieser Vorgänge sind Zytokine notwendig.
2. Liegt eine immunologische Reaktion vor, müssen die an der Immunantwort beteiligten Zellen spezifisch aktiviert werden. Neben den direkten Zell – Zell – Kontakten werden Monozyten/Makrophagen, T – Zellen und B – Zellen noch zusätzlich durch Zytokine aktiviert.
3. Aktivierung von B – Lymphozyten:  
Hierbei kommt es zur Proliferation und zur Weiterentwicklung zu Plasmazellen, welche schließlich die antigen – spezifischen Immunglobuline verschiedener Isotypen sezernieren.
4. Aktivierung von T – Lymphozyten:  
Anschließend differenzieren sie sich zu den jeweiligen Subtypen und steuern durch die Produktion von Zytokinen die ablaufende Immunantwort, hierbei ganz besonders die Funktion der B – Lymphozyten.

Phänotypisch kommt es durch Zytokinwirkungen zur Steigerung (oder Inhibition) der Zellwachstumsrate, zur Differenzierung der Zellen und/oder zur Änderung von bestimmten Zellfunktionen. Zytokine, die von Lymphozyten synthetisiert und sezerniert werden, entfalten ihre Wirkung in fast allen Organen und Organsystemen. Damit sind

sie wichtiger Bestandteil der koordinierten Immunantwort [52, 81, 84] und vermitteln den regelrechten Funktionsablauf von immunologischen Reaktionen wie der Abstoßung.

#### 1.5.3 Proinflammatorische Zytokine:

Interleukin – 6 (IL – 6) und Tumor – Nekrose – Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )

##### 1.5.3.1 Interleukin – 6:

IL – 6 ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht zwischen 21 und 28 kDa, abhängig davon, von welcher Zelle es produziert wird. Interleukin – 6 wird von zahlreichen Zelltypen produziert, und zwar von T – Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, B - Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen [85]. Eine wichtige Eigenschaft der Produktion von IL – 6 ist, dass sie nur nach Stimulation der genannten Zellen stattfindet [86]. Somit ist eine hohe Produktionsrate an IL – 6 bei allen Immunreaktionen zu erwarten, die eine Beteiligung der IL – 6 produzierenden Zellen wie Monozyten/Makrophagen, T – und B - Lymphozyten aufweisen. Auch die Wirkungen von Interleukin – 6 sind mannigfaltig. Als multifunktionelles Zytokin reguliert es Immunantworten, Akut – Phase – Reaktionen und die Hämatopoese und dürfte eine zentrale Rolle in Abwehrmechanismen des menschlichen Organismus spielen [87, 88]. So stimuliert IL – 6 die Hämopoese von Makrophagen und Granulozyten aus Progenitorzellen [80]. Es führt ebenfalls zur Reifung von Megakaryozyten. Vor allem aber induziert dieses Zytokin die Proliferation und Differenzierung von Hepatozyten, Keratinozyten, Nervenzellen, T – Lymphozyten und B – Lymphozyten. Bei Immunreaktionen wie der xenogenen Abstoßung stimuliert IL – 6 das Heranwachsen der T – Lymphozyten im Thymus und peripher [89, 90]; in Kombination mit IL – 1 [91] bewirkt es eine T – Zelldifferenzierung zu zytotoxischen T – Zellen [92, 93] und ist in der Lage, natürliche Killerzellen (NK) [94] zu aktivieren. Im Bezug auf B – Lymphozyten veranlasst das Zytokin die Differenzierung von normalen, nicht aber von ruhenden B – Zellen [95, 96, 97] zu Plasmazellen mit resultierender Immunglobulinproduktion [98, 99].

### 1.5.3.2 Tumor – Nekrose – Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ):

Man unterscheidet zwei Subtypen dieses Interleukins: TNF  $\alpha$  (Cachectin) und TNF  $\beta$  (Lymphotoxin).

TNF  $\alpha$  existiert als freie Form (Trimer) und als membrangebundene Form. Es handelt sich bei diesem Interleukin um ein Polypeptidzytokin, das bevorzugt von Monozyten/Makrophagen und auch von Lymphozyten produziert wird [100]. Seltener Produktionsorte sind überdies Endothelzellen und Muskelzellen der glatten Muskulatur [80, 101]. Neben der Aktivierung von Makrophagen, Granulozyten und zytotoxischen Zellen entfaltet TNF  $\alpha$  seine Wirkung auch durch eine Zunahme der Adhäsion von Leukozyten am Endothel von Gefäßen. Dadurch wird der Prozess der Auswanderung von Leukozyten aus der Blutbahn in das perivasale Gewebe erleichtert. Lebranchu et al. haben in in – vitro – Versuchen herausgefunden, dass nicht nur während der allogenen Abstoßung, sondern auch in der xenogenen Abstoßungssituation TNF  $\alpha$  eine wichtige Rolle im Hinblick auf Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel spielt. Sie konnten nachweisen, dass die Adhäsion von menschlichen Lymphozyten des peripheren Blutes an noch vorhandenes, porcines Endothel des Implantates mit Hilfe einer Stimulation des tierischen Endothels durch humanes TNF  $\alpha$  signifikant gesteigert werden konnte [102].

Zusätzlich stimuliert TNF  $\alpha$  auch die Angiogenese [52].

TNF  $\alpha$  zirkuliert im gesamten Organismus und reagiert auf Stimuli wie infektiöse Partikel oder Gewebeverletzungen, indem es für die Veränderung der Eigenschaften von Endothelzellen zuständig ist. Neben der Zytokinproduktion und Expression von Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen bewirkt TNF  $\alpha$  ebenso eine Freisetzung prokoagulatorischer Substanzen [100].

Die Produktion von TNF  $\alpha$  wird vermittelt durch die Wirkung von Lymphokinen auf Makrophagen. Separierte Monozyten produzieren TNF  $\alpha$  innerhalb von vier Stunden, während sie mit Interleukin – 2 stimuliert werden [103]. Außerdem gibt es Hinweise aus in – vitro – Studien, die zeigen, dass TNF  $\alpha$  in hohen Konzentrationen von T – Lymphozyten sezerniert wird, die über die Rezeptoren CD 2 und CD 28 aktiviert werden [104].



## 2. THEMATIK

### 2.1 Das NO – REACT Patch:

#### 2.1.1 Allgemeine Herstellung und Eigenschaften:

Das sogenannte „No – React“ Patch ist ein Produkt der Firma Shelhigh (Millburn, New Jersey, USA). Er wird aus Rinderperikard hergestellt. Der herstellenden Firma zufolge hat das „No – React“ Patch sein primäres Einsatzgebiet in der Abdeckung des Herzens und der aortalen Wurzel nach herzchirurgischen Eingriffen. Allerdings kann es auch bei den schon erwähnten Indikationen wie beim Verschluss intrakavitärer Defekte, bei Erweiterungen des ventrikulären Ausflusstraktes und Gefäßrekonstruktionen eingesetzt werden.

Das bovine „No – React“ Patch durchläuft nach der Gewinnung aus dem Herzbeutel der Tiere eine Fixation mittels Glutaraldehyd (s. o.) [105].

#### 2.1.2 Die Detoxifikationsmethode und ihre Vorteile:

Nach der Fixation des „Shelhigh No – React“ Patches mittels Glutaraldehyd (um einen hohen Grad an Resistenz gegen Biodegradation zu erreichen) durchläuft das bovine Perikard eine von der Herstellerfirma sogenannte Detoxifikationsmethode, die „in Lösungen natürlicher, endogener Substanzen mit multiplen physikalischen Variablen“ stattfindet und „eine Inkubation mit Surfactant“ beinhaltet, „die eine Nicht – Reaktivität in vivo unterstützt“ [16]. Der letztgenannte Hinweis hat zu der Namensgebung des Produktes geführt. Es schließt sich daran ein ebenfalls nicht näher erläuteter Waschvorgang mit einer nicht genau definierten Heparinlösung an.

Die Gründe für diese Vorgehensweise bei der Produktion des „No – React“ Patches gegenüber herkömmlichen Vorbehandlungsverfahren werden wie folgt beschrieben: Die klinische Erfahrung zeigt, dass der häufigste Grund für eine sich entwickelnde Dysfunktion Glutaraldehyd – vorbehandelter Bioprothesen, und hier sind vor allem die Herzklappenersätze zu nennen, in einer kalzifizierenden Degeneration des jeweiligen Implantats liegt. Rund 20 – 30 Prozent aller Patienten bedürfen nach Klappenersatz einer Reoperation im 10. postoperativen Jahr, von denen die meisten durch eine Kalzifizierung der Klappen hervorgerufen wird [16,106, 107, 108].

Scheld et al. haben in in – vitro Studien entdeckt, dass es einen engen Zusammenhang gibt zwischen der Menge der Kalziumablagerungen in den Zellen des

implantierten Gewebes einerseits und dem auf das Material wirkenden, mechanischen Stress beziehungsweise Fettablagerungen im Material andererseits [33, 34, 109].

Für die Degeneration durch die Einlagerung von Kalzium soll auch die Glutaraldehydbehandlung eine fundamentale Rolle spielen. Die schon weiter oben erwähnten aldehydbedingten intra – und intermolekularen Bindungen zwischen den Aldehydgruppen des Glutaraldehyds und den Aminogruppen der Aminosäuren des Kollagens haben demnach einen schädlichen Einfluss auf die Resistenz des Implantatgewebes im Hinblick auf Zellmineralisation [35, 110, 111, 112, 113]. Genau diesem Vorgang soll der nach der Fixation mit Glutaraldehyd stattfindende durchgeführte Waschvorgang mit der Heparinlösung entgegenwirken. Die Aminogruppen des Heparins reagieren während der Inkubation mit dem bereits fixierten Perikard durch Bindung der Aldehydgruppen des Glutaraldehyds mit den restlichen Glutaraldehydmolekülen, die noch nach einem vorangegangenen Hauptwaschschritt im xenogenen Gewebe zurückgeblieben sind. Die auf diese Weise geblockten Moleküle können nach Implantation nun nicht mehr zu einer zusätzlichen Angreifbarkeit des xenogenen Materials führen [114, 115].

Zusätzlich bewirkt das Glutaraldehyd eine Devitalisierung der Zellen im Kollagen, woraus ein transmembranöser Zusammenbruch unter anderem der Kalziumregulation entsteht, was eine weitere Begünstigung von Kalziumablagerungen in den Zellen des Kollagengewebes erklären soll [116].

Eine progrediente Kalzifizierung des Implantats führt letzten Endes zu seiner Degeneration und folglich zu einem Versagen seiner Funktion. Aus nicht näher dargestellten Gründen verfügt die No – React – Antikalzifizierungsbehandlung laut Hersteller über die Fähigkeit, den Kalzifizierungsprozess nicht nur zu verlangsamen, sondern komplett zu verhindern [106]. Dies zeigte sich zum einen in in – vitro Studien, während derer vergleichend No – React - vorbehandelte und Glutaraldehyd – vorbehandelte bovine Perikardstreifen in einer Kalziumphosphatlösung über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert wurden, und zum anderen in nachfolgenden in – vivo Versuchen, in denen Ratten diese Perikardstreifen subkutan implantiert wurden. In beiden Versuchsreihen kam es zu einer signifikant niedrigeren Einlagerung von Kalzium in das No – React Perikard im Vergleich zum Glutaraldehyd – behandelten Perikard [16]. Außerdem wird der No – React Methode zugesprochen, dass sie eine Entzündungsreaktion in Form einer Infiltration des Perikards des Implantatempfängers durch mononukleäre Zellen mit Bildung von Fremdkörperriesenzellen deutlich abschwächt, beziehungsweise eine Progression der angesprochenen entzündlichen Antwort unterdrückt [106, 117]. Während die morphologische Analyse der in die Ratten implantierten Perikardstücke für das mit Glutaraldehyd behandelte Perikard eine über

fünf Wochen auffallende, fortschreitende Riesenzellbildung mit Auflösung der Kollagenbinnenstruktur ergab, war das implantierte No – React Patch nach drei beziehungsweise fünf Wochen geprägt von einer deutlich abgeschwächten, zellulären Inflammationsreaktion, die sich auf die seröse Oberfläche des Perikards beschränkte. Des Weiteren wurde die kollagene Binnenstruktur des Herzbeutelstreifens in ihrer faszikulären Organisation nicht beeinflusst [16].

Einhergehend mit diesen Befunden soll der No - React Detoxifikationsprozess im Hinblick auf die behandelten Gewebe dafür sorgen, dass die Zytotoxizität des xenogenen Fabrikats vollständig aufgehoben wird; das heißt, dass nach der Vorbehandlung des Perikardpatches keine der durch die Detoxifikation hinzugefügten Substanzen zu einer Schädigung oder Reaktionsbildung des Implantats mit dem Empfängergewebe führt. Dies hat sich in Studien gezeigt, in denen das No – React Gewebe eine 100%ige Zytokompatibilität aufwies, indem es das Wachstum der das Patch umgebenden Empfängerzellen nicht beeinflusste. Hinzu kam ein stabiler pH – Wert von 7,2. Bei denselben Untersuchungen mit Glutaraldehyd – behandeltem Perikard ließen sich ein fast direkter Zellwachstumsstop, Zelluntergang und ein deutlicher pH – Wertabfall auf 3 beobachten [106, 117].

Der Hersteller Shelhigh verweist in seiner Gebrauchsanweisung zur Nutzung der No – React Produkte weiterhin darauf, dass der Waschvorgang der Patches in einer nicht näher deklarierten Heparinlösung zur Biokompatibilität des Patchmaterials beiträgt. Heparinbehandelte Gewebe zeichnen sich dementsprechend durch verschiedene Vorteile aus, die zusammen die Verminderung einer systemischen immunologischen Reaktion auf unterschiedliche Entzündungsreize ergeben. Dazu gehören die Abschwächung von Kontaktaktivierung zwischen proinflammatorischen Zellen, die Abschwächung der Blutgerinnung, die Verhinderung der Komplementaktivierung und die Verminderung der Leukozytenaktivierung [118].

Sowohl in der Gebrauchsanweisung des Herstellers als auch in Untersuchungen über die No – React Produkte wird darauf hingewiesen, dass bislang weder experimentell noch in der klinischen Anwendung ausreichende Langzeiterfahrungen vorliegen [16, 119].

### 2.1.3 Weitere experimentelle Erfahrungen mit No – React - Produkten:

In anderen Studien allerdings sind mit dem No – React Patch auch Erfahrungen gemacht worden, die von den oben beschriebenen abweichen.

So beschreiben Mazzucco et al. eine Vergleichsuntersuchung von einem nach allgemeinem Standard hergestellten Perikardprodukt namens Biocor PSB (Biocor

Industria e Pesquisa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brazil) und einem No – React Fabrikat, das in einem Zeitraum von vier Jahren zwischen 1992 und 1996 bei 106 Patienten im Alter von 70 + / - 6 Jahren als Aortenklappenersatz eingesetzt wurde. Die Ergebnisse zeigten unter anderem einen zufriedenstellenden Beitrag des standardisiert vorbehandelten Biocor – PSB Produktes zur Verbesserung der Überlebensrate der Patienten dadurch, dass herzbedingte Todesfälle und Klappendysfunktionen aufgrund langfristiger Klappenzerstörung bzw. – degeneration trotz des hohen Patientenalters und deren Multimorbidität reduziert werden konnten.

Die mit der No – React Methode vorbehandelten Biocor - PSB Ersätze allerdings zeigten laut Studie keinen Einfluss auf die Langzeithaltbarkeit des xenogenen Materials [120].

In einem weiteren experimentellen Ansatz sind Schafen vergleichend No – React – und Toronto SPV – Bioprothesen (St. Jude Medical, Inc., St. Paul, Minnesota, USA) für den Herzklappenersatz eingesetzt worden. Dabei handelt es sich im Falle des No – React Fabrikats um vom Rind stammendes Perikard, während das Toronto SPV – Produkt aus Schweineperikard gewonnen wird. Das Toronto SPV - Implantat durchläuft während der Herstellung die standardisierte Glutaraldehyd – Fixationsmethode, wobei im Gegensatz dazu das No – React Perikard nach der oben angesprochenen Vorbehandlungsmethode produziert wird.

Im Hinblick auf die nach drei Monaten zu eingehenden Untersuchungen entnommenen Herzklappen ließ sich feststellen, dass es bei beiden Vergleichsobjekten zu Kalzifizierungen gekommen war, die aber folgendermaßen unterschiedlich ausfielen: Während weder bei der makroskopischen Inspektion, noch bei einer röntgenologischen und histologischen Untersuchung des Toronto SPV – Perikards eine signifikante Kalzifizierung der Klappen gefunden werden konnte, zeigten sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen leichte Kalziumablagerungen zwischen Kollagenfasern und in Zellbestandteilen.

Im deutlichen Gegensatz dazu konnten nach der Entnahme der No – React vorbehandelten Perikard – Bioprothesen klare Kalziumdepositionen in allen Untersuchungsmethoden des Versuchs nachgewiesen werden.

Die Untersucher kommen zu dem Schluss, dass der No - React Prozess nicht zu einer Verhinderung der Kalzifikation der Bioprothese geführt hat [121].

Auch in klinischen Studien ist es zu Auffälligkeiten nach der Implantation No – React vorbehandelter Bioprothesen gekommen.

So haben Chirurgen in Cincinnati ein Shelhigh No – React Produkt über einen Zeitraum von zehn Monaten sieben Patienten als Lungengefäßersatz erfolgreich

implantiert. Fünf dieser sieben eingebrachten Implantate mussten in den folgenden achtzehn Monaten aufgrund schwerer Gefäßobstruktionen in einem erneuten Eingriff ersetzt werden. Das prozentuale Versagen der mit No – React behandelten Bioprothesen betrug zwölf Monate nach dem Ersteingriff 72%.

Die histologische Untersuchung der explantierten Shelhigh - Produkte ergab eine deutliche Ablösung der innersten Schicht der Gefäße, der sogenannten Intima, entlang des Konduits. Des Weiteren konnte eine intensive, granulomatöse Entzündungsreaktion im Bereich der Gefäßprothesenwand nachgewiesen werden. Während in den entzündlich veränderten Arealen keine Kalzifizierung des Gewebes festgestellt werden konnte, wurden aber Veränderungen in Form von Fibrosierungen entdeckt. Die histologischen Untersuchungen zeigten eindeutig eine Fremdkörperreaktion [122].

Ähnliche Erfahrungen sind auch in einem Krankenhaus in Ann Arbor, Michigan, USA gemacht worden. Dort sind 24 Patienten in einem Alter von 2,8 +/- 3,9 Jahren mit einem No - React Pulmonalklappenersatz der Firma Shelhigh in einem Zeitraum von Februar 2000 bis September 2000 operativ versorgt worden.

Nach durchschnittlich 23 +/- 5 Monaten kam es zu zwei späten Todesfällen (8%), die zwar nicht direkt mit dem Versagen der implantierten Bioprothesen assoziiert waren, jedoch zeigten diese eine erhebliche Stenosierung des Konduits, also eine Lumeneinengung des Prothesendurchmessers.

Bei 21 No –React Produkten traten entweder leichte bis schwere Stenosierungen und/oder Regurgitationen auf, was einen Blutfluss nach deren Schluß über die Klappenebene in die Herzkammern in der diastolischen Ruhephase des Herzens beschreibt und eine Undichte des Klappenersatzes dokumentiert. Diese Komplikationen entsprechen 84% der in der Studie verwendeten Klappenersätze. Aufgrund der entstehenden Obstruktionen der Ausflusssbahn des rechten Ventrikels bei elf Patienten und einer Pseudoaneurysmabildung bei einem Patienten mussten diese nach einer mittleren Dauer von 12 Monaten (in einem generellen Zeitraum von 2 – 18 Monaten) reoperiert werden, um dem strukturellen und daraus folgend funktionellen Versagen der No – React Produkte entgegenzuwirken.

Wie auch in der Studie von Manning et al. konnten histologisch bei den im Zweiteingriff entnommenen Bioprothesen deutliche, intimale Ablösungen festgestellt werden, die ebenfalls keine Kalzifizierungen aufwiesen [123].

#### 2.1.4 Koblenzer Untersuchungen:

Komplikationen nach Implantation von No – React Produkten in Deutschland:

In ähnlicher Art und Weise wie oben beschrieben, ist es auch in Deutschland zum Auftreten postoperativer Komplikationen gekommen, die im Zusammenhang mit der chirurgischen Implantation eines No – React Produktes der Firma Shelhigh stehen. Bei diesem Produkt handelt es sich um ein bovines Perikardpatch, das unter anderem zum Verschluss des menschlichen Herzbeutels indiziert ist.

Während die bis zum jetzigen Zeitpunkt aufgetretenen und dargestellten Komplikationen mit Shelhigh No – React Produkten sich in klinischer Hinsicht ausschließlich auf heterotope Anwendungsgebiete wie zum Beispiel Klappen - oder Gefäßersatzbezüge bezogen, sind solche Komplikationen in den zu schildernden klinischen Fällen diesmal beim orthotopen Gebrauch beobachtet worden.

In Koblenz sind in der Herzchirurgie im dortigen Bundeswehrzentral Krankenhaus im Zeitraum von November 1998 bis Februar 2000 172 Patienten mit sogenannten No – React - Perikard-Patches zum Verschluss des Herzbeutels nach Operationen am Herzen oder herznahen, großen Gefäßen versorgt worden.

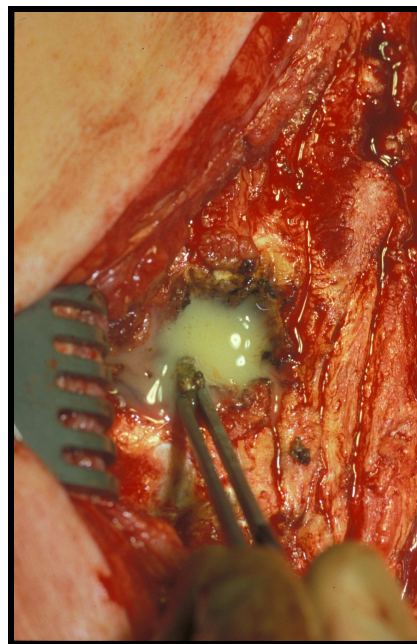
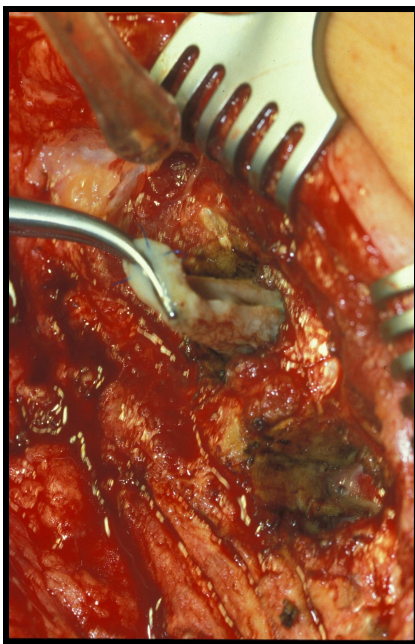
Nach Durchführung dieser Eingriffe wurden die verzögert auftretenden Komplikationen von Prof. Dr. Weinhold, Chefarzt der Herzchirurgie des Bundeswehrzentral Krankenhauses in Koblenz, und seinen Mitarbeitern beobachtet, dokumentiert und indizierte Revisionseingriffe absolviert. Zusätzlich wurden weitere Untersuchungen wie bildgebende Verfahren sowie laborchemische und mikrobiologische Examinierungen von Herrn Prof. Weinhold und seinem Team veranlasst, deren Ergebnisse gesammelt und zur Bearbeitung im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit zur Verfügung gestellt.

##### ➤ Komplikationen und weitere Behandlung:

Bei fünfzehn Patienten, die einem prozentualen Anteil von 8,7% aller 172 Patienten entsprechen, entwickelten sich nach anfänglicher, unauffälliger Wundheilungsphase Komplikationen, wobei postoperativ keine Dehiszenzen im Bereich des Sternums festgestellt werden konnten. Die ersten Symptome der sich darstellenden Beschwerden wurden drei Monate bis maximal fünfzehn Monate nach dem Ersteingriff klinisch apparent, im Mittel 7,96 Monate nach der Primäroperation. Es handelt sich also

im zeitlichen Bezug auf den primären, operativen Eingriff um spät auffällig werdende Komplikationen.

Bei allen fünfzehn Patienten zeigten sich im Verlauf des erwähnten Zeitraumes Entzündungsreaktionen mit enger, topographischer Beziehung zu dem in der Erstoperation implantierten Patch. Diese Entzündungsprozesse imponierten klinisch bei Diagnosestellung als Abszesse, die bei acht (53,3%) der fünfzehn Patienten sogar spontan zu einer Fistelbildung mit sich anschließender Perforation des Brustbeins und der Haut führten und so ihren Inhalt nach extrakorporal entleerten.



**Bilder 1+2: Intraoperative Aufnahmen während der Zweiteingriffe:**

Entfernung eines No – React – Perikardpatches (Bild 1, links) und Eröffnung einer parasternalen Abszeßhöhle (Bild 2, rechts) bei Patienten, die von den Spät komplikationen im Koblenzer Bundeswehrzentral Krankenhaus betroffen waren.

Die Verdachtsdiagnose einer Abszessbildung wurde größtenteils mittels bildgebender Verfahren (Röntgen – und CT – Thorax) verifiziert oder aufgrund des klaren, klinischen Bildes konstatiert.

Im Rahmen der chirurgischen Sanierung der Abszesse fiel bei allen Patienten eine Abszessbildung mit räumlicher Beziehung zum implantierten Patch auf.

Nach anfangs frustranen konservativen Therapieversuchen und auch unzureichender Rekonvaleszenz der Patienten nach Wunddebridement bzw. Fremdkörperentfernung von z. B. Drahtcerclagen, führte lediglich die komplette Entfernung des implantierten Patches zu einer kontinuierlichen und abschliessenden, sekundären Wundheilung.

Ein Patient wurde aufgrund einer Exazerbation seiner KHK-Beschwerden nach erfolgter Bypass-Operation in Koblenz in Kiel reoperiert, wobei die dortigen Chirurgen von einem „in trüber Flüssigkeit schwimmenden implantierten Patch“ berichteten. Eine kutane Fistelung hatte bei diesem Patienten wie bei weiteren sechs von den Komplikationen betroffenen Patienten nicht bestanden.

Bei einem Patienten entwickelten sich im Bereich des Perikard – Patches rezidivierende Perikard – und Pleuraergüsse, sodass wiederholte Pleurapunktionen notwendig wurden. Erst unter einer immunsuppressiven Therapie mit Cortison (10mg/24h) konnte die Symptomatik unterdrückt werden. Nach Reduktion der immunsuppressiven Therapie kam es erneut zur Progression der Symptomatik, es entwickelte sich zudem ein parasternaler Abszeß. Nach Entfernung des Patches konnte auch ohne Cortisonbehandlung keine Ergußbildung mehr festgestellt werden.

Tabelle 1: Übersicht über Klinik, Diagnostik, Therapie und Verlauf der von den Komplikationen betroffenen Patienten

Patient	Hautperforation	Diagnosesicherung	Erfolgte Therapie	Sekundäre Wundheilung
1	Ja	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Sofortige Patchentfernung	Nach Patchentfernung
2	Ja	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Erst: konservativ; Später: Entfernung Drahtcerclagen + Wunddebridement; ultima ratio: Patchentfernung; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
3	Nein	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Patchentfernung; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
4	Nein	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Patchentfernung; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
5	Nein	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Patchentfernung; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
6	Nein	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Entfernung Drahtcerclagen und Patch; Saug-Spül-	Nach Patchentfernung



			Drainage mit Gentamicin	
7	Ja	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Entfernung Drahtcerclagen und Patch; Entfernung Proc. Xyphoideus; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
8	Nein	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Entfernung Drahtcerclagen und Patch; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
9	Nein	CT-Thorax; Reoperation	Reoperation Bypass + Patchentfernung	Nach Patchentfernung
10	Ja	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Entfernung Drahtcerclagen und Patch; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
11	Nein	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Patchentfernung; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
12	Ja	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Entfernung Drahtcerclagen und Patch; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
13	Ja	. CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Entfernung Drahtcerclagen und Patch; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
14	Ja	. CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Entfernung Drahtcerclagen und Patch; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung
15	Ja	CT-Thorax; Rö.-Thorax; Klinik	Entfernung Drahtcerclagen und Patch; Saug-Spül-Drainage mit Gentamicin	Nach Patchentfernung

CT – Thorax = Computertomographie des Thorax

Rö – Thorax = Röntgenaufnahme des Thorax

➤ Mikrobiologische Untersuchungen:

Bei allen betroffenen Patienten wurden intraoperativ mehrere Abstriche zur mikrobiologischen Untersuchung angefertigt; außer bei einem Patienten wurde zusätzlich die Spülflüssigkeit der routinemäßig angelegten Saug-Spül-Drainagen

mikrobiologisch untersucht. Die mikrobiologischen Analysen ergaben folgende Ergebnisse:

Bei vier Patienten, bei denen es nicht zur spontanen Hautperforation gekommen war, waren alle intra – und postoperativen Abstrichuntersuchungen steril. Ein weiterer Patient wies trotz vorhandener Hautperforation ebenfalls sterile Wundverhältnisse auf.

Bei den übrigen Patienten waren im Schnitt mehr als 80% der jeweiligen Abstriche ohne Keimnachweis. Wenn sich Keime in vereinzelt Abstrichen nachweisen liessen, dann handelte es sich meist um Kokken oder Gram – negative Bakterien, die allesamt sehr günstige Resistenzmuster im Antibiogramm aufwiesen und die von den verantwortlichen Mikrobiologen in den allermeisten Fällen als Folge einer abgelaufenen, monatelangen offenen Wundbehandlung, in einem Fall als Kontamination beim Zweiteingriff und bei einem weiteren Patient als Verunreinigung bei der Abnahme eingestuft werden konnten.

Tabelle 2: Übersicht über die in Koblenz durchgeführten, mikrobiologischen Untersuchungen und Ergebnisse

Patient	Mikrobiologie (Abstriche bei Reoperation)
1	Intraoperativ Patch: Steril Intraoperativ Mediastinal: Steril Intraoperativ Mediastinal II: Spärlich koagulase negative Staphylokokken (Oxacillinsensibel)
2	01.2000: Intraoperativ Mediastinal: Steril 8.Postop. Tag Wundabstrich: mäßig Staph. Aureus; sensibel gegen getestete Antibiotika (AB) außer Cefixim 02.2000: Intraoperativ Mediastinal: Steril Intraoperativ Abszeß: Steril Intraoperativ Mediastinal II: Corynebakterium Species und Staph. Aureus, sensibel gegen getestete AB außer Cefixim 2., 5., 6. postoperativer Tag Spülflüssigkeit: Steril
3	Intraoperativ Mediastinal: Steril Intraoperativ Mediastinal II: Spärlich Proprionibacterium acnes 3., 5., 7. postoperativer Tag Spülflüssigkeit: Steril
4	Intraoperativ Mediastinal: Steril Intraoperativ Patch: Staph. epidermidis (nach Anreicherung) 5., 6. postoperativer Tag Spülflüssigkeit: Steril
5	Intraoperativ Patch: Steril Intraoperativ Mediastinal: Steril 5. postoperativer Tag Spülflüssigkeit: Steril
6	Intraoperativ Prästernal: Steril Intraoperativ Retrosternal: Steril Intraoperativ Patch: Steril 7., 8. postoperativer Tag Spülflüssigkeit: Steril
7	12.1999: Intraoperativer Wundabstrich: Steril

	<p>01.2000: Intraoperativer Wundabstrich: Staph. Auricularis (sensibel oder intermediär gegen getestete AB) + Enterokokkus faecalis + spärlich koagulasenegative Staph.</p> <p>04.2000: Intraoperativ Patch: Spärlich koagulasenegative Staph. (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ Patch II: Steril          Intraoperativ Mediastinal: Spärlich koagulasenegative Staph. (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ Mediastinal II: Spärlich koagulasenegative Staph. (Oxacillinsensibel)</p> <p>3. postoperativer Tag Spülflüssigkeit: Steril          4. postoperativer Tag Spülflüssigkeit: Spärlich Staph. epidermidis</p>
8	<p>Intraoperativ Patch: Steril          Intraoperativ Retrosternal: Steril          1., 3. postoperativer Tag Spülflüssigkeit: Steril</p>
9	Intraoperativer Direktabstrich: Steril
10	<p>Intraoperativ sternal: mäßig Staph. Aureus          Intraoperativ Mediastinal: Steril          Intraoperativ substernal: Steril          Intraoperativ Patch: Steril</p>
11	<p>Intraoperativ retrosternal: wenig Staph. Aureus (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ sternal: reichlich Staph. Aureus (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ Mediastinal: Steril</p>
12	<p>Intraoperativ sternal: Spärlich koagulasenegative Staphylokokken (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ retrosternal: Spärlich koagulasenegative Staphylokokken (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ Patch: Steril          Intraoperativ Retrosternal: Steril</p>
13	<p>Intraoperativ sternal: Spärlich Staph. Aureus (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ Mediastinal: Steril          Intraoperativ Patch: Steril          Intraoperativ Mediastinal II: Steril          Intraoperativ Retrosternal: Steril</p>
14	<p>Intraoperativ sternal: Spärlich koagulasenegative Staphylokokken (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ Patch: Spärlich koagulasenegative Staphylokokken (Oxacillinsensibel)          Intraoperativ Patch: Steril</p>
15	<p>Intraoperativ Prästernal: Steril          Intraoperativ Patch: Steril          Intraoperativ Mediastinal: Steril</p>

➤ Bestimmung von Procalcitonin (PCT):

Procalcitonin, das Prohormon des Calcitonins, differenziert zwischen infektiösen und nicht – infektiösen Entzündungsätiologien. PCT ist nicht oder nur gering erhöht bei viralen oder chronischen Entzündungen.

Die Synthese und Freisetzung von PCT wird im Wesentlichen durch bakterielle Endotoxine, in geringem Umfang auch von Pilzen und Parasiten induziert.

Werte unter 0,5 ng/ml gelten als nicht erhöht, Konzentrationen zwischen 0,5 und 2,0 als gering erhöht. Von einer mäßigen Erhöhung an PCT spricht man bei Werten > 2,0 und < 10 ng/ml. Darüberliegende Mengen werden als stark erhöht bezeichnet [124, 125, 126].

Bei 13 der 15 von den Spät komplikationen betroffenen Patienten wurden deren Blutproben vor den Reoperationen zur Entfernung der Patches auf Procalcitonin untersucht.

Bei allen 13 Patienten konnten PCT – Konzentrationen ermittelt werden, die unter 0,5 ng/ml lagen.

➤ **Mikroskopisch – pathologische Beurteilung der entnommenen Patches:**

Die im Rahmen der operativen Revision entfernten Patchstücke wurden in der pathologischen Abteilung des Koblenzer Bundeswehrzentralkrankenhauses untersucht und wie folgt beschrieben:

Zu erkennen war stets straffes, parallelfaseriges Bindegewebe mit unterschiedlich starken Gefäßproliferaten im Patch und häufig starker Zellinfiltration. Die Patches waren je nach Ausprägung der entzündlichen Reaktion regressiv verändert, von Fibrinpräzipitaten bedeckt und von Makrophagen infiltriert.

Bei drei Patienten fielen Granulome auf, die bei einem Patienten um Fadenreste herum entstanden waren. Bei einem anderen Patienten ließen sich bei den Granulomen keine Riesenzellen vom Fremdkörpertyp und auch kein Fremdmaterial nachweisen. Beim dritten Patienten fanden sich Fremdkörpergranulome mit zentraler Nekrose und geringer Phagozytoseaktivität. Bei diesem Patienten gehen die Pathologen von der Anwesenheit eines löslichen, eingebrachten Fremdmaterials aus.

## *2.2 Mögliche Ätiologien der Komplikationen:*

Für die Entwicklung der beschriebenen, Patch – assoziierten Abszessbildungen kommen drei theoretisch denkbare Auslösemechanismen in Betracht:

### **2.2.1 Toxische Reaktion auf Fremdkörper:**

Erstens kann es sich bei der Entstehung der Nebenwirkungen um eine Reaktion auf mit dem Patch übertragene, toxische Stoffe handeln. Zu diesen Toxoiden zählen zum Beispiel Glutaraldehyd oder Benzylalkohol, die während der Präparation und Lagerung der Patches zur Anwendung kommen. Im Falle, dass nach der Benutzung der

potentiell giftigen Substanzen nicht oder nur ein unzureichendes Auswaschen dieser Stoffe in den obligatorischen Reinigungsschritten erfolgt, könnten im Implantatgewebe zurückgebliebene toxische Moleküle zu einer Fremdkörperreaktion führen.

#### 2.2.2 Bakterielle Infektion:

Zweitens liegt aufgrund der Beschreibungen der Krankheitsverläufe der von den Komplikationen betroffenen Patienten eine mikrobielle Infektion des Operationsgebietes nahe. Dies würde bedeuten, dass es in 8,7% der operierten Fälle zu einer primären, iatrogenen Kontamination im Bereich des Eingriffsfeldes gekommen ist mit einer durch Bakterien verursachten, abszedierenden Entzündungsreaktion.

#### 2.2.3 Xenogene Abstoßungsreaktion:

Aufgrund der Implantation eines xenogenen, also von einer anderen Spezies stammenden Materials in den menschlichen Organismus muss neben den o. g. Hypothesen auch die Entwicklung einer immunologischen Reaktion im Rahmen einer xenogenen Abstoßung in Betracht gezogen werden, die ihren Ursprung in der Interaktion zwischen Antikörpern der Patienten und noch vorhandenen Antigenen auf dem bovinen Patch findet.

Ziel unserer Untersuchung war aus diesem Grund, Aufschluss über den Entstehungsmechanismus der Spätkomplikationen zu erlangen und eine xenogene Abstoßungsreaktion nachzuweisen oder auszuschließen.

### 3. MATERIAL UND METHODEN:

#### *Versuchsaufbau:*

Um die Fragestellung der Arbeit näher zu beleuchten, ist folgender Versuchsaufbau gewählt worden:

#### Gewinnung von humanem Serum und mononukleärem Zellkonzentrat (MNK):

Im Laufe der Experimente wurden zehn freiwilligen Spendern ( $n = 10$ ) jeweils 100 – 150 ml Blut abgenommen. Dieser und alle folgenden Arbeitsschritte zur Gewinnung von Serum und mononukleären Zellen wurden unter der Beachtung der Sterilität des Blutes und seiner Bestandteile vollzogen. Das solchermaßen gewonnene Blut wurde sofort für den sich anschließenden Versuchsansatz aufbereitet und verwendet. Aus dem Blut wurden zum einen mononukleäres Zellkonzentrat (MNK) und zum anderen Serum isoliert.

Mit dem heparinisierten Blut, das der Gewinnung des MNK diene, wurden zu je gleichem Volumen Vollblut (5ml) 4 ml Ficoll mit einer Dichte von 1,077 (Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg, Deutschland) in 8 - 10 Polypropylen – Röhren (PPN – Röhren) überschichtet. Diese PPN – Röhren weisen gegenüber konventionellen Versuchsröhren den Vorteil auf, dass sie an den Behälterwänden keine Adhäsion von Zellen und damit auch keinen Zellverlust während der Versuchsdurchführung zulassen (PP – Tube 14 ml steril; Greiner Bio – One, Frickenhausen, Deutschland). Die PPN – Röhren wurden anschließend bei 2700 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 20 min zentrifugiert (Rotanta S – Zentrifuge; Fa. Hettich, Bäch, Schweiz). Die dadurch zwischen Plasma und Ficoll - Lösung entstehenden Interphasenringe, die das MNK bestehend aus Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen beinhalten, wurden mit Hilfe von Pasteurpipetten abpipettiert und in 50 ml – PPN – Röhren (BlueMax PPN – Conical Tube; Becton Dickinson Company, Heidelberg, Deutschland) gesammelt. Die restlichen Blutzellen, respektive Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten bilden aufgrund ihres höheren spezifischen Gewichtes den Bodensatz. Das 50 ml PPN – Röhren wurde bei 1700 – 1800 U/min für 10 min zentrifugiert, um ein Absetzen des MNK von Plasma - und Ficollresten zu erreichen. Nach Abgiessen des entstandenen Überstandes folgte der Waschschrift des MNK durch Resuspension in RPMI (Roswell Park Memorial Institute VLE RPMI 1640 Medium; Biochrom AG, Seromed, Berlin), die Zentrifugation bei 1400 – 1500 U/min für 10 min und anschließend das Verwerfen der Waschlösung. Diese Schritte wurden 2 – 3 mal wiederholt, um ein möglichst reines

MNK zu isolieren. Danach erfolgte die Zellzahlbestimmung im MNK (Coulter Ac T; Beckman). Zuletzt wurden die mononukleären Zellen mit einer definierten Menge RPMI verdünnt, sodass sich eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml einstellte.

Die restlichen 100 ml humanen Vollblutes wurden direkt nach Entnahme auf Serumröhrchen (Greiner Bio – One, Stuttgart, Deutschland) verteilt. Nach 30 – 45 min Gerinnungszeit wurden die aus Serum bestehenden Überstände in einem 50 ml PPN – Röhrchen gesammelt. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 3000 U/min für 15 min an, um noch vorhandene Zellbestandteile des Blutes vom Serum zu separieren. Eine zusätzliche Reinigung des Serums gewährleistete die Filtration durch einen sterilen Filter (Millex® - GP; 0,22 µm Filter Unit, Bedford USA).

#### Blutausstriche:

Ein Tropfen des Blutes der jeweiligen Probanden wurde dazu verwendet, Blutausstriche auf Objektträgern anzufertigen. Die Ausstriche wurden bei 40facher Vergrößerung unter dem Mikroskop untersucht, um ein Differentialblutbild erstellen zu können und so eine Aussage über die Zellverteilung zu erhalten.

#### Vitalitätsbestimmung:

Nach der Separierung der gewonnenen, mononukleären Zellen wurden mittels Vitalfärbungen Vitalitätsüberprüfungen vorgenommen. Als Farbstoff wurde Trypan – Blau verwendet. Trypan – Blau kann bei intakter Zellmembran nicht ins Zellinnere vordringen. Sind die Zellwände geschädigt, färbt sich das Zytoplasma blau. Somit konnte mit dieser Methode die Vitalität der Zellen bestimmt werden.

#### Patchmaterial:

Es wurden im Verlauf der Versuche Patches zweier verschiedener Hersteller miteinander verglichen. Dabei handelte es sich einerseits um das zu untersuchende No – React Patch der Firma Shelhigh und um ein Vergleichspatch der Firma Synovis (Synovis Life Technologies, Inc.; St. Paul, Minnesota, USA) namens Periguard. Dieses Patch ist ebenfalls ein bovines Patch, das unter anderem zum Verschluss von Herzbeuteldefekten indiziert ist. Es wird nach einem patentierten Verfahren mit dem Namen „Apex Processing™“ hergestellt, das ähnlich wie der No – React Vorbehandlungsprozess die Biokompatibilität, Haltbarkeit nach Implantation und folglich die Sicherheit des Produktes deutlich erhöhen soll. Eine Kalzifizierung des

Materials im Körper des Patienten wird durch das „Apex Processing™“ verhindert [127]. Nahtlöcher nach chirurgischer Anbringung des Patches werden leckfrei durch das Implantatgewebe umschlossen. Nach eigenen Angaben von Synovis sind nach kardialer und thorakaler Anwendung von ungefähr 100.000 bovinen Periguardprodukten in nur 0,07% der Fälle den erwähnten Vorteilen gegenteilige Erfahrungen gemacht worden [128, 129]. Dies liegt nicht zuletzt an der laut Hersteller außergewöhnlich niedrigen Konzentration an Glutaraldehydmolekülen im Periguardgewebe nach Beendigung der Vorbehandlung.

#### Präparation der Patches:

Die beiden Patches der verschiedenen Firmen wurden vor der Versuchsdurchführung zwei Waschschritten unterzogen. Die Waschschrritte wurden in jeweils zwei Petrischalen (Cellstar – Gewebekulturschalen 100/20 mm steril; Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt, die mit 0,9%iger, isotoner, steriler Kochsalzlösung (NaCl isotone Kochsalzlösung 0,9%; B. Braun Melsungen) gefüllt wurden. Nach Baden der jeweiligen Patches für 2 – 5 min in der ersten Petrischale, wurden sie unter sterilen Bedingungen in die zweite Schale gebracht. Dort erfolgte das Zuschneiden der Patches in mehrere, kleine Stücke mit einer Fläche von 0,25 cm<sup>2</sup>. Das Zuschneiden des Perikards geschah mittels steriler Skalpelle (Feather Disposable Scalpel; Feather Safety Razor Co, LTD; Osaka, Japan).

#### Seruminaktivierung:

Die Hälfte des aus dem Blut der Versuchspersonen isolierten Serums wurde mit dem Ziel der Denaturierung des Komplementsystems inaktiviert. Die Inaktivierung erfolgte in einem Wasserbad (Thermed 5001 electronic; Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, Deutschland) bei konstanten 56°C für 30 min unter kontinuierlicher Temperaturkontrolle.

#### Versuchsansätze:

Aus den gewonnenen bzw. hergestellten Materialien (s. o.) wurden anschließend Suspensionen in PPN – Röhrchen (Polypropylen – Röhrchen 5 ml; 12,0/75 MM steril; Greiner Bio – One, Stuttgart, Deutschland) angefertigt. Diese Suspensionen beinhalten die unterschiedlichen Proben (MNK, Patches, RPMI 5%, normales Serum, Komplement - depletiertes Serum) in folgenden Kombinationen:



Kulturmedien:

Im ersten Versuchsansatz diente RPMI als Kulturmedium. Dem RPMI (500 ml) wurden vor Beginn der Versuchsdurchführung 2ml Gentamicin 80 als Antibiotikum hinzugefügt, um eine Widerstandsfähigkeit der angefertigten Suspensionen gegen bakterielle Besiedlung zu erzielen. Dem Nährmedium wurde anteilig unbehandeltes Serum jedes Probanden hinzugegeben, sodass sich in dieser Lösung ein Serumanteil von 5% einstellte (RPMI mit 5%igem, normalem Serum).

Im zweiten Ansatz wurde normales Serum ohne Komplementdepletion (im Weiteren als normales Serum bezeichnet) als Kulturmedium eingesetzt.

Für den dritten Versuchsansatz wurde das Serum als Kulturmedium verwendet, dessen Komplement durch die Denaturierung im Wasserbad inaktiviert wurde (inaktiviertes Serum genannt).

Es ergeben sich somit die folgenden Ansätze, auf denen die weitere Versuchsausführung aufbaut:

- (RPMI + %5iges normales Serum)
- Normales Serum
- Inaktiviertes Serum

Verteilung des MNK und der Patches (Teilansätze):

Den solchermaßen angefertigten Grundsuspensionen wurde wiederum für jede Versuchsperson im ersten Teilansatz kein Patchstück hinzugefügt; dieser Ansatz stellte die Kontrolle der Versuche dar und beinhaltete das jeweilige Kulturmedium und das MNK eines jeden Spenders ohne Patch. Alle Versuchsreihen wurden autolog durchgeführt; das heißt, dass nur MNK und Seren bzw. Serumsanteile derselben Versuchsperson in dem entsprechenden Versuchsansatz miteinander inkubiert wurden.

#### 1. Kontrolle: Kulturmedium + MNK

Bei den folgenden Ansätzen bildete die Kombination aus einem jeweiligen Kulturmedium und dem MNK der einzelnen Probanden die Basis der zu

untersuchenden Lösungen. Ihnen wurden entweder ein No – React Patch oder ein Periguard Patch zugegeben.

2. Kulturmedium + MNK + No – React
3. Kulturmedium + MNK + Periguard

Im einzelnen ergaben sich folgende Ansätze, die in den Tabellen 3 - 5 schematisch zusammengefasst sind:

Tabelle 3: Übersicht über die Suspensionen mit Nährmedium und 5%igem Serumanteil

Kulturmedium RPMI 5%
➤ RPMI 5% + MNK (Kontrolle)
➤ RPMI 5% + MNK + No - React
➤ RPMI 5% + MNK + Periguard

Tabelle 4: Übersicht über Suspensionen mit 100%igem Serum

Kulturmedium normales Serum
➤ Serum + MNK (Kontrolle)
➤ Serum + MNK + No - React
➤ Serum + MNK + Periguard

Tabelle 5: Übersicht über Suspensionen mit inaktivem Serum

Kulturmedium Serum inaktiv
➤ Inakt. Serum + MNK (Kontrolle)
➤ Inakt. Serum + MNK + No - React
➤ Inakt. Serum + MNK + Periguard

Dazu kamen noch Negativkontrollen, die aus den einzelnen Medien zur Kultur und Patches bestanden. Ihnen wurde kein mononukleäres Zellkonzentrat hinzugegeben.

### 3.2 Versuchsdurchführung:

#### 3.2.1 Inkubation und zeitlicher Versuchsverlauf:

Die oben dargestellten und in jeweils 5 ml PPN – Röhrchen gesammelten Ansätze wurden nach Fertigstellung im Brutschrank inkubiert (Cytoperm 2; Heraeus Instruments GmbH & Co. KG, Osterode, Deutschland). Der Inkubator war für die gesamte Dauer der Versuchszeit auf eine Temperatur von 37°C eingestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit im Brutschrank betrug 94% bei einem Sauerstoffanteil von 21% unter ständiger Zufuhr von 5% Kohlendioxid.

Die Zeitspanne der Inkubation der Suspensionen betrug fünf Versuchstage. Die in den Tabellen 3 – 5 verdeutlichten Ansätze wurden für jeden Probanden in jeweils dreifacher Ausführung bereitet, sodass zu Beginn der Inkubation 27 Teilansätze pro Versuchsperson zur Verfügung standen.

An den gewählten Versuchstagen 1, 3 und 5 erfolgte die weitere Untersuchung der jeweils neun verschiedenen Teilansätze.

#### 3.2.2 Aufbereitung der Proben:

Am Versuchstag 1, der dem ersten Tag nach der Herstellung der Ansätze und nach der Inkubation der Versuchssuspensionen entsprach, wurden die Proben resuspendiert und in Eppendorf – Reaktionsgefäße umgefüllt. Die Patches aus den Testansätzen wurden nach Resuspendierung für die histologische Aufbereitung vorbereitet (s. 3.2.4). Die Eppendorf – Gefäße samt Inhalt wurden bei 8000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Der so entstandene Überstand der Suspensionen wurde jeweils mit Hilfe von Eppendorf – Pipetten (Eppendorf – Reference; 200 µl – Pipette; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und den zugehörigen Eppendorf – Pipettenspitzen vorsichtig abgenommen. Pro Versuchsperson und Teilansatz konnten auf diese Weise zwischen 300 und 400 µl Überstand gewonnen werden. Dieser wurde in Gefrier Röhrchen (Nunc Cryo - Tubes™ - Vials; Nalge Nunc International; Denmark) transferiert und im Anschluss in einem Gefrierschrank (Colora UF 85 – 460 T; Messtechnik GmbH; Lorch, Deutschland) bei minus 70°C konserviert.

### 3.2.3 Vorbereitung der Patches für die Histologie:

Die an den unterschiedlichen Versuchstagen aus den Probenröhrchen entnommenen Patches wurden jeweils in gegitterte Plastik Kästchen gebracht. Nach Beschriftung der Kästchen wurden sie in einem Sammelbehälter in 4%igem Paraformaldehyd für mindestens 24 bis höchstens 48 Stunden fixiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die Patches für 1h in Wasser gewaschen und nachfolgend in 70%igem Äthanol gelagert, bevor sie dann die weitere histologische Aufarbeitung durchliefen.

### 3.2.4 Histologie:

Nach der Entnahme der Patches aus dem 70%igen Äthanol wurden sie in Paraffin eingebettet. Anschließend erfolgte der Ausguß der Patches und das Schneiden der Präparate auf eine Dicke von 2 – 4 µm. Im nächsten Schritt wurde den Patches das Paraffin wieder entzogen. Dieses Entparaffinieren wurde realisiert, indem die Perikardpräparate zunächst für 2 x 15 min in Xylol 1 eingelegt und danach in absteigender Reihe in 100%igem, 96%igem und 70%igem Alkohol für einen Zeitraum von jeweils 5 min gebadet wurden. Nach der absteigenden Reihe folgte eine aufsteigende Reihe. Die Perikardpatches wurden also in 70%igem, 96%igem (diesmal je 3 min) und 100%igem Alkohol (5 min) aufbewahrt. Abschließend wurden sie noch einmal für 10 min in Xylol 1 gelagert.

Nach Beendigung dieses Schrittes folgte die Färbung der Patches mit Hämatoxylin – Eosin (HE). Dazu wurden sie mit destilliertem Wasser gespült und 20 – 30 Sekunden in Hämalaun aufbewahrt. Auf den folgenden 10 - minütigen Wässerungsvorgang wurden die Patches für 10 min in Eosin eingelegt und im Anschluß daran wieder gewässert (3 min). Abschließend wurden die angefertigten Präparate in Eukit gegossen.

### 3.2.5 Immunhistochemie:

Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen der Patches wurden drei verschiedene Färbungen durchgeführt. Dabei handelte es sich um die Anfärbung des „Membrane Attack Complex“ aus den Komplementkomponenten C5b – 9, des Komplementfaktors C3c und der Immunglobuline IgM, IgG und IgA.

Die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen der Patches enthielt die folgenden Arbeitsschritte in chronologischer Reihenfolge:

## 1. Allgemeine Vorbereitung:

- Blockade der endogenen Peroxidase in einer Lösung aus Methanol und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 60:1 (10 min)
- Spülen der Patches in 0,05%igem PBS Tween (Natriumpuffer) für 10 min
- Vorbehandlung der Patches in Pronase E – Lösung (150 ml Puffer, 150 µl Pronase E) für 15 min
- Spülen der Patches in PBS Tween

## 2. Anfärben der nachzuweisenden Bestandteile:

### ➤ MAC:

Für den Nachweis des MAC wurden die Patches mit Anti - C5b – 9 - Antikörper (Mouse – Anti – Human; 1:25) für 60 min inkubiert. Es folgte das Spülen der Patches in PBS Tween. Der nächste Schritt bestand in der Inkubation der Patches mit Anti - Mouse – HRP (1:50) für 30 min.

### ➤ C3c:

Die Patches wurden im ersten Schritt mit 1:100 verdünntem Anti – C3c – Antikörper (Rabbit – Anti – Human; 1:100) für 60 min inkubiert und anschließend in PBS Tween gewaschen. Der zweite Schritt beinhaltete die Inkubation der Patches mit Anti – Rabbit – HRP (1:50) für 30 min.

### ➤ IgM, IgG, IgA:

Die Patches wurden mit einer Lösung inkubiert, die gegen die Immunglobuline IgM, IgG, IgA gerichtet war. Die Inkubation wurde 60 min lang mit einer 1:100 verdünnten Lösung durchgeführt. Anschließend wurde als zweiter Antikörper Anti – Rabbit – HRP (1:50) für 30 min verwendet.

Für alle Färbungen schlossen sich die folgenden Arbeitsschritte zur Komplettierung der Immunhistochemie an:

- Spülen der Patches in PBS Tween
- Anfärben der Antigen – Antikörper – Komplexe mit Chromogen (15 – 20 min)

- Spülen der Patches in PBS Tween
- Färbung mit Hämalaun (10 Sekunden)
- 10minütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser
- Spülen mit Aqua destillata
- Eindeckeln der Präparate mit Ultramount

### 3.2.6 Zytokinbestimmung (ELISA):

Die verwendeten ELISA – Testkits (Bender MedSystems™; Wien, Österreich) basieren auf der „Sandwich“ – Enzym – Immunassay – Technik, bei der der zu bestimmende Parameter quantitativ ermittelt wird.

Anhand des ELISA wurden nach Beendigung der insgesamt sechs Tage dauernden Versuchsreihen Bestimmungen der Zytokine IL – 6 und TNF  $\alpha$  in den gesammelten Überständen durchgeführt. Dazu wurden die im Gefrierschrank eingefrorenen Überstände entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die einzelnen Schritte zur Quantifizierung der humanen Zytokine mittels des ELISA wurden der Gebrauchsanweisung entsprechend vollzogen.

### 3.3 Statistik:

Aufgrund der statistisch gesehen, geringen Fallzahlen ( $n = 10$ ) kamen in dieser Arbeit nur vergleichsweise basale statistische Begriffe zur Anwendung, da der Gültigkeitsbereich der meisten statistischen Tests hier unterschritten wurde [130].

Bei den in den Diagrammen dargestellten Meßwerten handelt es sich um die Mediane, die aus den Ergebnissen der einzelnen Probanden ( $n = 10$ ) bestimmt wurden. Als Maß für die Streuung, die sich hinter dem Median verbirgt, wurde die Standardabweichung des Medians herangezogen.

Um die Frage der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen und – suspensionen zu klären, wurde eine Varianzanalyse für verbundene Stichproben nach Friedman (Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks) durchgeführt. Zur Differenzierung auftretender Signifikanzen wurden die Versuchsgruppen oder - suspensionen paarweise dem Student – Newman – Keuls – Test unterzogen (Pairwise Multiple Comparison Procedure).

#### 4. ERGEBNISSE:

In den graphischen Abbildungen dargestellt sind jeweils die Mediane, die aus den Zytokinwerten der Probandenproben für die jeweiligen Versuchstage und -suspensionen ermittelt wurden zuzüglich der zugehörigen Standardabweichungen. Alle angefertigten und für die Tests verwendeten Suspensionen waren über den gesamten Versuchszeitraum steril und unauffällig.

##### 4.1 Interleukin – 6 Bestimmung:

###### 4.1.1 Versuchstag 1:

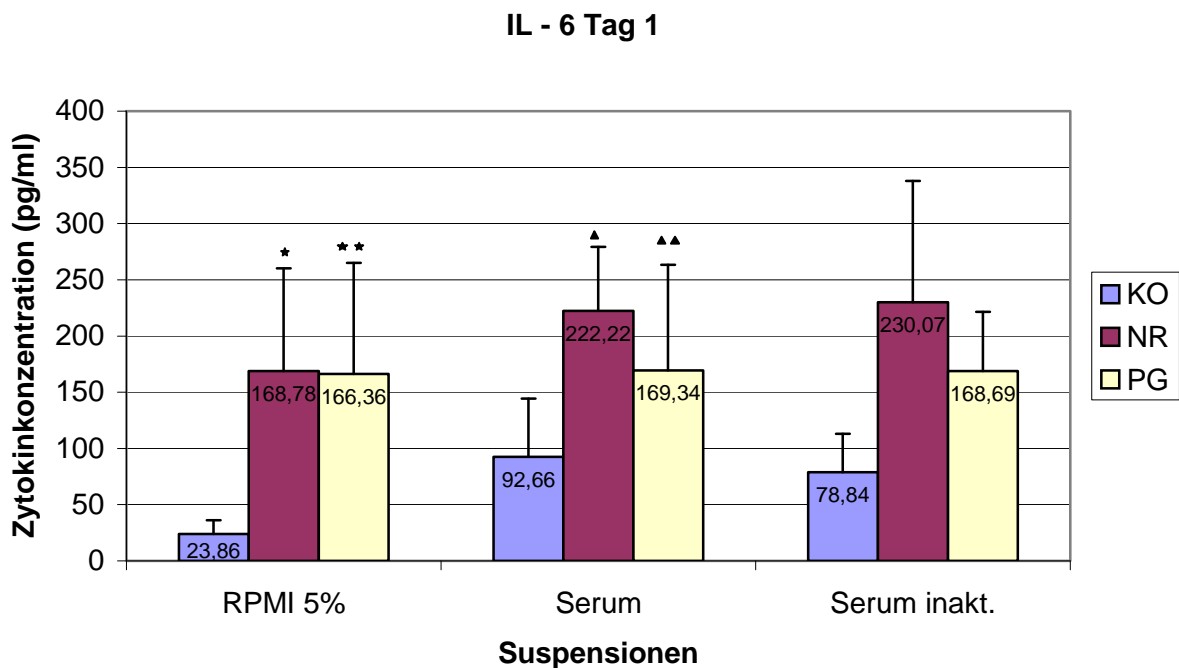


Abbildung 1: IL – 6 – Bestimmung (in Picogramm/ml) an Versuchstag 1 in den Gruppen Kontrolle (KO; blaue Säulen), No – React (NR; rote Säulen) und Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Suspensionen RPMI 5%, Normalserum und inaktives Serum

★ : NR zur Kontrolle:  $p = ,003$                       ▲ : NR/KO:  $p < ,05$   
★★ : PG zur Kontrolle:  $p = ,003$                       ▲▲ : PG/KO:  $p < ,05$

**An Tag 1** der Versuchsreihe läßt sich für die Interleukin – 6 Produktion der MNK Folgendes feststellen:

➤ Ergebnisse innerhalb der Suspensionen:

Die IL - 6 Werte in den Patchgruppen liegen in allen Versuchssuspensionen deutlich über den Werten der Kontrollen. Im RPMI 5% und im Normalserum sind die Zytokinkonzentrationen sowohl in der No – React - als auch Periguard – Gruppe gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich. Untereinander weisen No – React und Periguard im RPMI 5% und normalen Serum keine signifikanten Unterschiede auf.

Im inaktiven Serum lassen sich beim Vergleich von Kontrolle, No – React und Periguard miteinander keine statistisch verifizierbaren Differenzen feststellen.

➤ Vergleich der Suspensionen untereinander:

Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen beim Vergleich der Suspensionen miteinander finden sich nur im Hinblick auf die Kontrollen. Die Zytokinmengen in den Kontrollen des Normalserums und des inaktiven Serums liegen signifikant höher als in der Kontrolle des RPMI 5%.

Weder die No – React – Werte der verschiedenen Kulturmedien noch die der Periguard – Gruppe zeigen signifikante Differenzen.



4.1.2 Versuchstag 3:

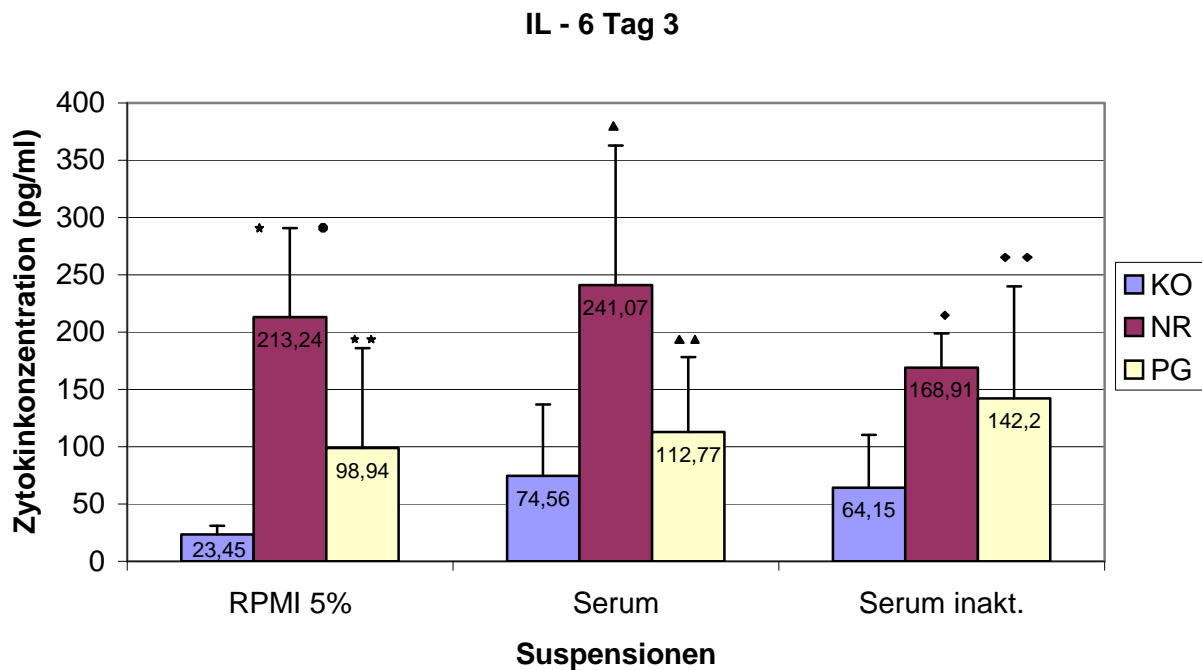


Abbildung 2: IL – 6 – Bestimmung (in Picogramm/ml) an Versuchstag 3 in den Gruppen Kontrolle (KO; blaue Säulen), No – React (NR; rote Säulen) und Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Suspensionen RPMI 5%, Normalserum und inaktives Serum

- ★ : NR/KO:  $p < ,05$
- ★★ : PG/KO:  $p < ,05$
- : NR/PG:  $p < ,05$
- ▲ : NR/KO:  $p = ,012$
- ▲▲ : PG/KO:  $p = ,015$
- ◆ : NR/KO:  $p < ,05$
- ◆◆ : PG/KO:  $p < ,05$

➤ Ergebnisse innerhalb der Suspensionen:

Auch am **Versuchstag 3** liegt die IL – 6 - Zytokinproduktion in den Patchgruppen in allen Suspensionen höher als in der Kontrolle.

Im RPMI 5% reagieren alle Gruppen unterschiedlich. Die beiden Patchgruppen produzieren eine signifikant höhere IL – 6 – Konzentration als die zugehörige Kontrolle. Zusätzlich ist die Differenz der Zytokinmengen beider Patchgruppen zugunsten einer höheren Konzentration im No – React signifikant.

Im normalen Serum setzt sich die No – React – Gruppe deutlich von der Kontrolle und der Periguard – Gruppe ab. Beide letztgenannten Gruppen unterscheiden sich nicht.

Im inaktiven Serum zeigen beide Patchgruppen gegenüber der Kontrolle eine signifikant erhöhte IL – 6 – Synthese, während No – React und Periguard untereinander nicht unterschiedlich sind.

➤ Vergleich der Suspensionen untereinander:

Die Kontrollgruppen der einzelnen Suspensionen weisen für die Bestimmung der IL – 6 – Konzentrationen keine Unterschiede auf. Ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich sind die Mengen an IL – 6 jeweils in den Patchgruppen No – React und Periguard.

#### 4.1.3 Versuchstag 5:

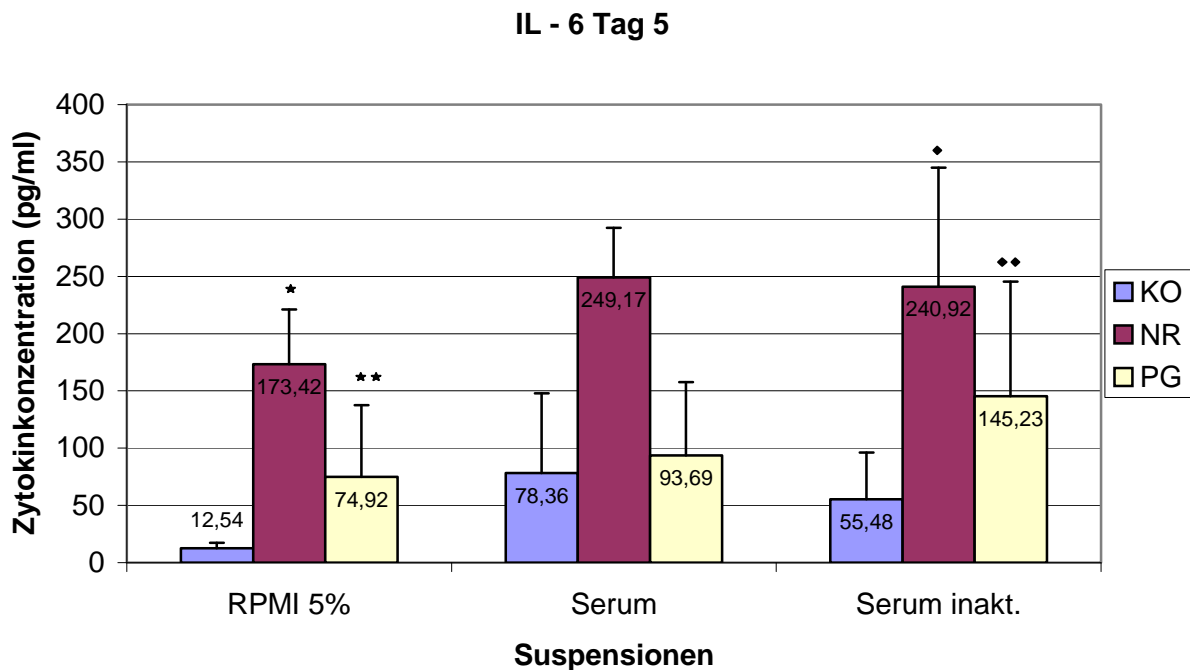


Abbildung 3: IL – 6 – Bestimmung (in Picogramm/ml) an Versuchstag 5 in den Gruppen Kontrolle (KO; blaue Säulen), No – React (NR; rote Säulen) und Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Suspensionen RPMI 5%, Normalserum und inaktives Serum

★ : NR/KO: p = ,001  
 ★★ : PG/KO: p = ,011

♦ : NR/KO: p = ,029  
 ♦♦ : KO/PG: p = ,029

➤ Ergebnisse innerhalb der Suspensionen:

Wiederum in allen Suspensionen weisen am **Versuchstag 5** die Patchgruppen höhere Werte auf als die Kontrollgruppen.

Im RPMI 5% produzieren die mononukleären Zellen in beiden Patchgruppen signifikant höhere Werte als das MNK in der Kontrollgruppe. Dabei besteht zwischen der IL – 6 – Synthese der No – React – Gruppe und der des Periguards kein Unterschied.

Im normalen Serum finden sich zwischen den Gruppen keinerlei Differenzen in der Zytokinproduktion.

Im inaktiven Serum dagegen fallen wieder IL – 6 – Werte auf, die in den Patchgruppen ein klar höheres Niveau erreichen als in der Kontrolle.

Untereinander zeigen die Patchgruppen allerdings statistisch gesehen keine Differenz.

➤ Vergleich der Suspensionen untereinander:

Bezüglich der Kontrollgruppen bestehen klare Unterschiede zwischen normalem Serum und RPMI 5% einerseits und inaktivem Serum und RPMI 5% andererseits. Im Serum und im inaktivem Serum erreichen die Kontrollen ein auf die IL – 6 – Konzentration bezogen gleiches Zytokinniveau.

Weder für No – React noch für Periguard lassen sich deutliche Differenzen in den verschiedenen Suspensionen aufdecken.

#### 4.1.4 Signifikanzen:

Normalserum		Tag1	Tag3	Tag5
	Periguard	-	+	-
	Kontrolle	+	+	-
Inaktives Serum				
	Periguard	-	-	-
	Kontrolle	-	+	+

Tabelle 6: Übersicht über die signifikanten IL – 6 - Unterschiede beim Vergleich von No – React mit den Vergleichssuspensionen Periguard bzw. Kontrolle im Normal – und inaktiven Serum an den Versuchstagen 1, 3 und 5

+ = No – React signifikant höher als Vergleichssuspension  
- = keine Signifikanz zwischen No – React und Vergleichssuspension

## 4.2 TNF $\alpha$ – Bestimmung:

### 4.2.1 Versuchstag 1:

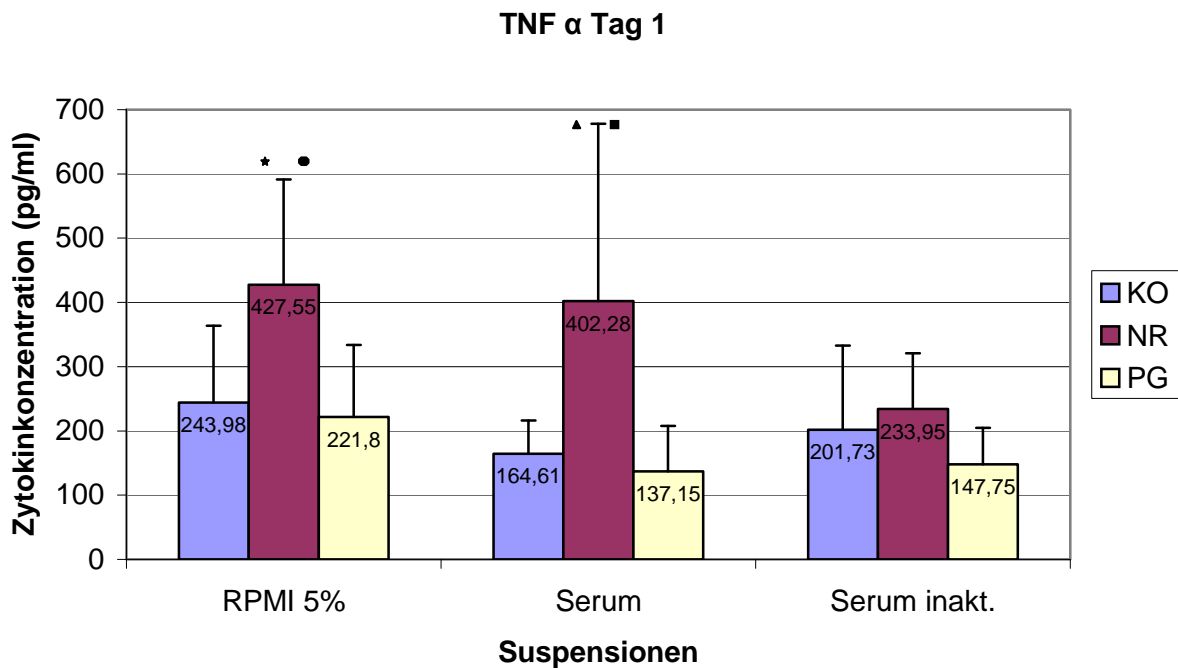


Abbildung 4: TNF  $\alpha$  – Bestimmung (in Picogramm/ml) an Versuchstag 1 in den Gruppen Kontrolle (KO; blaue Säulen), No – React (NR; rote Säulen) und Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Suspensionen RPMI 5%, Normalserum und inaktives Serum

★ : NR/KO:  $p = ,005$

● : NR/PG:  $p = ,009$

▲ : NR/KO:  $p = ,009$

■ : NR/PG:  $p = ,011$

#### ➤ Ergebnisse innerhalb der Suspensionen:

Die höchsten Konzentrationen an TNF  $\alpha$  können an **Tag 1** in allen Versuchssuspensionen in der No – React - Gruppe gefunden werden. Im RPMI 5% veranlaßt das No – React – Patch in seiner Gruppe eine eindeutig höhere Produktion an TNF  $\alpha$  als in der Kontrolle oder in der Periguard – Gruppe. Periguard und Kontrolle unterscheiden sich nicht. Im Normalserum bietet sich das gleiche Bild wie im RPMI 5%. Die TNF  $\alpha$  – Konzentrationen liegen im No – React signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen, die wiederum wertemäßig nicht differieren. Die Abwesenheit von Komplement führt dazu, dass die TNF  $\alpha$  – Konzentration auf Kontrollniveau reduziert wird.

- Vergleich der Suspensionen untereinander:

Wenn man die Entwicklung der TNF  $\alpha$  – Konzentration in der Kontrolle an Versuchstag 1 in den verschiedenen Kulturmedien beobachtet, so lassen sich für die TNF  $\alpha$  – Produktion zwischen den Suspensionen keine Unterschiede herausfinden.

Auch zeigt die Zytokinsynthese in den Patchgruppen im Vergleich von RPMI 5%, Normalserum und inaktivem Serum keine signifikante Varianz. Der in Abbildung 4 zwischen normalem und inaktivem Serum in der No – React – Gruppe deutlich zu erkennende TNF  $\alpha$  – Abfall entgeht mit  $p = 0,06$  knapp einer Signifikanz.

#### 4.2.2 Versuchstag 3:

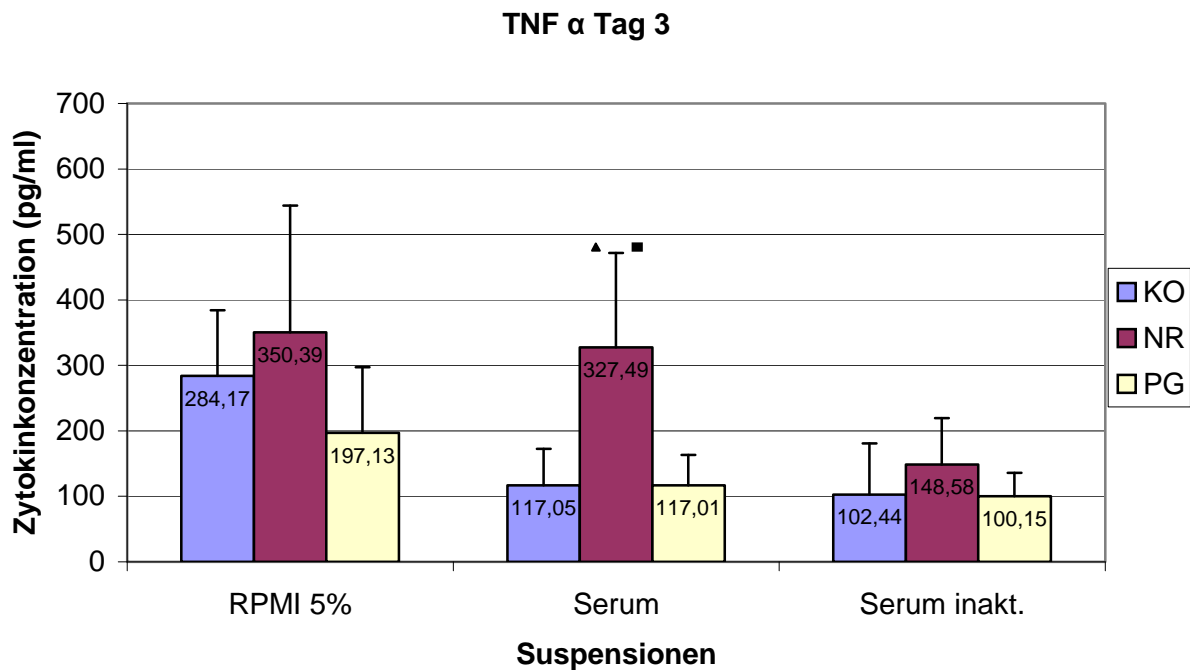


Abbildung 5: TNF  $\alpha$  – Bestimmung (in Picogramm/ml) an Versuchstag 3 in den Gruppen Kontrolle (KO; blaue Säulen), No – React (NR; rote Säulen) und Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Suspensionen RPMI 5%, Normalserum und inaktives Serum

▲ : NR/KO:  $p < ,05$

■ : NR/PG:  $p < ,05$

➤ Ergebnisse innerhalb der Suspensionen:

Auch an **Tag 3** der TNF  $\alpha$  – Messung bildet die No – React – Gruppe in allen Suspensionen die höchste Fraktion.

Im RPMI 5% besteht beim Vergleich der Zytokinmengen der einzelnen Gruppen keine Signifikanz.

Im normalen Serum zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen der No – React – Gruppe und der Kontrolle zum einen und der No – React – und der Periguard – Gruppe zum anderen. Periguard und Kontrolle heben sich nicht voneinander ab.

Im inaktiven Serum finden sich die niedrigsten TNF  $\alpha$  – Mengen in allen Gruppen. Sie sind gegeneinander nicht signifikant unterschiedlich.

➤ Vergleich der Suspensionen untereinander:

Die TNF  $\alpha$  – Konzentrationen in der Kontrolle liegen im normalen und inaktiven Serum klar niedriger als im RPMI 5%. Die Kontrollwerte der letztgenannten Suspensionen unterscheiden sich hingegen nicht.

Zwischen den No – React – Gruppen der verschiedenen Kulturmedien besteht keine signifikante Differenz. Auch der zwischen normalem und inaktivem Serum absolute Werteabfall an TNF  $\alpha$  (s. Abb. 5) unterliegt keiner Signifikanz ( $p = 0,082$ ).

Im Hinblick auf Periguard läßt sich ein eindeutiger Unterschied in der Zytokinsynthese nur zwischen dem RPMI 5% und dem inaktiven Serum darstellen. Sie ist im RPMI 5% deutlich höher.

Signifikante Periguard – Varianzen zwischen RPMI 5% und normalem Serum bzw. Normalserum und inaktivem Serum sind nicht nachzuweisen.

#### 4.2.3 Versuchstag 5:

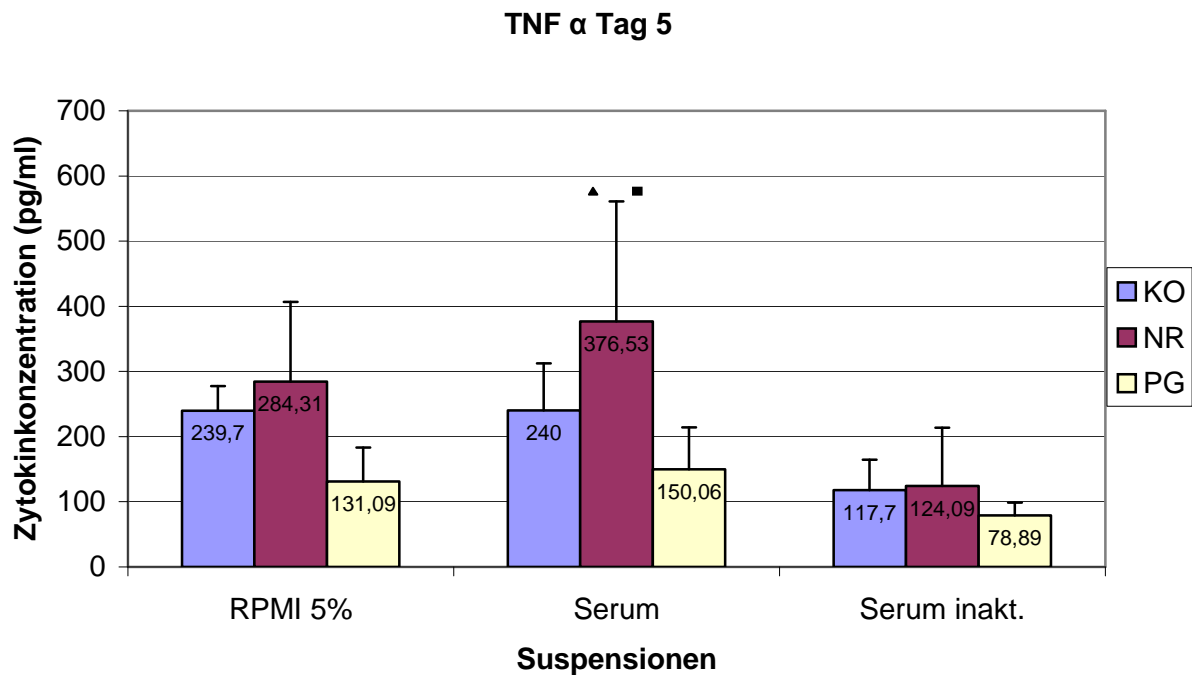


Abbildung 6: TNF  $\alpha$  – Bestimmung (in Picogramm/ml) an Versuchstag 5 in den Gruppen Kontrolle (KO; blaue Säulen), No – React (NR; rote Säulen) und Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Suspensionen RPMI 5%, Normalserum und inaktives Serum

▲ : NR/KO:  $p = ,011$

■ : NR/PG:  $p = ,007$

➤ Ergebnisse innerhalb der Suspensionen:

Der Trend der Zytokinsynthese an **Tag 5** der TNF  $\alpha$  – Bestimmung entspricht dem der ersten beiden Versuchstage. Die No – React – Konzentrationen sind in allen Medien die höchsten.

Im RPMI 5% präsentieren sich die Gruppen ohne statistisch signifikante Unterschiede zueinander.

Wie auch an den Vortagen des Versuchs hebt sich das No – React im normalen Serum signifikant von der Kontrolle und dem Periguard ab, wobei diese beiden nicht unterschiedlich in der TNF  $\alpha$  – Produktion reagieren.

Im inaktiven Serum finden sich wie im RPMI 5% keine TNF  $\alpha$  – Differenzen, die Signifikanz erreichen.



- Vergleich der Suspensionen untereinander:

Für die Kontrolle gilt, dass sich signifikante Werteunterschiede zwischen Normal – und inaktivem Serum und RPMI 5% und inaktivem Serum finden lassen. Serum und RPMI 5% zeigen keine statistisch klare Differenz.

Bei der Gegenüberstellung der No – React – Gruppen errechnet sich nur zwischen Normalserum und inaktivem Serum ein deutlicher Unterschied.

Die Periguardgruppen unterscheiden sich mit ihren Zytokinwerten in keinem Kulturmedium.

#### 4.2.4 Signifikanzen:

Normalserum		Tag1	Tag3	Tag5
	Periguard	+	+	+
	Kontrolle	+	+	+
Inaktives Serum				
	Periguard	-	-	-
	Kontrolle	-	-	-

Tabelle 7: Übersicht über die signifikanten TNF  $\alpha$  - Unterschiede beim Vergleich von No – React mit den Vergleichssuspensionen Periguard bzw. Kontrolle im Normal – und inaktiven Serum an den Versuchstagen 1, 3 und 5

+ = No – React signifikant höher als Vergleichssuspension

- = keine Signifikanz zwischen No – React und Vergleichssuspension

Auffallend ist, dass bei Anwesenheit von Komplement die TNF  $\alpha$  – Produktion durch das MNK in der No – React – Gruppe durchgehend signifikant höher ausgeprägt ist als in den Vergleichsgruppen Kontrolle bzw. Periguard. Diese Feststellung gilt zusätzlich für alle Versuchstage.

Im inaktiven Serum, in dem kein Komplement vorhanden ist, bestehen diese Signifikanzen über den gesamten Versuchszeitraum nicht mehr; Die Wertelevel zwischen No – React und den Vergleichssuspensionen Periguard und Kontrolle sind demnach nicht unterschiedlich.

### 4.3 Zytokinerggebnisse im Zeitverlauf:

#### 4.3.1 Interleukin - 6:

##### 4.3.1.1 RPMI 5%:

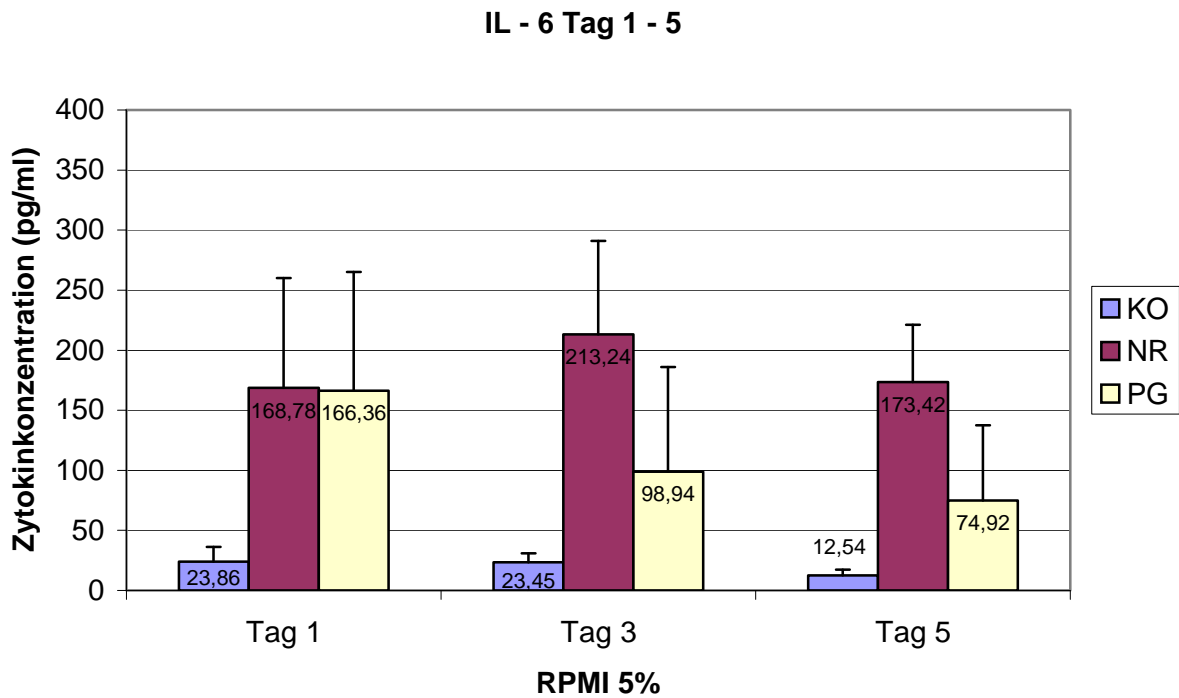


Abbildung 7: IL – 6 – Produktion (in pg/ml) durch das MNK im RPMI 5% in der Kontrolle (KO; blaue Säulen), im No – React (NR; rote Säulen) und im Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Versuchstage 1, 3 und 5

Bei Betrachtung der einzelnen Gruppen im Zeitverlauf bestehen im **RPMI 5%** weder für die No – React – noch die Periguard – Gruppe IL – 6 – Konzentrationen, die statistisch signifikant steigen oder sinken.

4.3.1.2 normales Serum:

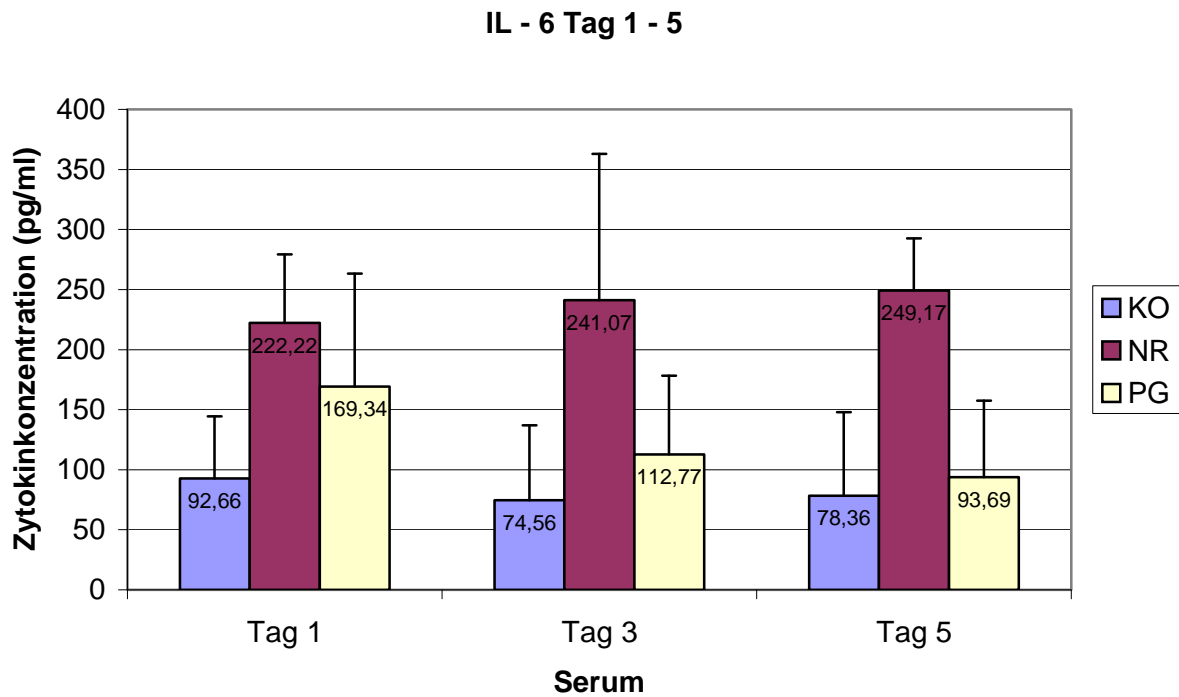


Abbildung 8: IL – 6 – Produktion (in pg/ml) durch das MNK im Normalserum in der Kontrolle (KO; blaue Säulen), im No – React (NR; rote Säulen) und im Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Versuchstage 1, 3 und 5

Im **normalen Serum** stellen sich wie im RPMI 5% über den zeitlichen Versuchsverlauf für die Patchgruppen keinerlei signifikante Veränderungen in der IL – 6 – Produktion über die Versuchstage dar, d. h. es kommt in den einzelnen Gruppen zu keinen Konzentrationsveränderungen von Tag 1 auf 3 bzw. von Tag 3 auf 5.

#### 4.3.1.3 inaktives Serum:

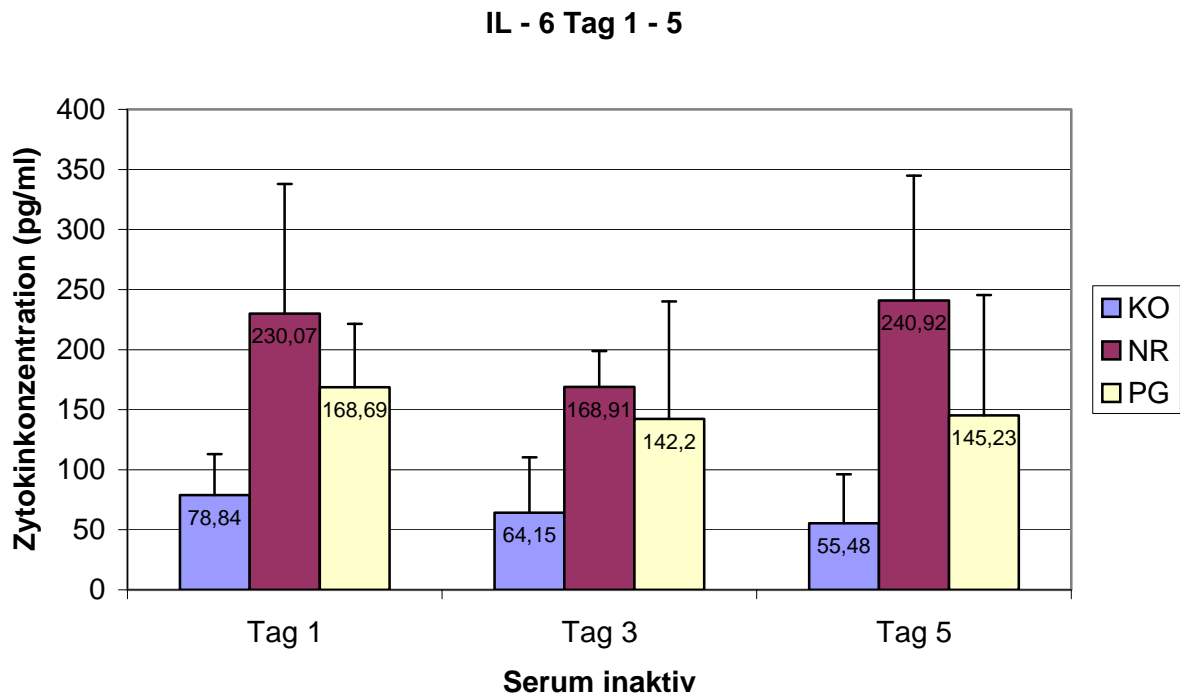


Abbildung 9: IL – 6 – Produktion (in pg/ml) durch das MNK im inaktiven Serum in der Kontrolle (KO; blaue Säulen), im No – React (NR; rote Säulen) und im Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Versuchstage 1, 3 und 5

Im **inaktiven Serum** kommt es innerhalb keiner Gruppe zu signifikanten Wertesteigerungen oder – abnahmen im Rahmen des Versuchszeitraumes.

#### 4.3.2 TNF $\alpha$ :

##### 4.3.2.1 RPMI 5%:

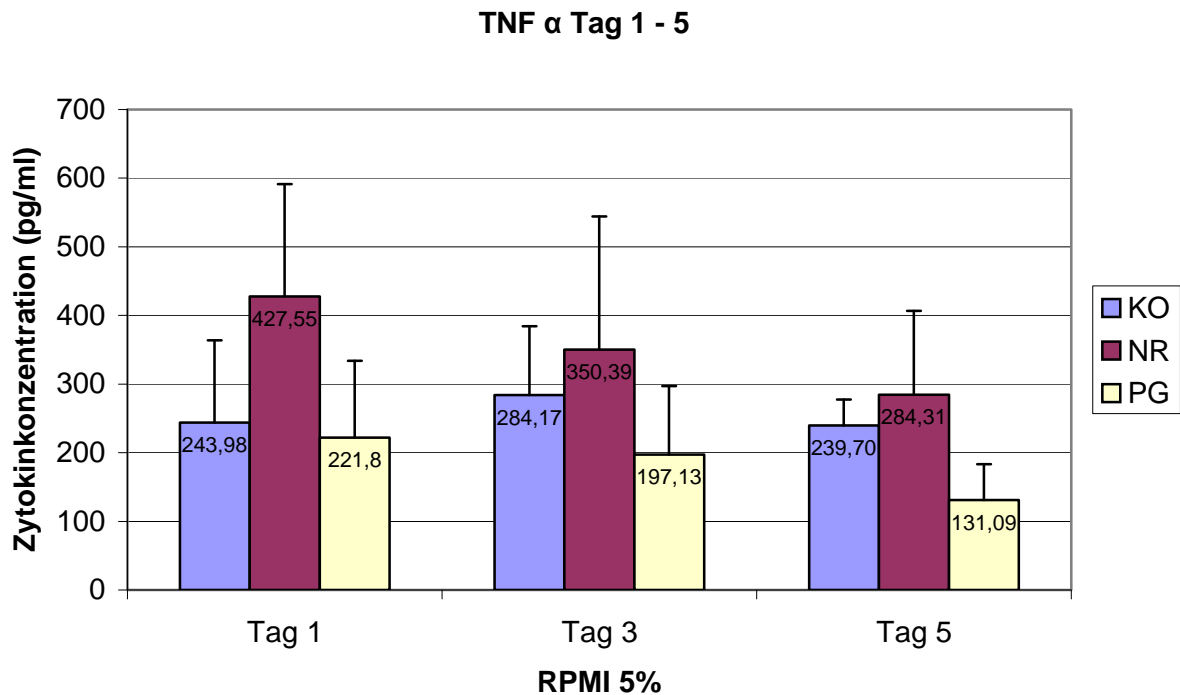


Abbildung 10: TNF  $\alpha$  – Produktion (in pg/ml) durch das MNK im RPMI 5% in der Kontrolle (KO; blaue Säulen), im No – React (NR; rote Säulen) und im Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Versuchstage 1, 3 und 5

Während sich Kontroll – und No – React – Gruppe im **RPMI 5%** über die Tage 1, 3 und 5 nicht signifikant verändern, zeigt sich beim Vergleich der Periguard – Gruppen nur zwischen den Tagen 1 und 5 ein klarer Abfall der TNF  $\alpha$  – Konzentrationen.

#### 4.3.2.2 normales Serum:

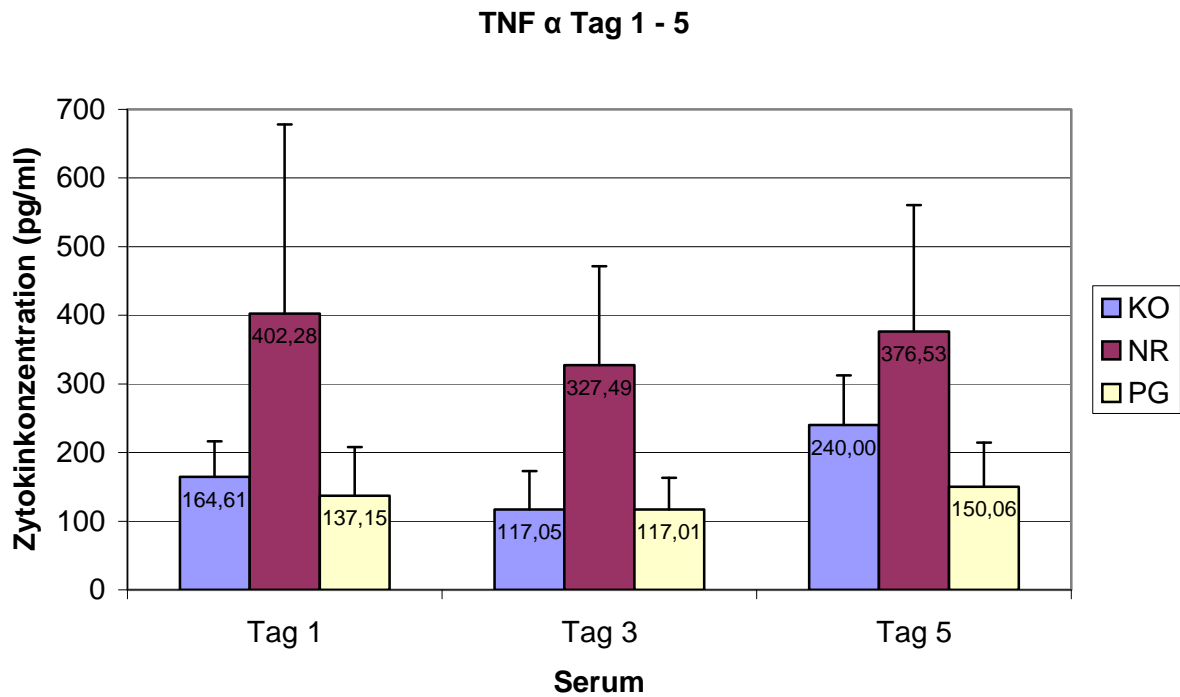


Abbildung 11: TNF  $\alpha$  – Produktion (in pg/ml) durch das MNK im Normalserum in der Kontrolle (KO; blaue Säulen), im No – React (NR; rote Säulen) und im Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Versuchstage 1, 3 und 5

Im **normalen Serum** kommt es in keiner der Gruppen zu statistisch eindeutigen Veränderungen in der TNF  $\alpha$  – Produktion über den Versuchszeitraum.

#### 4.3.2.3 inaktives Serum:

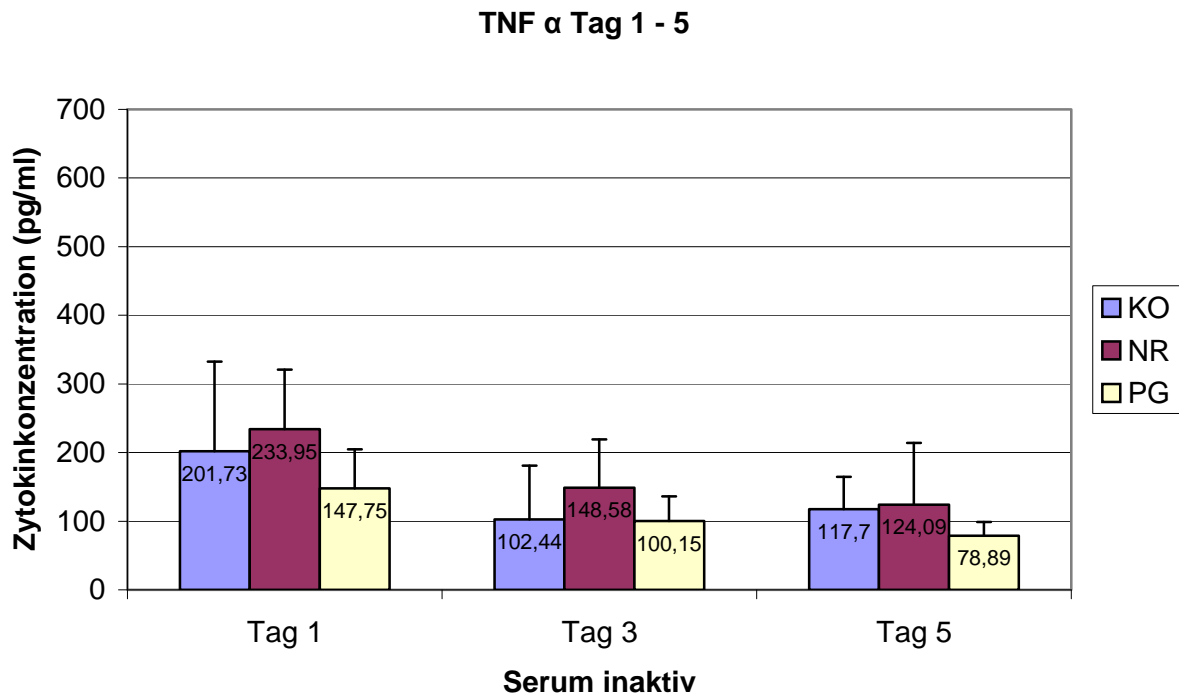


Abbildung 12: TNF  $\alpha$  – Produktion (in pg/ml) durch das MNK im inaktiven Serum in der Kontrolle (KO; blaue Säulen), im No – React (NR; rote Säulen) und im Periguard (PG; gelbe Säulen) für die Versuchstage 1, 3 und 5

Im **inaktiven Serum** weisen die Kontrolle und die No – React – Gruppe keine zeitlich gesehen signifikanten Veränderungen auf. Zwischen den Versuchstagen 1 und 3 bzw. den Tagen 1 und 5 ergeben sich für die Periguard – Gruppe dagegen signifikante Abnahmen der TNF  $\alpha$  – Konzentrationen.

#### 4.4 Standardabweichung des Medians:

Im Allgemeinen führen die ermittelten Werte in den Tests zu erheblichen Standardabweichungen.

Dabei lässt sich für die Untersuchung der Testproben auf Interleukin – 6 festhalten, dass die Standardabweichungen der Patchgruppen häufig deutlich über denen der Kontrollgruppen zu liegen kommen. Zwischen No – React und Periguard sind aber keine regelmäßigen Verteilungen der Standardabweichungen zugunsten einer der Patchgruppen erkennbar.

Im Gegensatz dazu unterliegen die Standardabweichungen für die TNF  $\alpha$  – Bestimmung bei Kontrolle und Periguard in allen Suspensionen mit wenigen

Ausnahmen nur geringen Unterschieden, d. h. die Standardabweichungen beider Gruppen bewegen sich in ähnlichen Dimensionen.

Auffallend hoch dagegen fallen die Standardabweichungen durchgehend bei der No – React – Gruppe aus. Mit Ausnahme des No – Reacts im inaktiven Serum an den Tagen 1 und 3 überragt sie die anderen Gruppen in den Suspensionen klar.

Insbesondere im Normalserum stechen diese Unterschiede ins Auge (s. 5.3.3; Diskussion der Standardabweichungen).

#### *4.5 Negativkontrollen:*

Bei den Bestimmungen von Interleukin – 6 und TNF  $\alpha$  in den Negativkontrollen, in denen jeweils Patchmaterial mit den einzelnen Suspensionen, aber kein MNK enthalten waren, konnten in keiner Gruppe Zytokine nachgewiesen werden.

#### *4.6 Histologie/Immunhistochemie:*

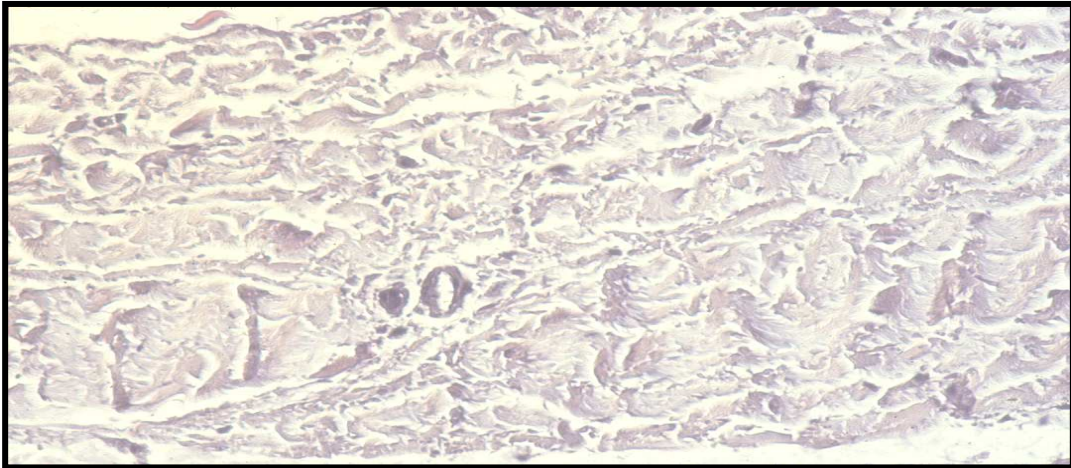
##### *4.6.1 Nativpräparate:*

Beim Vergleich der Nativschnitte von No – React und Periguard, die mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt wurden, fiel bei 40 - facher Vergrößerung auf, dass sich die Gewebestruktur beider Patches voneinander unterschied:

Das Periguard - Patch wies eine grundsätzlich inhomogene und unregelmäßige Struktur vor allem der kollagenen Bestandteile des Gewebes auf. Es erschien weitestgehend devitalisiert, was auch an der unterschiedlichen Anfärbbarkeit des Materials erkennbar war. Neben der aufgelösten Kollagenmorphologie fanden sich noch vereinzelt Endothelien mit zugehörigen Zellkernen. Das gesamte Periguardpräparat enthielt außerdem nur wenige weitere, nicht eindeutig zu differenzierende Zellkerne (s. Bild 3).

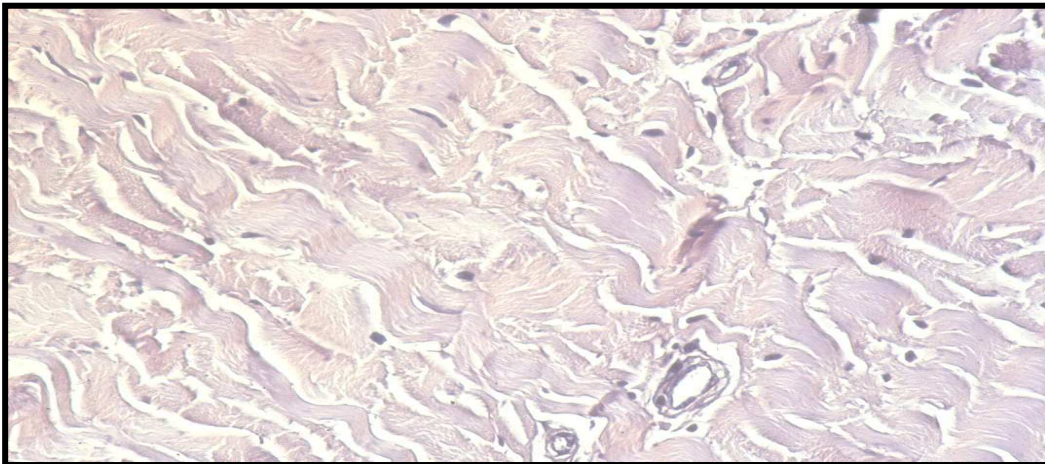
Das histologische Nativbild des No – React Patches dagegen ließ eine homogene Anordnung aller Gewebeanteile erkennen. Die Kollagenfasern zeigten eine zusammenhängende, glattere und weichere Struktur im Gegensatz zum Periguard - Patch, was sich unter anderem anhand der gleichmäßigeren Färbung des Gewebes verdeutlichte. Klar zu identifizieren waren im No – React vorbehandelten Gewebe zusätzlich Endothelien mit zugehörigen, dunkel – lila angefärbten Zellkernen. Ebenfalls über das ganze Präparat verstreut konnte man zahlreiche Zellkerne finden, die eine wesentlich höhere Anzahl im No – React Patch vorwies als im Periguardpatch (s. Bild 4).





**Bild 3:** Nativ – Präparat eines **Periguard - Patches** bei 40 – facher Vergrößerung:

Auffällig die unruhige, inhomogene Kollagenstruktur und die schwierige Differenzierbarkeit bzw. das Fehlen von Zellkernbestandteilen



**Bild 4:** Nativ – Präparat eines **No – React – Patches** bei 40 – facher Vergrößerung:

Im Gegensatz zur Periguard – Histologie homogene Gewebedarstellung mit deutlich zahlreicheren und sicher abgrenzbaren Zellkernstrukturen

#### 4.6.2 Immunhistochemische Färbungen:

In den No – React - und Periguard – Präparaten, die während des Versuchszeitraums mit den unterschiedlichen Suspensionen (RPMI 5%, Normal – und inaktives Serum + MNK) inkubiert waren, wurden als Endstrecke der Komplementsystem –

Reaktionskette der „Membrane – Attack - Complex“, als weitere Komplementkomponente der Faktor C3c und die Immunglobuline IgM, IgG und IgA angefärbt (s. 3.2.5). Die immunhistochemischen Ablagerungen präsentierten sich als bräunliche Anfärbungen in den Patchgeweben. Wie auch die Nativpräparate wurden die Histologien in 40 - facher Vergrößerung dargestellt.

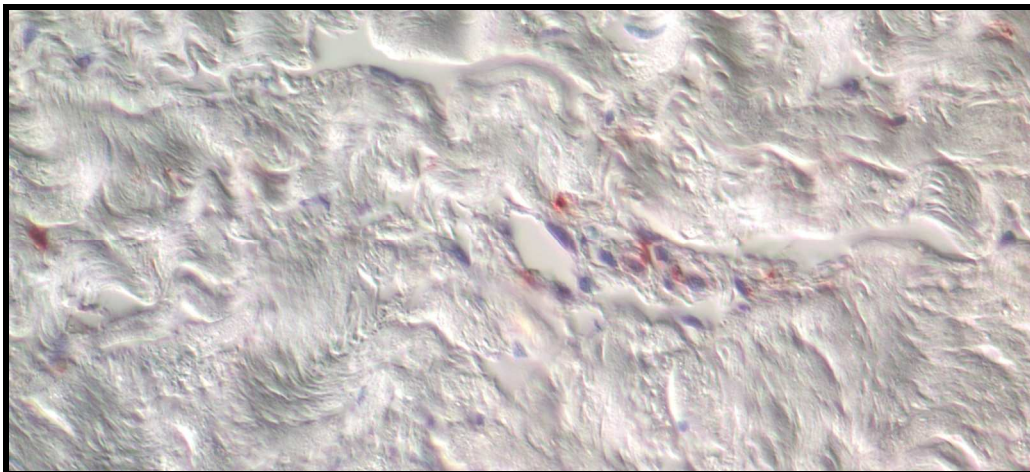
Die für beide Patches formulierten Beobachtungen bildeten sich schon am ersten Versuchstag aus und bestimmten das histologische Bild über den kompletten Versuchszeitraum hinweg.

#### 4.6.3 MAC – Färbung:

##### 4.6.3.1 In RPMI 5% gelagerte Patches:

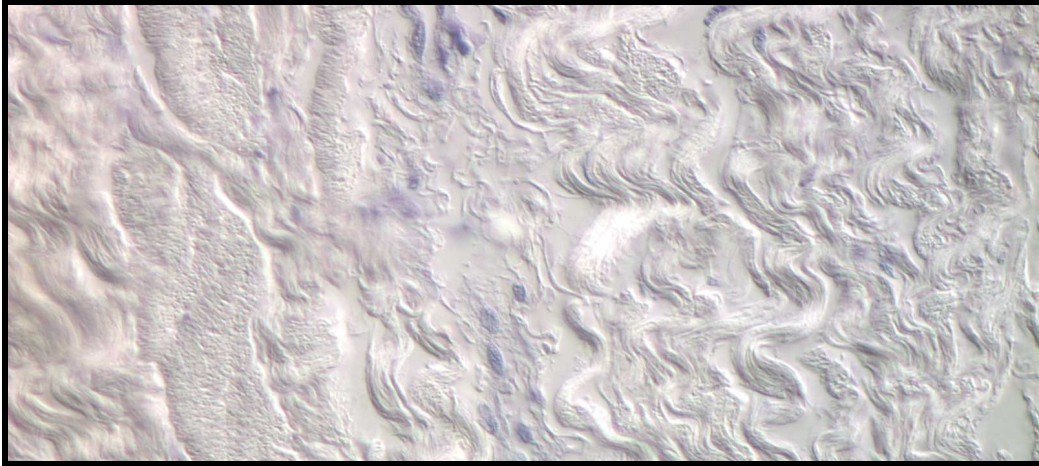
Im No – React – Patch waren einzelne Anfärbungen anzutreffen, die sich auf die Endothelien der im Gewebe erkennbaren Gefäße beschränkten. Weiterhin waren diskretere Ablagerungen auch peripher der Endothelauskleidungen erkennbar, die mit zunehmender Distanz vom Gefäss abnahmen und nur sehr vereinzelt auftraten (s. Bild 5).

Im Periguardpräparat hingegen fanden sich keinerlei Anfärbungen, die auf Depositionen des MAC hindeuteten (s. Bild 6).



**Bild 5: MAC – gefärbtes Präparat eines in RPMI 5% gelagerten No – React – Patches:**

Endotheliale und vereinzelt perivaskuläre MAC – Ablagerungen mit nach peripher abnehmendem Vorkommen



**Bild 6: MAC – gefärbtes Präparat eines in RPMI 5% gelagerten Periguard – Patches:**

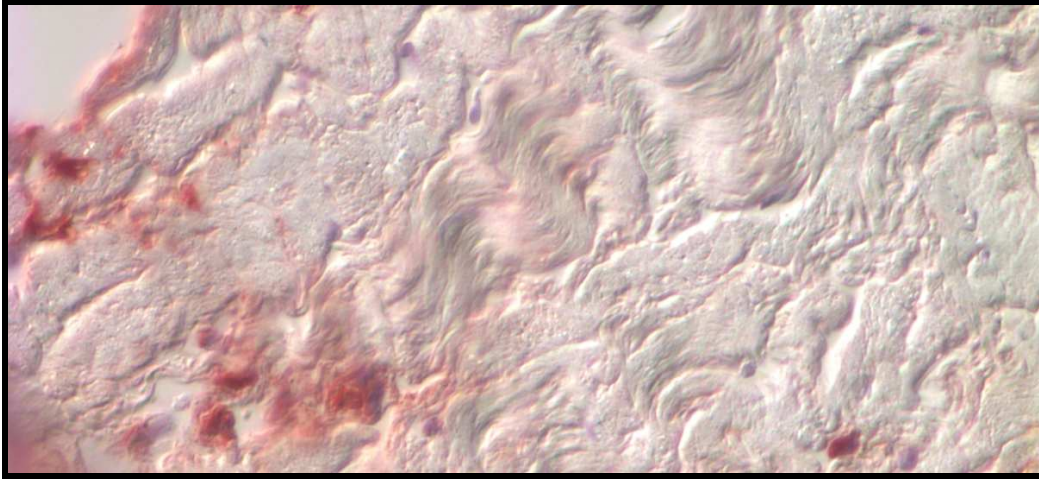
Keine MAC – Depositionen im gesamten Periguardgewebe erkennbar

#### 4.6.3.2 In Normalserum gelagerte Patches:

Das No – React – Patch zeichnete sich durch deutliche MAC – Anfärbungen aus, die sowohl im Bereich vorhandener Endothelauskleidung als auch an zahlreichen, im Kollagengewebe verteilten Zellkernen zu beobachten waren. Während die Ablagerungen im RPMI 5% im Bezug auf das No – React – Patch nur gering ausgeprägt und eher lokalisiert waren, zeigten sich im Normalserum kräftige und multiple, diffus verstreute MAC – Ansammlungen (s. Bild 7).

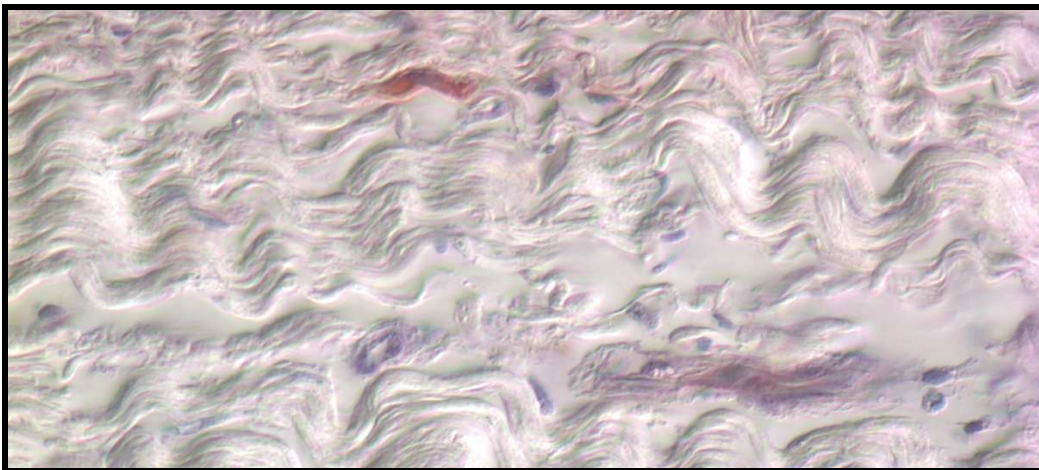
Auch das Periguardpräparat wies Loci auf, an denen es zu MAC – Depositionen kam. Im Unterschied zu den No – React – Proben fielen jene aber sowohl in der Intensität der Färbung als auch im zahlenmässigen Auftreten deutlich geringer aus (s. Bild 8).





**Bild 7: MAC – gefärbtes Präparat eines No – React – Patches** nach Inkubation in  
**Normalserum:**

Zahlreiche, dunkelbraun angefärbte Areale, die neben den Endothelien auch Zellstrukturen um die Gefäßbegrenzungen herum mit einschliessen

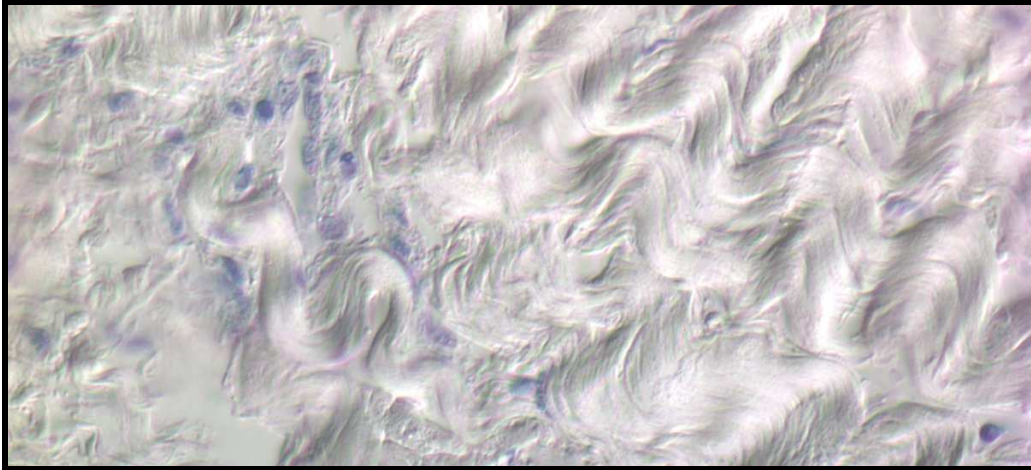


**Bild 8: MAC – gefärbtes Präparat eines in normalem Serum inkubierten Periguard  
- Patches:**

Vereinzelt angefärbtes Endothel, kaum im Kollagen verstreute MAC – Ablagerungen, die insgesamt quantitativ deutlich weniger nachweisbar sind als im No – React

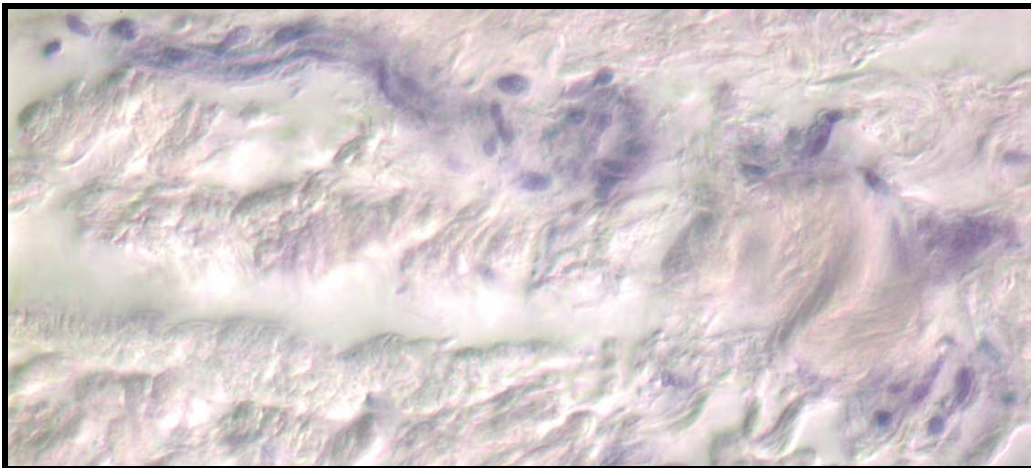
#### 4.6.3.3 In inaktivem Serum gelagerte Patches:

Weder das No – React – noch das Periguard – Präparat demonstrierten bräunliche Markierungen des C5b – 9 – Komplexes. Endotheliale Strukturen waren ebenso frei von Anfärbungen wie auch die auf Bild 9 und 10 zu erkennenden zellulären Bestandteile im kollagenen Bindegewebe beider Patches.



**Bild 9: MAC – gefärbtes Präparat eines in inaktivem Serum inkubierten No – React - Patches:**

Wie auch auf Bild 10 komplett MAC – freie Gefäßauskleidungen und Zellstrukturen im kollagenen Bindegewebe beider Patches



**Bild 10: MAC – gefärbtes Präparat eines in inaktivem Serum inkubierten Periguard - Patches**

#### 4.6.4 C3c – Färbung:

##### 4.6.4.1 In RPMI 5% gelagerte Patches:

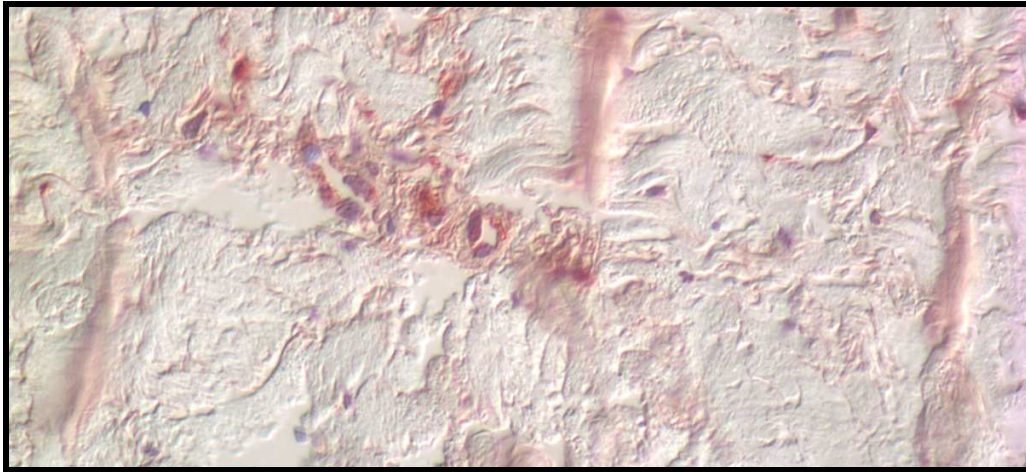
Das No – React Patch brachte nach Anfärbung des Faktors C3c folgende histologische Ergebnisse:

Wie auch bei den MAC – Färbungen sichtbar, waren vorzugsweise die Endothelien des No – React – Patches von C3c – Depositionen gekennzeichnet. Allerdings kamen auch



angefärbte Strukturen im kollagenen Bindegewebe des Patches zum Vorschein. Die Anzahl der vom C3c markierten Perikardbestandteile war um die Blutgefäße herum hoch und ließ mit weiterer Entfernung vom Blutgefäß nach (s. Bild 11).

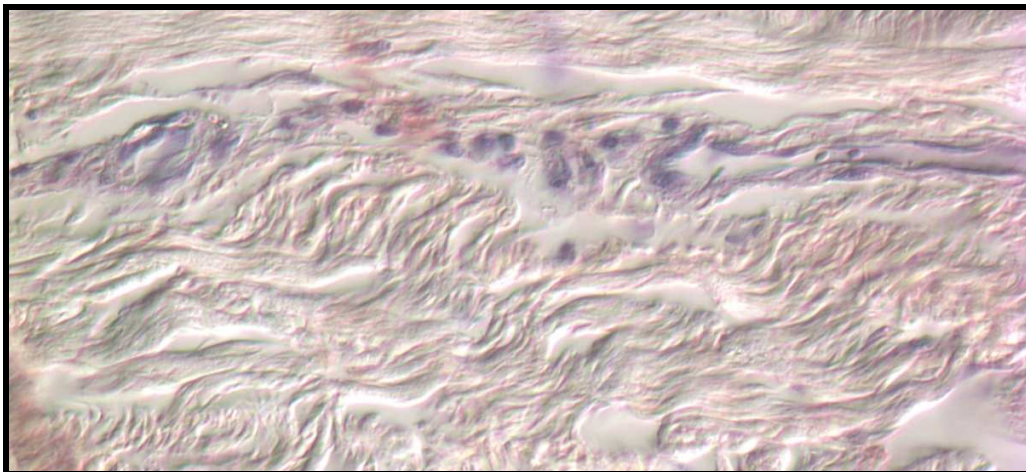
Im Gegensatz zum No – React Gewebe lagerte sich im Periguard – Produkt kein C3c ab. Dort waren die endothelialen und zellulären Gewebebestandteile frei von Anfärbungen (s. Bild 12).



**Bild 11:** C3c – gefärbtes Präparat eines in RPMI 5% inkubierten

**No – React – Patches:**

Bräunliche Depositionen insbesondere im Endothelbereich, aber auch an zellulären Strukturen im Kollagen



**Bild 12:** C3c – gefärbtes Präparat eines in RPMI 5% inkubierten

**Periguard – Patches:**

Zelluläre Komponenten im Periguard – Material frei von immunhistochemischen Markierungen

#### 4.6.4.2 In Normalserum gelagerte Patches:

Das No – React zeigte intensive Anfärbungen im Endothelbereich, die kräftiger ausfielen als die C3c – Markierungen im RPMI 5%. Zusätzlich waren auch Anfärbungen im Kollagen zu beobachten, die u. a. periphere, zelluläre Strukturen mit einschlossen und dem histologischen Bild des Gewebes einen bräunlichen Charakter vermittelten (s. Bild 13).

Im Periguard präsentierten sich ebenfalls Ablagerungen, die aber deutlich weniger intensiv und in klar geringerer Anzahl als im No – React zu sehen waren (s. Bild 14).



**Bild 13:** C3c – gefärbtes Präparat eines in Normalserum inkubierten

#### **No – React – Patches:**

In Bildmitte starke C3c – Ablagerungen in Endothelregion; darüber bräunlich erscheinendes, kollagenes Bindegewebe mit vereinzelt angefärbten Zellen



**Bild 14: C3c – gefärbtes Präparat eines in Normalserum inkubierten**

**Periguard – Patches:**

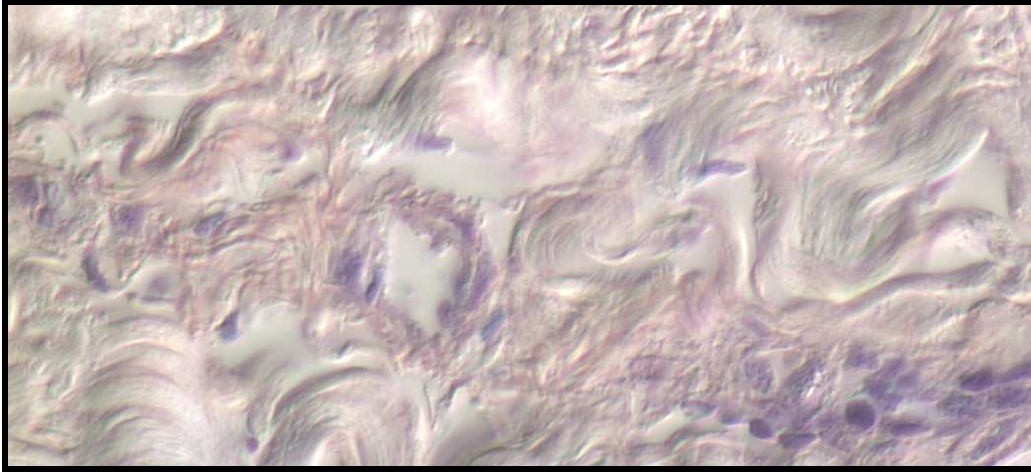
Hauptsächlich C3c – freie Zellstrukturen und Gefäßauskleidung; am linken Bildrand  
Anfärbung einer Zelle

4.6.4.3 In inaktivem Serum gelagerte Patches:

Die immunhistochemische Untersuchung von No – React und Periguard auf C3c ergab in beiden Fällen folgendes Ergebnis:

Wie schon bei der MAC – Histologie zeigten die zellulären Bestandteile in den Endothelien wie auch im Bindegewebe der Patches keinerlei Braunfärbungen, sondern imponierten frei von jeglichen Ablagerungen (s. Bilder 15 und 16).

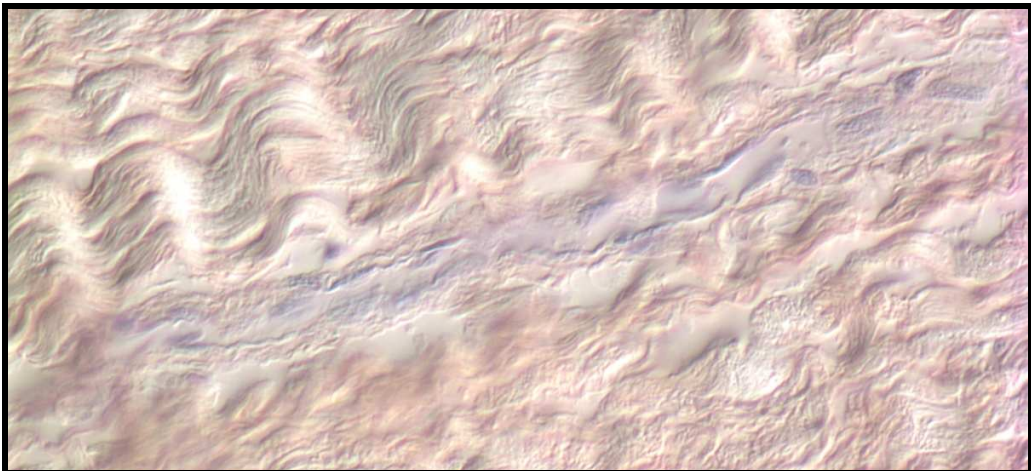




**Bild 15: C3c – gefärbtes Präparat eines in inaktivem Serum inkubierten**

**No – React – Patches:**

Auf beiden Bildern Zellstrukturen ohne nachweisbare C3c – Markierungen (s. auch Bild 16)



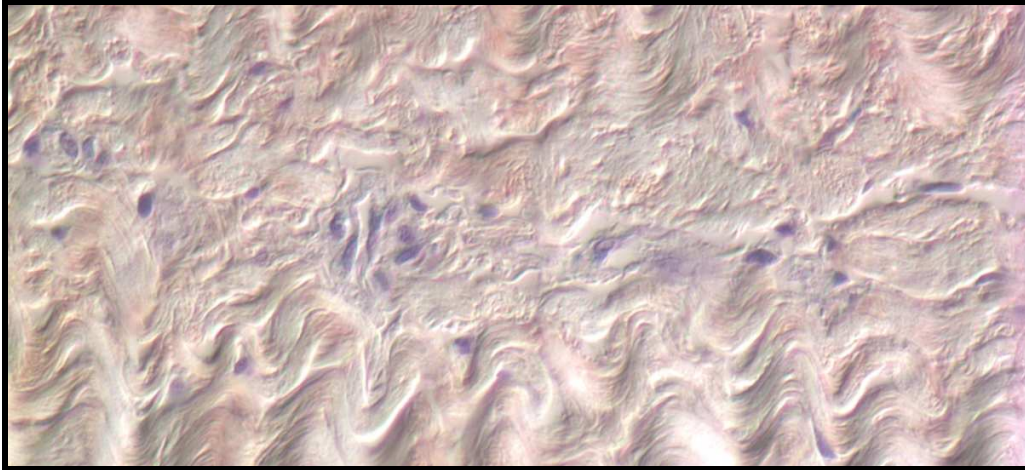
**Bild 16: C3c – gefärbtes Präparat eines in inaktivem Serum inkubierten**

**Periguard – Patches**

4.6.5 Ig – Färbung:

4.6.5.1 In RPMI 5% gelagerte Patches:

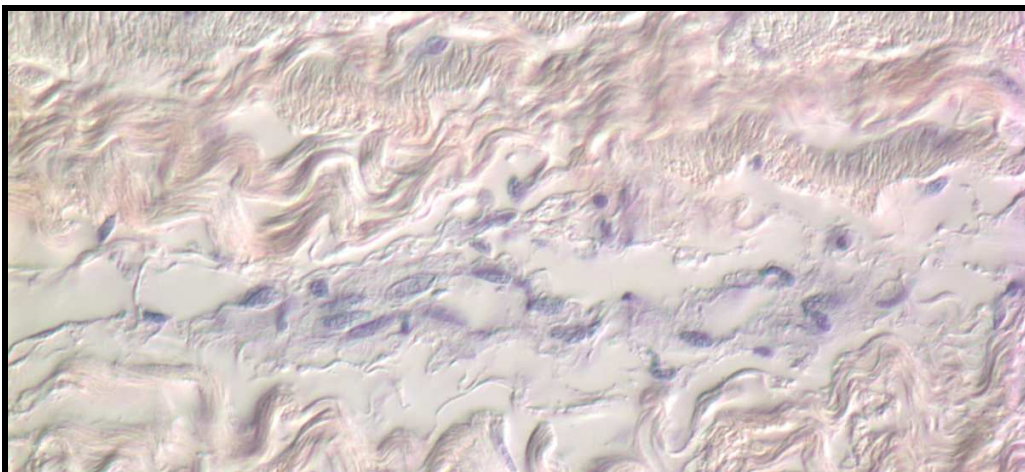
Im Gegensatz zu den beiden vorangegangenen Färbungen traten im No – React – Produkt nach Vollzug der Anfärbung gegen IgM, IgG und IgA keine Depositionen als bräunliche Markierungen auf. Zellen und Endothelien in Gewebe blieben im No – React ebenso ungefärbt wie dieselben Strukturen im Periguard (s. Bilder 17 und 18).



**Bild 17:** Ig – gefärbtes Präparat eines in RPMI 5% inkubierten

**No – React – Patches:**

Wie auch im Periguard (Bild 18) keine Ig – Anfärbungen im gesamten Patch – Material



**Bild 18:** Ig – gefärbtes Präparat eines in RPMI 5% inkubierten

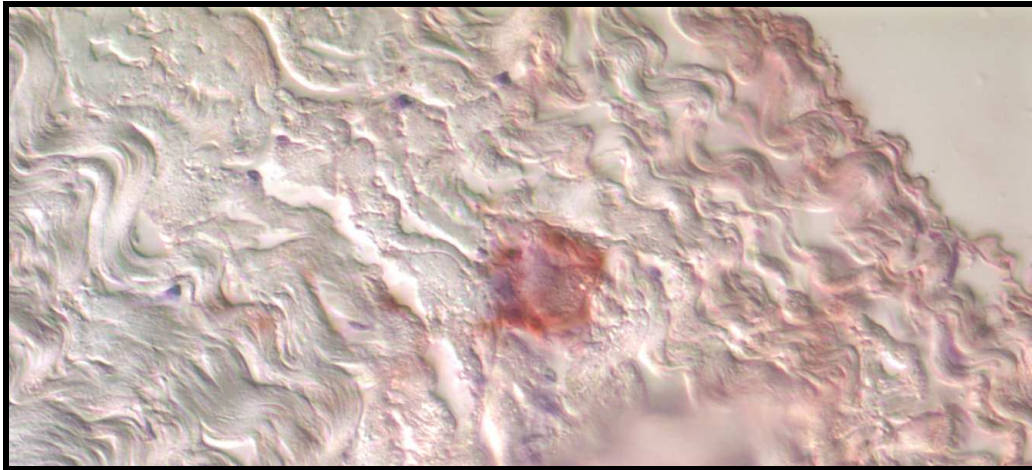
**Periguard – Patches**

4.6.5.2 In Normalserum gelagerte Patches:

Bild 19 veranschaulicht einen Ausschnitt aus einem No – React – Patch, das während des Versuches mit normalem Serum inkubiert war. Wie in der Mitte des Fotos zu erkennen, färbten sich besonders endotheliale Strukturen klar bräunlich an. Zellen im Kollagen blieben weitestgehend bis auf wenige Ausnahmen von den Ablagerungen unbeeinflusst (s. Bild 19).



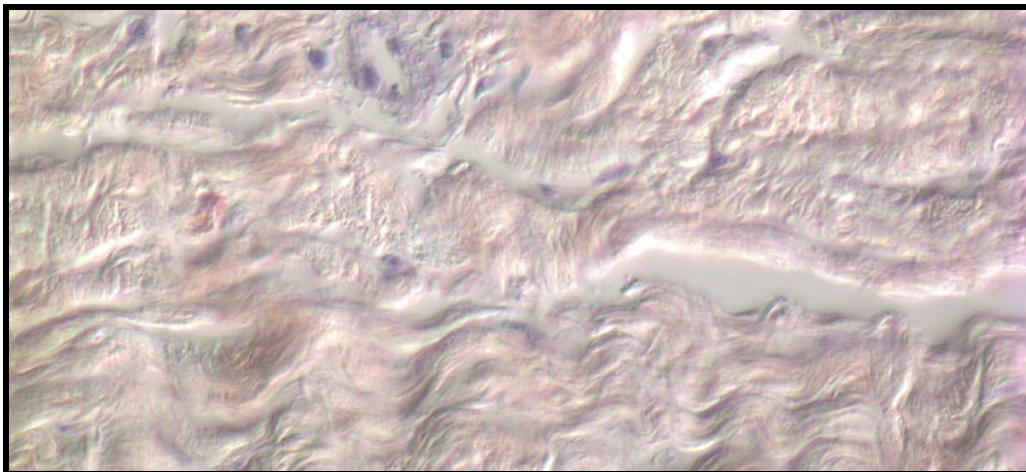
Das Periguard präsentierte dagegen nur in äußerst geringem Maße bräunliche Markierungen, die auf Ig – Depositionen schliessen lassen. Der überwiegende Großteil der Zellen im Gewebe war ungefärbt (s. Bild 20).



**Bild 19:** Ig – gefärbtes Präparat eines in **Normalserum** inkubierten

**No – React – Patches:**

Deutliche Ig – Ablagerungen im Bereich des Endothels und farblich etwas schwächere Anfärbungen einzelner, periendothelialer Zellkomponenten



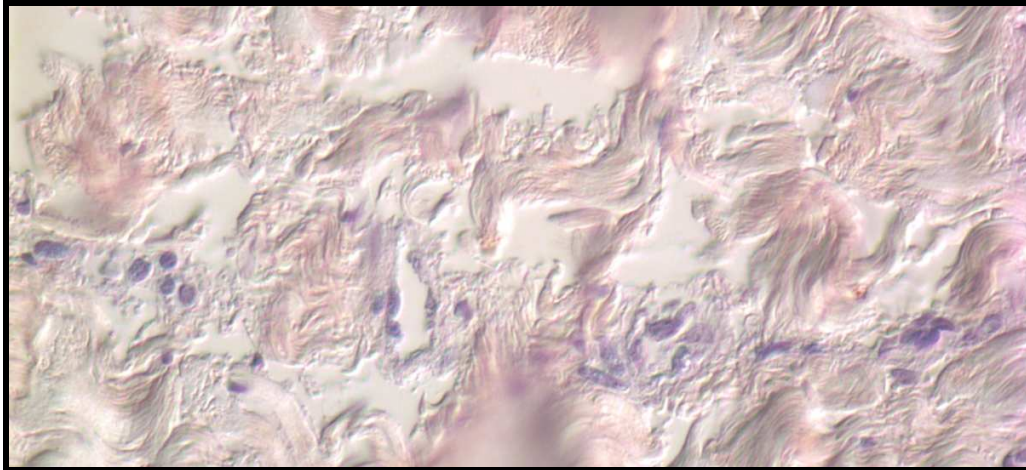
**Bild 20:** Ig – gefärbtes Präparat eines in **Normalserum** inkubierten

**Periguard – Patches:**

Vorwiegend freies Endothel und ungefärbte Zellen im Präparat; im linken, mittleren Bildabschnitt sehr diskrete Anfärbung einer Zelle

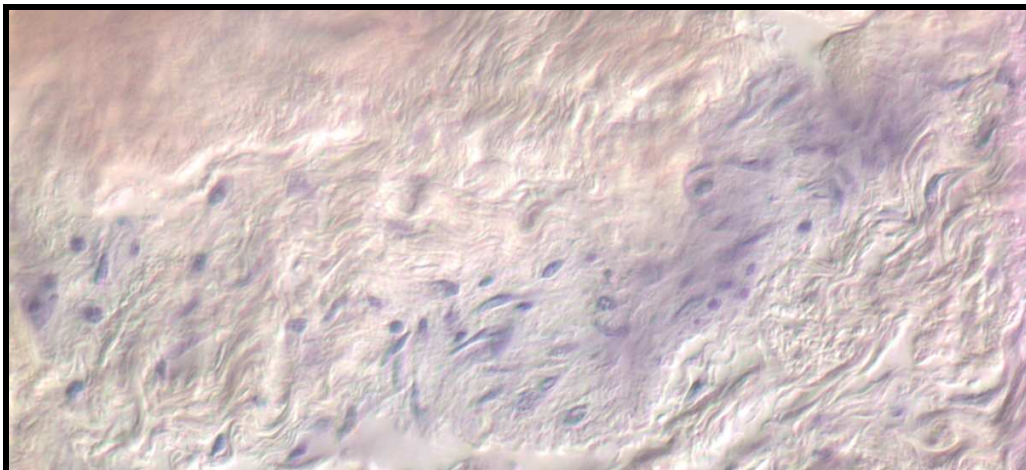
#### 4.6.5.3 In inaktivem Serum gelagerte Patches:

Weder im No – React noch im Periguard waren Ig – Markierungen in den jeweiligen Geweben ausfindig zu machen (s. Bilder 21 und 22).



**Bild 21:** Ig – gefärbtes Präparat eines in **inaktivem Serum** inkubierten  
**No – React – Patches:**

In beiden Patches normal erscheinende Zellen ohne den Nachweis von Ig – Ablagerungen in Form von braunen Anfärbungen (s. auch Bild 22)



**Bild 22:** Ig – gefärbtes Präparat eines in **inaktivem Serum** inkubierten  
**Periguard – Patches**

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Versuche

#### 5.1.1 Probandenauswahl:

Peripheres Blut wurde von zehn freiwilligen, zufällig ausgewählten Spendern ( $n = 10$ ) verwendet. Zweck dieser Auswahl der Versuchspersonen war es, dem von den Spätkomplikationen betroffenen Patientengut am Bundeswehrzentral Krankenhaus in Koblenz möglichst zu entsprechen.

Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass keiner der Probanden eine durch Medikamente oder Erkrankungen beeinflusste Aktivität des Immunsystems zum Zeitpunkt der Blutabnahme aufwies, um Verfälschungen der Versuchsergebnisse durch derartige Störfaktoren von Anfang an auszuschließen.

#### 5.1.2 Gewinnung von Serum und mononukleärem Konzentrat (MNK):

Aus dem Vollblut der Versuchspersonen wurden jeweils sowohl Serum isoliert als auch mononukleäre Zellen gewonnen.

Das Serum als wichtige Grundsubstanz unseres Versuchsaufbaus hat die Eigenschaft, von Fibrinogen und korpuskulären Bestandteilen des Blutes, die für die Versuchsdurchführung hinderlich gewesen wären, befreit zu sein. Es enthält folglich noch wenige Proteinkomponenten wie Bilirubin und das Komplementsystem, das bei der xenogenen Abstoßung eine essentielle Rolle übernimmt. Eine störungsfreiere Untersuchung der Beteiligung des Komplementsystems an einer xenogenen Immunreaktion ist somit durch die Wahl des Serums gegeben.

Vor dem Hintergrund der Fragestellung der Arbeit wurde das mononukleäre Zellkonzentrat gewählt, da die dem MNK zugehörigen Zellen in der vermuteten, xenogenen Abstoßungsreaktion eine entscheidende Rolle spielen. In den Immunprozeß bei xenogener Abstoßung sind sowohl Monozyten/Makrophagen durch Antigenprozessierung, -präsentation und Zytokinproduktion beteiligt, als auch T – und B – Lymphozyten involviert.

### 5.1.3 Patches:

Um einen sinnvollen Vergleich der Untersuchungen über das No – React Patch zu erzielen, wurde dafür das Periguard Patch gewählt. Es ist nicht nur aus demselben tierischen Material (nämlich vom Rind) gewonnen, sondern besitzt auch dieselben Indikationsstellungen wie das No – React Patch und wird ebenfalls im klinischen Alltag der Chirurgen verwendet. Ferner wird es wie auch das No – React Patch einer nicht näher erläuterten Vorbehandlungsmethode des Herstellers unterzogen, die sich von der Vorgehensweise dieselben Vorteile verspricht wie der Hersteller des No – React Patches von seinem Produkt. Im Gegensatz zu No – React aber weist Synovis als Fabrikant des Periguard Patches in der zugehörigen Gebrauchsanweisung auf Komplikationen hin, die makro – und mikroskopisch den Nebenwirkungen entsprechen, die in Koblenz nach Anwendung von No – React auftraten. Diese Komplikationen werden von Synovis als sterile Entzündungsreaktionen umschrieben. Dem kommt der Hersteller von No – React nicht nach. Weiterhin beziffert Synovis die postoperative Komplikationsrate auf <1% gegenüber 8,7% Nebenwirkungsrate nach No – React Perikardimplantation in Koblenz.

Vor der Anwendung in den Versuchen wurden das zu untersuchende No – React Patch und das Vergleichspatch jeweils zwei Waschschrinen unterzogen. Diese hatten den Sinn, so viele noch im Patchgewebe befindliche Fremdsbstanzen wie möglich herauszuwaschen. Bei den Fremdsbstanzen ging es vor allem um die Stoffe, in denen die Patches steril gelagert waren (Benzylalkohol, Glutaraldehyd). Das Zuschneiden der Patches auf die Größe von 0,5 x 0,5 cm wurde gewählt, da diese Größe für die später folgende Inkubation der Patches in den dafür vorgesehenen Reagenzröhrchen passend war.

#### 5.1.4 Kulturmedien:

Als Medien zur Kultur wurden RPMI + 5% Serum, normales Vollserum und komplementdefizientes Serum ausgesucht.

##### 5.1.4.1 RPMI 5%:

Die Auswahl der Suspension aus RPMI mit 5%igem Serumanteil diene dem Zweck herauszufinden, ob und inwiefern eine Erniedrigung des Serumanteils am Gesamtmedium eine eventuelle Reaktion der MNK auf die Inkubation mit den Patches beeinflussen bzw. zu einer korrelierenden Abstufung beitragen würde. Die Zugabe des Antibiotikums zum Nährmedium RPMI bezweckte eine Gewährleistung der Haltbarkeit des Teilansatzes über den Versuchszeitraum von 6 Tagen durch Verhinderung einer bakteriellen Besiedlung.

##### 5.1.4.2 normales (unverändertes) Serum:

Die Versuchsdurchführung in unverändertem, normalem Serum kommt der Situation der angenommenen, xenogenen Abstoßung des Implantats in den Patienten am nächsten. In diesem Kulturmedium war deshalb während des Versuchs eine Aktivität des Komplementsystems und eine Produktion von Zytokinen mittels aktivierter MNK zu erwarten, die der im Patientenorganismus am ähnlichsten ist.

##### 5.1.4.3 inaktives (Komplement - defizientes) Serum:

Die Hälfte des am Anfang gewonnenen Serums wurde mit der Absicht der Denaturierung des Komplementsystems im Wasserbad inaktiviert. Die Inaktivierung diene dem Zweck erkennen zu können, welche Rolle das Komplement in einer eventuellen Abstoßung im Vergleich von Vollserum und Komplement – defizientem Serum spielt. Auf diese Weise sollte der Unterschied in der Produktion von Zytokinen verdeutlicht werden, der beim Auftreten einer xenogenen, komplementvermittelten Abstoßungsreaktion zwischen den Proben mit und ohne Komplement zu erwarten ist.

#### 5.1.4.4 Kontrollgruppen:

Um eine gewisse Grundaktivität der mononukleären Zellen, die z. B. durch die während des Versuches veränderten Konditionen hervorgerufen werden könnten, erfassen zu können, wurden Kontrollen angefertigt, die neben dem jeweiligen Kulturmedium nur noch das MNK der zugehörigen Versuchsperson enthielten. Die in den Kontrollen später ermittelten Zytokinmengen waren somit ein Anhaltspunkt über die bereits ohne Patchzugabe produzierte Quantität an Zytokinen, die schließlich auch zum Vergleich mit den Zytokinkonzentrationen in den jeweiligen Versuchsgruppen herangezogen wurden.

Die aus je einem Kulturmedium und einem jeweiligen Patch ohne MNK - Zusatz bestehenden Negativkontrollen zu den Versuchsansätzen wurden mit der Absicht angefertigt auszuschließen, dass schon in vivo im Serum der Probanden vorhandene Zytokinmengen vor Versuchsbeginn unerkannt bleiben und die Bestimmung der Zytokine im Versuch verfälschen.

#### 5.1.5 Versuchszeitraum:

Der Zeitraum von 5 Versuchstagen wurde gewählt, weil bekannt ist, dass mononukleäre Zellen außerhalb ihres natürlichen Milieus im Organismus eine begrenzte Überlebensdauer von bis zu sechs Tagen aufweisen [131]. Nach fünf Tagen setzt Apoptose ein, die das Absterben der betroffenen Zellen anzeigt. Um diesen Zellschwund und den mit ihm einhergehenden Abfall/Zunahme der Zytokinproduktion zu vermeiden, wurde der Zeitraum für die Versuche bewusst auf insgesamt 5 Tage festgesetzt.

Zusätzlich zur gesamten Zeitspanne der Inkubation der Proben von 5 Tagen wurden als einzelne Versuchstage die Tage 1, 3 und 5 bestimmt, um den Verlauf der Zytokinproduktion durch die mononukleären Zellen über die Zeit beobachten und darstellen zu können.



### 5.1.6 Zytokinauswahl:

Für die Auswahl der Zytokine Interleukin – 6 und Tumor - Nekrose – Faktor  $\alpha$  war ausschlaggebend, dass es sich bei beiden Interleukinen um proinflammatorische Zytokine handelt, d. h., dass sie bei immunologischen Reaktionen in hohen Konzentrationen zu finden sind, und dass sie solche Immunprozesse in ihrem Fortbestehen und ihrer Ausprägung unterstützen. Demnach ist ihr Nachweis auch bei einer xenogenen Abstoßung zu erwarten, nicht zuletzt weil an ihr Zellen beteiligt sind, die sich für die Produktion von IL – 6 und TNF  $\alpha$  verantwortlich zeigen.

Im Zusammenhang mit Transplantationen wurde ein erhöhter IL – 6 Spiegel als Marker für die Vorhersage postoperativer Komplikationen [132] und nach Nierentransplantationen als Indikator von Abstoßungsreaktionen [133] beschrieben. Sie sind ferner gut untersuchte und erprobte Zytokine, für die im experimentellen Alltag bewährte Bestimmungsmethoden existieren.

Die Bestimmung von TNF  $\alpha$  – Spiegeln hat sich in Transplantationsuntersuchungen als nützlich herausgestellt. So zeigten sich in Abstoßungsepisoden allogener Nierentransplantate deutlich erhöhte TNF  $\alpha$  – Spiegel [134, 135]. Auch nach Knochenmarktransplantationen ließen sich bei Auftreten von Komplikationen TNF  $\alpha$  – Spiegel feststellen, die deutlich über denen von Kontrollgruppen lagen [136, 137].

## 5.2 Mögliche Ursachen der Spät komplikationen:

### 5.2.1 Fremdkörperreaktion:

Bei den in Koblenz aufgetretenen Abszeßbildungen im Bereich der implantierten Patches kann es sich theoretisch um eine Fremdkörperreaktion handeln, die durch toxische Inhaltsstoffe aus der Herstellung und/oder Lagerung der Patches hervorgerufen wurde.

Folgende Fakten sprechen allerdings gegen diese Hypothese:

Erstens spricht der prozentuale Anteil (8,7%) der von den Komplikationen betroffenen Patienten am Gesamtkrankengut nicht für das Auftreten einer Fremdkörperreaktion.

Bei einer lokalen Intoxikation des Gewebes mit als Fremdkörpern fungierenden chemischen Stoffen wäre eine entsprechende Immunabwehr bei allen immunkompetenten Patienten zu erwarten, die mit dem No – React Patch versorgt wurden.

Des Weiteren ist die im Rahmen einer Fremdkörperreaktion histologisch nachweisbare Granulombildung vom Fremdkörpertyp mit Auftreten von Makrophagenaggregaten

bzw. Riesenzellen typisch. Diese Charakteristika der Fremdkörperreaktion konnten bei drei Patienten in der histologischen Aufarbeitung der Patches nachgewiesen werden, die bei diesen Patienten in Koblenz zu den beschriebenen Abszessen geführt hatten. Bei einem Patienten ließ sich das Granulom nicht als Fremdkörpergranulom definieren. Bei einem anderen Patienten konnten Fadenreste als Ursache der Granulombildung festgestellt werden. Nur beim dritten Patienten gingen die Pathologen von der Einbringung eines löslichen Fremdmaterials aus. Die restlichen zwölf Patienten wiesen überhaupt keine Granulome auf.

Außerdem konnten auch bei der histologischen Aufarbeitung der in den Versuchen verwendeten Patches in keinem Fall granulomatöse Gewebeveränderungen beschrieben werden, was zusätzlich eine Fremdkörperätiologie der Spätkomplikationen ausschließt.

#### 5.2.2 Bakterielle Infektion:

Eine Kontamination des Operationsgebietes mit bakteriellen Erregern und konsekutiver Entzündungsreaktion lässt sich wie folgt diskutieren:

Es sind im Laufe der stationären Aufenthalte der mit den Komplikationen belasteten Patienten Keime in mikrobiologischen Untersuchungen der Abszesse nachgewiesen worden.

Bei sechs Patienten konnten die für die genommenen Abstriche zuständigen Mikrobiologen keine Zuordnung von Kontamination und zugehörigem Zeitpunkt vornehmen.

Gegen die Vermutung einer Verursachung der Abszessbildungen durch eine chirurgische Verschmutzung spricht allerdings das Vorhandensein von Abszesshöhlen bei drei Patienten, die im Verlauf keine Hautperforation aufwiesen. In diesen Fällen konnte keine externe, operative oder postoperative Verunreinigung mit infektiösen Erregern erfolgt sein. Demzufolge waren auch sämtliche abgenommenen, intra – und postoperativen Abstriche keimfrei.

In zwei Fällen gehen die Mikrobiologen von einem Sekundärinfekt nach teilweise monatelanger, offener Wundbehandlung aus. Bei einem Patient lag laut mikrobiologischer Untersuchung eine Kontamination des Abstriches bei der Abnahme vor, unter anderem weil alle anderen Abstriche desselben Patienten steril waren; bei einem weiteren Patienten wird die Kontamination eines Abstriches auf eine Infektion beim Zweiteingriff zurückgeführt.

Ferner waren die intraoperativen Abstriche zweier zusätzlicher Fälle keimfrei.

Hinzu kommt, dass der Zeitpunkt des Auftretens der ersten klinischen Symptome gegen die Ätiologie einer bakteriellen Verunreinigung spricht. Eine entzündliche Reaktion mit Abszeßentwicklung wäre wesentlich früher als erst nach ein paar Monaten zu erwarten.

Außerdem fanden sich bei allen in den mikrobiologisch aufgearbeiteten Proben gewonnenen Keimen günstige Resistenzmuster. Die Bakterien waren also gegen fast alle getesteten Antibiotika sensibel. Dies stellt einen weiteren Hinweis dar, dass es sich um Keime handelte, die zur Hautflora gehörten und sekundär zu einer Kontamination des Wundbereiches führten. Es handelte sich also nicht um Hospitalisationskeime mit für sie typischen Resistenzen.

Zusätzlich gibt auch die Bestimmung des Procalcitonins, das jeweils im Serum bei der Mehrheit der in Koblenz von den Spätkomplikationen betroffenen Patienten vor den jeweiligen Reoperationen zur Entnahme des Patches durchgeführt wurde, einen eindeutigen Hinweis darauf, dass die entzündlichen Reaktionen nicht infektiöser Art sind. Die Werte für das PCT liegen bei allen Patienten unter 0,5 ng/ml, was klar gegen eine bakterielle Genese und für eine chronische Immunreaktion spricht [124, 125, 126].

Ferner führte eine immunsuppressive Therapie bei einem Koblenzer Patienten zur Beschwerdebesserung mit Rückgang der Symptomatik. Eine Reduktion bzw. das Absetzen der Cortisontherapie resultierte in erneuter Exazerbation des inflammatorischen Prozesses. Diese Abhängigkeit der Symptomatik von der Gabe eines Immunsuppressivums macht ebenfalls eine infektiös bedingte Pathogenese der Abszeßbildungen sehr unwahrscheinlich, da durch die Unterdrückung der Immunantwort eine rasche Verschlechterung der Entzündungssituation zu erwarten gewesen wäre. Im Gegensatz dazu legt das Verhalten des Krankheitsverlaufes unter Cortisontherapie eine immunologische Reaktion nahe, wie sie bei der xenogenen Abstoßung beispielsweise auftritt.

### 5.2.3 Xenogene Abstoßung:

Basierend auf der Diskussion zwischen den Herzchirurgen des Koblenzer Bundeswehrzentralkrankenhauses und dem amerikanischen Hersteller der Patches Shelhigh, haben wir uns der Hypothese einer möglichen xenogenen Abstoßungsreaktion zugewandt. Seitens der Koblenzer Chirurgen wird für die Entstehung der Spät komplikationen eine immunologische Genese im Sinne einer Abstoßung nach Xenotransplantation vermutet; im Gegensatz dazu zieht Shelhigh eine iatrogen bedingte, bakterielle Kontamination als Ursache der Spät komplikationen in Betracht.

## 5.3 Ergebnisse:

### 5.3.1 : Interleukin – 6:

Für die anhand der Experimente erhaltenen IL – 6 – Ergebnisse lassen sich folgende, hinweisgebende Schlüsse über das No – React – Patch ziehen:

Beim Vergleich der Patchgruppen No – React und Periguard mit den jeweils zugehörigen Kontrollen fällt auf, dass in fast allen Versuchssuspensionen an den verschiedenen Versuchstagen 1, 3 und 5 die Produktion von Interleukin – 6 in Anwesenheit der xenogenen Materialien signifikant höher liegt als in den Kontrollen. Demnach führen sowohl No – React als auch Periguard zu einer klar erkennbaren Aktivitätssteigerung des mononukleären Zellkonzentrats als Zeichen einer gesteigerten Immunreaktion auf den Stimulus „xenogenes Gewebe“.

Ausnahmen hierzu bilden die Gegenüberstellungen von No – React und Periguard untereinander und mit den jeweiligen Kontrollen im Komplement – defizienten Serum an Versuchstag 1 sowie im Normalserum an Tag 5.

Hier sind innerhalb der Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede für die Interleukin – 6 – Produktion zu beobachten, selbst die Patchgruppen zeigen zur Kontrolle keine statistisch greifbare Zytokindifferenz.

Unserer Auffassung nach sind diese genannten Ausreißer damit zu begründen, dass im Rahmen der Versuchsreihe in Abhängigkeit vom verwendeten Probandenserum unter gleichen Versuchsbedingungen durchgehend sehr divergierende Ergebnisse in der Zytokinsynthese erzielt wurden, d. h., dass die mononukleären Zellen der einzelnen Probanden also in äußerst unterschiedlichem Maße mit der Produktion von IL – 6 reagierten.

Diese teils enormen Abweichungen in der IL – 6 – Produktion zwischen den Proben der zehn Probanden werden durch die während der Versuchsauswertung beobachteten, hohen Standardabweichungen repräsentiert (s. 5.3.3).

Desweiteren ist festzuhalten, dass signifikante Unterschiede in der Sekretion von IL – 6 durch das mononukleäre Zellkonzentrat regelmäßig auch im Komplement – depletierten Medium (inaktives Serum) auftreten.

Der Stimulus, der im mit den bovinen Patches koinkubierten, inaktiven Serum zur statistisch verifizierbaren Erhöhung der Zytokinsynthese führt, scheint folglich eine Immunreaktion hervorzurufen, die von der Anwesenheit bzw. Beteiligung des Komplementsystems unabhängig ist.

Bei der Betrachtung der IL – 6 – Mengen in den unterschiedlich mit Serum angereicherten Suspensionen (RPMI 5% und Normalserum zu 100%) präsentieren sich in beiden Medien in gleichem Maße verteilt signifikante Wertedifferenzen für Interleukin – 6 in den Patchgruppen im Vergleich zur Kontrolle. Demnach hat die Abstufung der Serumkonzentration keine statistisch erkennbare Differenz im Hinblick auf die IL – 6 – Synthese hervorgebracht, die auf eine Verstärkung der beschriebenen Immunreaktion bei Zunahme der Serumkonzentration (und damit der Komplementkonzentration) oder im Umkehrschluss auf eine Reduktion der Zellaktivität bei Verringerung der Serummenge (und damit der Komplementmenge) schliessen lassen könnte.

Als einzige signifikante Differenz zwischen den bovinen Patches stellt sich die Interleukin – 6 – Synthese im RPMI 5% an Tag 3 der Versuchsreihe dar. Die Interpretation des Einzelergebnisses ließe den Schluss zu, dass sich das No – React – Patch im Bezug auf die IL – 6 – Synthese als Auslöser einer deutlich gesteigerten immunologischen Aktivität nicht nur von der Kontrolle, sondern in seinem proinflammatorischen Potenzial auch von dem Vergleichspatch Periguard klar abhebt. Das hieße, dass das No – React – Patch eine zellstimulierende Eigenschaft aufweist, die signifikant über der des Periguard – Patches liegt.

Dieser Trend wird an Tag 5 – ebenfalls im RPMI5% - nur knapp verfehlt ( $p = 0,056$ ). Es liegt unserer Meinung nach nahe, dass ebenfalls an Tag 5 im RPMI 5% eine grundsätzlich unterschiedlich starke Reaktion der mononukleären Zellen nach der Inkubation mit den verschiedenen Patches besteht, die ein signifikant höheres Inflammationspotenzial des No – React – Patches gegenüber Periguard bestätigt.

Auch hier ist zu vermuten, dass die den Versuch begleitende, sehr divergierende Reaktionsbreite der MNK der einzelnen Probanden anscheinend dazu geführt hat, dass sich ein statistisch verifizierbarer Unterschied in der IL – 6 – Synthese beim Vergleich von No – React und Periguard nicht ausgebildet hat.

Insgesamt aber lässt sich aus dem Überblick über die diskutierten Ergebnisse der Interleukin – 6 – Bestimmung kein Trend ableiten, der eindeutig auf gegenüber dem Periguard – Patch signifikant höhere, proinflammatorische Eigenschaften des No – React – Patches hinweist.

Um zu einer solchen Schlussfolgerung zu kommen, wären sowohl im RPMI 5% als auch im Normalserum sowie bei offensichtlich für die Interleukin – 6 – Synthese geltende Komplement – Unabhängigkeit der Reaktion der mononukleären Zellen auch im inaktiven Serum regelmäßiger, signifikant unterschiedliche IL – 6 – Werte beim Vergleich von No – React und Periguard zu erwarten gewesen.

Aufgrund dieser Beobachtungen scheint Interleukin – 6 im Rahmen unserer Versuchsdurchführung kein geeigneter Marker für den Nachweis einer xenogenen Abstoßungsreaktion bei der Beurteilung des No – React – Patches zu sein.

Die verschiedenen IL – 6 – Konzentrationen der No – React – Gruppe in den einzelnen Suspensionen veränderten sich über den Versuchszeitraum nicht signifikant. Es kam also über die Versuchstage gesehen nicht zu statistisch verifizierbaren Wertezuw – oder – abnahmen. Es lässt sich schlussfolgern, dass sich in den ersten Tagen nach Inkubation des No – React – Patches mit mononukleären Zellen eine ab dem ersten Tag auftretende, frühzeitige Zellaktivierung finden lässt, die sich innerhalb einer Woche nicht in bedeutendem Maße reduziert oder steigert.

### 5.3.2 TNF $\alpha$ :

Die Ergebnisse der TNF  $\alpha$  – Bestimmung lassen im Gegensatz zum Interleukin – 6 eindeutige Erkenntnisse über das No – React – Patch zu.

Grundsätzlich ist bei der näheren Betrachtung der Ergebnisse für die mit Periguard inkubierten Gruppen festzuhalten, dass Kontrolle und Periguard statistisch gesehen keine Differenzen in der TNF  $\alpha$  – Produktion ergeben. Diese Feststellung gilt durchgehend für alle Medien und für den gesamten Zeitraum der TNF  $\alpha$  – Bestimmung. Dies bedeutet, dass das Periguard – Patch trotz seines xenogenen Ursprungs nicht zu einer zusätzlichen TNF  $\alpha$  – Produktion führt, sondern die Grundaktivität der mononukleären Zellen – repräsentiert durch die Zytokinkonzentrationen in den Kontrollen – unbeeinflusst lässt. Dementsprechend kann gefolgert werden, dass die vom Hersteller Synovis nach der sogenannten „Apex Processing™“ – Methode durchgeführte Präparation des Periguard - Patches im Hinblick auf die Stimulation der TNF  $\alpha$  – Synthese zumindest eine massive Reduktion der Immunogenizität des bovinen Gewebes zur Folge hat.

Das auffälligste Ergebnis der Versuche zur Bestimmung von TNF  $\alpha$  findet sich an allen drei Versuchstagen gleichermaßen im Normalserum.

Hier kommt es durchgehend zu signifikanten Unterschieden in der Synthese von TNF  $\alpha$  zwischen No – React – und Kontroll – Gruppe einerseits sowie zwischen No – React – und Periguard – Gruppe andererseits.

Es lassen sich daher bei der Interpretation der TNF  $\alpha$  – Resultate im Bezug auf das No – React – Patch den Ergebnissen der Periguard – Gruppen gegenüber konträre Aussagen treffen:

Die in den No – React – Gruppen erreichten, signifikant höheren TNF  $\alpha$  – Konzentrationen sprechen klar für eine vom No – React verursachte Reaktion der mononukleären Zellen auf die Inkubation mit dem Patchgewebe. Dabei verdeutlicht nicht nur der Unterschied zur Kontrolle das proinflammatorische Potenzial des No – React – Patches, sondern vor allem auch die divergente Zellaktivierung, die in der No – React – Gruppe im Hinblick auf das Vergleichspatch Periguard stattfindet. Das No – React – Gewebe stellt also offensichtlich einen aktivierenden Stimulus für die mononukleären Zellen dar, während eine solche Aktivierung bei der Inkubation mit Periguard ausbleibt.

Zu denselben Ergebnissen gelangt man im RPMI 5% an Tag 1. Auch hier hebt sich die No – React – Gruppe in der TNF  $\alpha$  – Synthese mengenmäßig statistisch eindeutig von Kontroll – und Periguard – Gruppe ab, während Kontrolle und Periguard ein vergleichbares, statistisch nicht unterschiedliches Niveau an Zytokinkonzentration erreichen.

An den Versuchstagen 3 und 5 entwickeln sich im RPMI 5% zwischen den drei verschiedenen Versuchsgruppen keine signifikanten Zytokinunterschiede mehr. Allerdings verfehlen die in den No – React – Gruppen gemessenen TNF  $\alpha$  - Mengen an diesen Tagen nur knapp die Signifikanzhürde von  $p = 0,05$  (an Tag 3:  $p = 0,066$ ; an Tag 5:  $p = 0,056$ ).

Der Grund hierfür liegt unseres Erachtens zum einen wiederum an der sehr verschiedenartigen Intensität, mit der die Spenderzellen der einzelnen Probanden auf den Kontakt mit No – React – Material reagierten, und aus denen sich die sehr hohen Standardabweichungen herleiten lassen (s. 5.3.3). Wir halten die hohe Varianz der Zytokinkonzentrationen für das Nicht – Zustandekommen signifikanter Differenzen zwischen No – React und den anderen Versuchsgruppen an den Versuchstagen 3 und 5 im RPMI 5% für verantwortlich, zumal ein signifikanter Unterschied gleich zu Versuchsbeginn (Tag 1) nachweisbar war.

Dass signifikante Unterschiede der Gruppen untereinander im RPMI 5% nach Tag 1 nicht weiter zu beobachten sind, könnte zum anderen dadurch erklärt werden, dass dem RPMI ein nur 5%iger Serumanteil zugegeben wurde und damit die Anwesenheit von Komplement in diesem Medium mengenmäßig begrenzt war.

Als Folge davon würde eine Abstufung in der Quantität der Zellantwort resultieren. Die limitierte Komplementkonzentration könnte unserer Auffassung nach dazu geführt haben, dass das vorhandene Komplement bei der vermuteten Komplement – benötigten Zellaktivierung rasch aufgebraucht und ein Fortschreiten der Reaktion somit verhindert wurde. Durch die Behinderung der Zellantwort auf den Stimulus No – React – Patch käme es folglich auch zu einer erniedrigten Zytokinsynthese, die sich wiederum in gegenüber den Vergleichsgruppen fehlenden Signifikanzen äußern würde. Anhaltspunkte dafür lassen sich aus folgenden Beobachtungen für die TNF  $\alpha$  – Bestimmung ziehen:

Zum einen treten – wie schon beschrieben – im normalen Serum, in dem Komplement in physiologischer Konzentration zu 100% enthalten ist, regelmäßig Zytokinwerte in den No – React – Gruppen auf, die klar über Kontrolle und Periguard – Gruppe liegen. Bei genügendem Komplementangebot, wie es auch der Situation im Patientenorganismus am nächsten kommt, scheint also die Eigenschaft des No –



React – Patches, eine Komplement – abhängige, immunologische Zellreaktion hervorzurufen, voll zum Tragen zu kommen.

Zum anderen sind im inaktiven Serum, in dem Komplement vollständig im Hitzebad inaktiviert wurde, zu keinem Zeitpunkt der Versuchsreihe Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen feststellbar. Daraus folgern wir, dass es sich bei der vom No – React – Patch bedingten Aktivierung der Zellen um einen komplementabhängigen Prozess handelt. Dieser kann mit einer Immunreaktion im Sinne einer xenogenen, Antikörper - vermittelten Abstoßung in Einklang gebracht werden.

Im Gegensatz zum Interleukin – 6 zeigt die TNF  $\alpha$  – Bestimmung den ganz eindeutigen Hinweis darauf, dass das No – React – Patch nach seiner von Shelhigh nach der „No – React“ – Methode vollzogenen Vorbehandlung noch beträchtliche, immunogene/antigene Eigenschaften aufweist, die in – vitro zu einer signifikanten Aktivierung von mononukleären Zellen geführt hat.

Die Beobachtung, dass es sich bei dieser Zellaktivierung um einen streng Komplement – abhängigen Vorgang handelt, untermauert zusätzlich die Hypothese einer Immunreaktion im Sinne einer xenogenen Abstoßung.

Für die Betrachtung der einzelnen Suspensionen über den zeitlichen Versuchsverlauf sind keine statistisch bestimmbaren Unterschiede für die No – React – Gruppe zu finden, d. h. dass es innerhalb der Kulturmedien (wie z. B. des Normalserums) von Tag 1 über Tag 3 bis zum fünften Versuchstag nicht zu signifikanten Veränderungen der TNF  $\alpha$  – Konzentrationen im No – React kam. Die proinflammatorische Zellaktivierung durch das No – React – Patch scheint also zumindest während der ersten 5 Tage nach Inkubation keinerlei nennenswerten Schwankungen zu unterliegen und vom Versuchsbeginn zu bestehen.

### 5.3.3 Standardabweichungen:

Die bei den Zytokinbestimmungen ermittelten, hohen Standardabweichungen verdeutlichen eine sehr große Bandbreite, mit der die Probanden auf eine Inkubation ihrer mononukleären Zellen mit den Patches während des Versuches reagierten. Unter den zehn Probanden, die sich für die Versuchsreihe zur Verfügung gestellt hatten, fiel uns auf, dass sich drei durch enorm höhere Zytokinproduktionen bei der Inkubation ihrer mononukleären Zellen mit Patchmaterial auszeichneten, als das bei den restlichen Blutspendern der Fall war.

Bei anamnestisch für diese drei Probanden geltendem, im Laufe ihres Lebens regelmäßig erfolgtem Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten lässt sich rein theoretisch die Vermutung anstellen, dass ihr Immunsystem durch diverse Konfrontationen mit tierischen Antigenen zu einer verstärkten Sensibilisierung gegen diese Antigene geführt hat. Im Rahmen dieser Hypothese einer Sensibilisierung ist es denkbar, dass dadurch bei den genannten, drei Probanden überdurchschnittlich hohe Zytokinkonzentrationen zu bestimmen waren. Die im Vergleich mit den anderen Versuchspersonen teilweise über zehnfach höheren Zytokinkonzentrationen der drei „Extremreagierer“ ist hauptsächlich für das Entstehen der hohen Standardabweichungen verantwortlich.

Die Annahme einer Sensibilisierung ließe sich für den ersten Ansatz auch mit den am Koblenzer Krankenhaus berichteten Komplikationen in Einklang bringen, da auch in der klinischen Situation nur ein geringer Prozentsatz der Patienten von den postoperativen Beschwerden betroffen war.

Um diese Theorie allerdings wirklich beurteilen zu können, müsste die Fallzahl des Versuchs weiter erhöht werden, um so die Rolle einer Sensibilisierung als wichtige Grundvoraussetzung für die beobachteten Reaktionen zu konkretisieren bzw. dann eine repräsentative Verteilung in der Bevölkerung erkennen zu lassen. Außerdem setzt dieser Ansatz natürlich das Vorhandensein tierischen Antigens auf den No – React – Patches voraus, durch das es zu einer Immunreaktion im Sinne einer xenogenen Abstoßung käme.

Die Versuchsprotokolle liefern keine stichhaltigen Hinweise auf eine Verursachung der divergierenden Standardabweichungen durch einen systematischen Fehler in der Versuchsdurchführung.

Die Suche nach der Ursache dieser Problematik mitsamt statistischen Untersuchungen in Form von Inter – und Intra – Assay – Variabilitätsanalysen sind ausserhalb dieser Arbeit geplant.

Bei der Betrachtung der Standardabweichungen im Einzelnen stellt man zwar häufig auch schon in den Kontrollgruppen deutliche Variationen fest, die ihren Grund in der natürlicherweise verschiedenen Immunaktivität des MNK der einzelnen Probanden haben.

Auffällig ist, dass in Abhängigkeit vom untersuchten Zytokin die Standardabweichungen der Patchgruppen gegenüber der Kontrolle unterschiedliche Tendenzen aufweisen.

Für die Bestimmung von IL – 6 gilt demnach, dass die Standardabweichungen in den Patchgruppen deutlich höher liegen als in der Kontrolle. Bei der genaueren

Betrachtung der Standardabweichungen der Patchgruppen untereinander lassen sich keine regelmäßigen Trends erkennen. Diese Beobachtung passt tendenziell auch zu den in den Experimenten gemessenen IL – 6 – Spiegeln.

Dadurch, dass bei der IL – 6 - Bestimmung in beiden Patchgruppen in ähnlicher Weise hohe Standardabweichungen auftreten, wird ein weiterer Hinweis darauf gegeben, dass auch eine immunologische Reaktion nach Inkubation des MNK mit beiden Patches stattfindet. Denn die sensibilisierten Probanden, die auch schon bei der Inkubation mit dem No – React – Patch hohe Zellaktivität durch hohe Zytokinproduktion präsentierten und damit hohe Standardabweichungen verursachten, waren auch bei der Inkubation mit dem Periguard – Patch für dieselben Effekte verantwortlich. Es schienen sich allerdings die mononukleären Zellen durch das No – React – Patch im Bezug auf die absolute Zytokinquantität mehr aktivieren zu lassen als durch das Periguard – Patch.

Bei den TNF  $\alpha$  – Untersuchungen tritt wiederum ein anderes Bild auf. Ebenfalls entsprechend der im Versuch bestimmten Zytokinmengen erreichen die Standardabweichungen von Kontrolle und Periguard ein sehr ähnliches Niveau. Die Abweichungen der Periguard – Gruppe sind wie auch die TNF  $\alpha$  – Werte teilweise unter der Variationsbreite der Standardabweichungen der Kontrolle wiederzufinden.

Die Standardabweichungen in den No – React – Gruppen dagegen sind speziell im normalen Serum wesentlich höher als in den beiden anderen Gruppen. Dass sich die Variationsbreite der Standardabweichungen der Patchgruppen klar unterscheidet, weist darauf hin, dass auch die an den verschiedenen Patches ablaufende Reaktion des MNK unterschiedlichen Charakters ist. Insbesondere bei den drei „Extremreagierern“, deren Zytokinproduktion nach Inkubation mit dem No – React – Patch wieder deutlich über den Zytokinkonzentrationen des restlichen Probandenpools zu liegen kam, entstand bei der Inkubation mit Periguard eine dem Durchschnitt entsprechende TNF  $\alpha$  – Synthese.

Ferner wird auch die anhand der Zytokinergebnisse anzunehmende Komplementabhängigkeit der MNK – Reaktion durch die Verteilung der Standardabweichungen bekräftigt. Die Variationsbreite im normalen Serum ist mit Abstand am größten. Dadurch, dass Komplement in diesem Medium nicht restringiert war, konnten vor allem auch wieder die sensibilisierten Probanden für enorme Ausreißer in der Zytokinproduktion sorgen, woraus die hohen Standardabweichungen in der No – React – Gruppe im Serum zu erklären sind.

#### 5.3.4 Histologie/Immunhistochemie:

Die Gegenüberstellung der Nativpräparate von No – React und Periguard brachte auch auf histologischer Ebene klare Unterschiede hervor. Das Periguard – Patch wirkte mikroskopisch betrachtet inhomogen, devitalisiert und unregelmäßig in seiner Gewebeanordnung. Es liegt nahe, dass dies der Effekt einer aggressiveren Vorbehandlung ist, als das beim No – React – Patch der Fall zu sein scheint. Denn die homogene, weiche und regelmäßige Struktur des No – React – Patches und das Vorhandensein zahlreicher, klar identifizierbarer Endothelien und Zellkerne im gesamten Präparat geben einen Hinweis darauf, dass trotz der Vorbehandlung des bovinen Materials nach der No – React – Methode Gewebekomponenten mit potentiell antigenen Eigenschaften im Präparat erhalten bleiben.

Dieser Eindruck bestätigte sich auch anhand der Darstellung der drei verschiedenen immunhistochemischen Färbungen:

Durchgehend kam es im No – React - Patch zu Ablagerungen der jeweils angefärbten Immunkomponenten MAC, C3c und der Immunglobuline (IgM, IgG, IgA), wenn die No – React – Produkte mit normalem Serum inkubiert waren. Dies war im RPMI 5% und natürlich im Normalserum der Fall. Einzige Ausnahme bildeten die No – React – Patches, die für die Ig – Färbung verwendet wurden, und die während des Versuchs im RPMI 5% gelagert waren. Bei ihnen konnten keine Depositionen entdeckt werden. Die aus den Färbungen resultierenden Markierungen von MAC, C3c und Immunglobulinen in den No – React - Patches sprechen eindeutig für das dortige Vorhandensein und die immunologische Erkennung antigenen Strukturen. Diese waren vorzugsweise im Bereich noch vorhandener Endothelien anzutreffen und fanden sich zusätzlich in unterschiedlichem Ausmaß auch an Zellkernen, die im kollagenen Bindegewebe der No – React – Produkte lagen.

Dabei war anhand der Verteilung und der Stärke der immunhistochemischen Anfärbungen der Zellen im Präparat ein quantitativer Unterschied zwischen No – React – Patches erkennbar, die mit RPMI 5% oder mit Normalserum inkubiert waren:

In der Regel zeigten die Immunablagerungen der mit RPMI 5% behandelten Gewebe eine schwächere Braunfärbung als die Patches, die im Normalserum gelagert waren. Ferner fiel auch die Anzahl der Ablagerungen im RPMI 5% meist geringer aus als im Normalserum. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass im RPMI 5% durch das begrenzte Angebot an Serum und damit ebenfalls an Komplement nicht die

Intensität an MAC - , C3c - oder Ig – Depositionen erreicht werden konnte, wie sie im normalen Serum mit physiologischer Komplementkonzentration zu beobachten war.

Im Hinblick auf die Periguard – Patches ist festzustellen, dass nach Lagerung in RPMI 5% bei den immunhistochemischen Untersuchungen in keinem Fall Ablagerungen gefunden werden konnten. Waren die Patches mit normalem Serum inkubiert, zeigten sie meist schwache und sehr vereinzelte Anfärbungen, die insbesondere quantitativ eine deutliche Differenzierung zum No – React zuließen. Während das zum RPMI zu 5% hinzugegebene Serum bei den No – React – Materialien noch zu Depositionen der jeweiligen Immunkomponenten führte, scheint der Anteil an Serum im RPMI bei den Periguard – Patches nicht für eine Demarkierung von MAC, C3c oder Ig ausgereicht zu haben.

Auffällig ist vor allem, dass die Gewebe sowohl der No – React - als auch der Periguard - Patches ausnahmslos ungefärbt blieben, wenn sie im Verlauf der Versuche in inaktivem, komplementdefizientem Serum gelagert waren.

Diese Feststellung deutet im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Ergebnissen klar darauf hin, dass aufgrund des Mangels an Komplement Ablagerungen der Immunkomponenten ausgeblieben sind bzw. verhindert wurden. Ohne das Vorhandensein der Komplementfaktoren konnten folglich die immunologischen Reaktionen, wie sie unter gleichen Versuchsvoraussetzungen im normalen Serum noch eindrucksvoll zu sehen waren, und wie sie im Rahmen der vermuteten xenogenen Abstoßung ablaufen, nicht in Gang kommen.

Die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen im Einklang mit den histologischen und immunhistochemischen Resultaten lassen damit die Schlussfolgerung zu, dass sich die in Koblenz beobachteten Spätkomplifikationen auf der Basis einer komplement – abhängigen, Antikörper – vermittelten, xenogenen Abstoßungsreaktion entwickelt haben. Dabei scheinen die No – React – Patches trotz der „No – React“ – Vorbehandlung als Träger boviner Antigene zu Immunreaktionen o.g. Typs bei Patienten geführt zu haben, bei denen eine im Laufe des Lebens erworbene Sensibilisierung, wie sie aus den Versuchsergebnissen abgeleitet werden kann, zu vermuten ist.

## 6. Zusammenfassung:

In Koblenz wurden 172 Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen mit bovinen Perikardpatches der Firma Shelhigh zur Rekonstruktion des Herzbeutels versorgt. Diese Patches wurden mit einer vom Hersteller nicht näher erläuterten, schonenden Methode vorbehandelt, die sich „No – React“ nennt. Sie hat das Ziel, neben Fixierung und Präparation des Materials eine bessere Biokompatibilität und Antikalzifizierungseigenschaften des Produktes zu erreichen und damit einem funktionellen Versagen des Implantats vorzubeugen.

Bei 15 Patienten (8,7%) kam es mit durchschnittlich 7,9 - monatiger Verzögerung nach dem Primäreingriff zu unspezifischen, abszessbildenden Entzündungsreaktionen, die enge, topographische Beziehungen zu den implantierten Patches aufwiesen, und die in acht Fällen zu einer Hautperforation führten.

Folglich stellte sich die Frage nach dem Entstehungsmechanismus der Spätkomplikationen. Neben klinischen Untersuchungen der in Reoperationen bei den betroffenen Patienten explantierten No – React – Patches in Koblenz wurden zur Klärung der Ätiologie im Rahmen dieser Arbeit experimentelle Untersuchungen über das No – React – Patch durchgeführt.

Ziel der Arbeit war es, eine Antikörper – vermittelte, komplement – abhängige, xenogene Abstoßungsreaktion als Ursache der Spätkomplikationen in Koblenz auszuschließen bzw. nachzuweisen.

Aus dem Blut zehn freiwilliger Probanden wurden Serum und mononukleäres Konzentrat isoliert, die der Herstellung der Versuchsansätze dienten. Diese setzten sich aus Kombinationen von RPMI mit 5%igem Serumanteil, normalem Serum oder komplement - depletiertem Serum mit oder ohne mononukleärem Zellkonzentrat und den jeweiligen Patches No – React oder Periguard zusammen. Als Kontrollen fungierten Suspensionen mit MNK, aber ohne Patches. In den zu den festgesetzten Versuchstagen gewonnenen Überständen der Suspensionen sowie deren Kontrollen wurden mittels ELISA die proinflammatorischen Zytokine Interleukin – 6 und TNF  $\alpha$  bestimmt.

Die in den Versuchen verwendeten Patches wurden histologisch und immunhistochemisch untersucht, wobei in den Präparaten der „Membrane attack complex“, der Komplementfaktor C3c und die Immunglobuline IgM, IgG und IgA angefärbt wurden.

Die Experimente führten schließlich zu folgendem Ergebnis:

Eine Verursachung der unspezifischen Entzündungsreaktionen durch eine Fremdkörperreaktion scheidet aus. Der niedrige, prozentuale Anteil der betroffenen Patienten spricht ebenso gegen eine Fremdkörperätiologie der Beschwerden wie die Abwesenheit von Granulomen in der histologischen Aufarbeitung der Patches, die sowohl für die in Koblenz entnommenen als auch im Verlauf der Versuche angefertigten Proben durchgeführt wurden.

Eine bakterielle Kontamination und damit Verunreinigung des Operationsgebietes während der Eingriffe ist ebenfalls als primäre Ursache auszuschließen. Die bei den Koblenzer Patienten gewonnenen Sekrete wurden bakteriologisch und klinisch/chemisch untersucht. Bei von der Aussenwelt abgeschlossenen Prozessen wurde keine bakterielle Kontamination gefunden. Spätere Besiedlungen der Serome waren sekundärer Natur. Testungen der Patientenserum auf Procalcitonin waren zum Zeitpunkt des Auftretens der Komplikationen immer negativ. Procalcitonin ist ein hoch sensibler Marker für lokale und systemische, bakterielle und fungale Infektionen.

Es kann für die experimentellen Untersuchungen festgehalten werden, dass das No – React – Patch in den Versuchen durchgehend ein stark proinflammatorisches Potenzial demonstrierte und in allen Suspensionen die höchsten, absoluten Zytokinkonzentrationen präsentierte. Dieses Potential erwies sich in den meisten Fällen als signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen. Derartige Signifikanzen traten überdies bei dem Vergleich des No – Reacts mit Periguard in einem Ausnahmefall bei der IL – 6 – Bestimmung und fast permanent im Rahmen der TNF  $\alpha$  – Bestimmung auf.

Interleukin – 6 erschien als Indikator für die vermutete, xenogene Immunreaktion aufgrund fehlender, regelmäßiger signifikanter Unterschiede zwischen den Patchgruppen sowie zwischen komplement – enthaltenden und – defizienten Versuchssuspensionen als ungeeignet.

Aus der Analyse der TNF  $\alpha$  - Ergebnisse war eindeutig abzuleiten, dass die vom No – React – Patch hervorgerufene, immunologische Reaktion des MNK nicht nur ein gegenüber dem Vergleichspatch Periguard signifikant höheres, proinflammatorisches Potenzial widerspiegelte, sondern zusätzlich Komplement – abhängig war. Bei normaler Komplementkonzentration in den Versuchsansätzen kam es zur Ausprägung signifikanter Unterschiede zwischen No – React und Periguard. Wurde inaktives Serum ohne Komplement beigefügt, ließen sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen

den beiden Patches herleiten. Eine mengenmäßige Einschränkung des Serums und damit der Komplementkonzentration endete darin, dass signifikante Unterschiede beim Vergleich der Patches nur unregelmäßig nachgewiesen werden konnten.

Auffällig war außerdem, dass Probanden, die lange Zeit und intensiv mit Tieren Kontakt hatten, wesentlich höhere Werte entwickelten als nicht – sensibilisierte Blutspender, was sich in hohen Standardabweichungen niederschlug.

Dem Fall der erwähnten „Extremreagierer“ könnte demnach eine im Laufe des Lebens erfolgte, überdurchschnittliche Sensibilisierung gegen tierische Antigene zugrundeliegen, die auch den geringen, prozentualen Anteil der in Koblenz von den Spätkomplikaationen betroffenen Patienten erklären könnte. Eine eindeutige Aussage zur Klärung der divergierenden Zytokinproduktion der verschiedenen Probanden ist aufgrund der Ergebnisse der Arbeit allerdings nicht zu treffen.

Diese Beobachtung und die eindeutigen Resultate aus der TNF  $\alpha$  – Bestimmung lassen auf eine xenogene Reaktion von natürlichen, präformierten Anti – Rind – Antikörpern gemeinsam mit Komplement gegen noch auf den No – React – Patches vorhandene Rinderantigene schließen.

Die beschriebenen Erkenntnisse werden ferner durch die histologischen bzw. immunhistochemischen Untersuchungen gestützt. In den Nativpräparaten zeigten sie für das No – React – Patch eine gegenüber dem Periguard gut erhaltene, kollagene Bindegewebsstruktur mit eindeutig identifizierbaren Gewebekomponenten (Endothel und Zellkerne), die zudem noch zahlreicher im No – React aufzufinden waren als im Periguard.

Die Färbungen der Patches mit MAC, C3c und den Immunglobulinen IgM, IgG und IgA ergaben für das No – React – Patch nach Inkubation mit komplement – enthaltendem Serum (RPMI 5% und Normalserum) durchgehend eindeutige Ablagerungen im Gewebe, während diese im Periguard nur nach Lagerung in normalem Serum auftraten und zudem klar geringer ausgeprägt waren.

Wie schon bei der TNF  $\alpha$  – Bestimmung resultierte eine Abstufung der Komplementkonzentration (RPMI 5%) auch in einer im Vergleich zum 100%igen Serum (normales Serum) abgeschwächten Reaktion im Gewebe der Patches. Ebenso lässt sich anhand der immunhistologischen Bilder die Komplementabhängigkeit der vermuteten, xenogenen Abstoßungsreaktion bestätigen, da es ohne die Anwesenheit von Komplement in keinem Fall zu Ablagerungen in den Patchgeweben kam.



Abschließend lassen sich nach Erhebung und Interpretation aller Versuchsergebnisse für das nach der No – React – Methode modifizierte, wie in Koblenz angewandte, bovine Patch klare Hinweise auf bestehende, antigene Eigenschaften aufdecken, die unserer Ansicht nach zu Immunreaktionen führen können, wie sie im Rahmen einer xenogenen, komplement – abhängigen Abstossungsreaktion typischerweise auftreten.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Dahm, M.; Husmann, M.; Eckard – Meyer; Prufer, D.; Groh, E.; Oelert, H.  
Relevance of immunologic reactions for tissue failure of bioprosthetic heart valves.  
Ann Thorac Surg. 1995; 60 (2): 348 - 52
2. Drenckhahn, D.; Zenker, W.  
Benninghoff Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen  
Urban & Schwarzenberg; 1994
3. Borst, H.G.; Kliner, W.; Oelert, H.  
Kirschnersche allgemeine und spezielle Operationslehre Band 2, Herzchirurgie Teil 2  
Springer - Verlag Berlin 1991; 2. Auflage
4. Koch, T.; Berg, R.  
Lehrbuch der Veterinär – Anatomie  
Band III, 5. Auflage  
Gustav Fischer Verlag; Jena, Stuttgart 1993
5. Seiferle, E.  
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere  
Band III, 3. Auflage  
Medizinverlage Stuttgart; 1996
6. Ellenberger, W.; Baum, H.  
Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere  
Springer – Verlag Heidelberg; 18. Auflage; 1977
7. Wehner, R.; Gehring, W.  
Zoologie  
Georg – Thieme – Verlag 1995; 23. Auflage
8. Hammer, C.; Linke, R.; Wagner, F.; Diefenbeck, M.  
Organs from animals for man.  
Int. Arch Allergy Immunol. 1998; 116 (1): 5 – 21
9. Tscheliessnigg, K. H.  
Zur hämodynamischen Bedeutung des Perikards  
Acta Chirurgica Austriaca [Suppl]. 47; 1982
10. von Segesser, L. K.; Cox, J.; Faidutti, B.  
Equine pericardial Xenograft in orthotopic position: Early results.  
Thorac Cardiovasc Surgeon 1986; 35-38

11. Daughters, G. T.; Frist, W. H.; Alderman, E. L.; Derby, G. C.; Ingels, N. B. Jr; Miller, D. C.  
Effects of the pericardium on left ventricular diastolic filling and systolic performance early after cardiac operations.  
J. Thorac Cardiovasc Surg. 1992; 104 (4): 1084 – 91
  
12. von Segesser, L. K.; Jornod N.; Faidutti, B.; Turina M.  
Indications for pericardial Glutaraldehyd-preserved Xenograft in Repair of Congenital Heart Disease  
Journal of Cardiac Surgery 1989; Vol.4, No 2
  
13. Li, J.-Y.; Chen, Y.-S.; Wu, S.-J.; Hu, P.-Y.  
Modified pericardial Closure to protect internal Mammary Artery Grafts in Coronary Artery Bypass.  
Thorac Cardiovasc Surgeon 2002; 50: 182-183
  
14. von Segesser, L. K.; Jornod N.; Faidutti, B.  
Repeat Sternotomy after reconstruction of the pericardial sac with Glutaraldehyd - preserved equine pericardium.  
From the Department of Surgery, Geneva University Hospital, 1986
  
15. Shiaki, Kawada et al.  
Surgical Treatment of a Distal Arch Pseudoaneurysma and Migrated Stent – graft after Interrupted Aortic Arch Repair.  
Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2000; Vol. 6, No 5
  
16. Abolhoda, A.; Yu, S.; Oyarzun, J. R.; McCormick, J. R.; Bogden, J. D.; Gabbay, S.  
Calcification of Bovine Pericardium: Glutaraldehyde Versus No – React Biomodification.  
Ann Thorac Surg. 1996; 62: 169 – 74
  
17. Youmans, C. R.; White, J.; Derrick, J. R.  
The prevention of pleural and pericardial adhesions with Silastic.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 1968; 55: 383 - 3
  
18. Mazuji, M. K.; Lett, J. C.  
Siliconized Dacron as a pericardial patch  
Arch Surg 1963; 87; 104 – 7
  
19. Mester, C. A.; Comas, J. V.; Ninot, S.; et al.  
The use of polyurethane urea (Mitrathane) and polytetrafluoroethylene (Gore – Tex) membrane for pericardial closure; initial clinical results.  
Thai J Surg 1986; 125 - 8
  
20. Revuelta, J. M.; Gracia – Rinaldi, P.; Val, F.; et al.  
Expanded polytetrafluoroethylene surgical membrane for pericardial closure.  
J Thorac Cardiovasc Surg 1985; 89: 451 - 5

21. Minale, C.; Hollweg, G.; Nicol, S.; et al.  
Closure of the pericardium using expanded polytetrafluoroethylene (Gore – Tex) surgical membrane: clinical experience.  
J Thorac Cardiovasc Surg 1987; 35: 312 - 6
22. Kohanna, F. H.; Adams, P. X.; Cunningham, J. N.; et al.  
Use of autologous fascia lata as a pericardial substitute following open – heart surgery.  
J Thorac Cardiovasc Surg 1977; 74: 14 – 9
23. Yu – Chin, K.  
The repair of operative pericardial defect with fascia lata for the prevention and treatment of herniation of the heart.  
Chin Med J 1959; 78: 210 – 3
24. Bonnabeau, R. C.; Armanious, A. W.; Tarnay, T. J.  
Partial replacement of pericardium with dura substitute.  
J Thorac Cardiovasc Surg 1973; 66: 196 – 201
25. Gontijo, B.; Vrandecic, M.; Fantini, F.; de Paula e Silva, J. A.; Barbosa, J. T.; Ferrufino, A. B.; Alocer, E. O.; Castro, M. F.; Drumond, L. S.; Barbosa, M. R. et al.  
Replacement of the ascendine aorta and aortic arch with bovine pericardial grafts. A preliminary report.  
Eur J Cardiothorac Surg. 1995; 9 (3): 127 - 32
26. Masumoto, H.; Watanabe, T.; Sakai, Y.; Ueda, Y.  
Experimental study of calcification of the xenopericardia  
The Japanese Journal of Thoracic Surgery 2000; 53 (6): 468 – 71
27. Revuelta, J. M.; Bernal, J. M.; Gutierrez, J. A.; Gaile, L.; Alonso, C.; Duran, C. M. G.  
Mitroflow Heart Valve : 5 Years Clinical Experience  
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 36, 262, 1988
28. Schoen, F. J.  
Causes of failure and pathological findings in surgically removed Ionescu Shiley standard bovine pericardial valve bioprotheses.  
Circulation 76, 618, 1987
29. Wearnly, D. J.  
Primary tissue failure in pericardial heart valves.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 94, 367, 1987
30. Gallo, I.  
Incidence of primary tissue failure with the Ionescu Shiley pericardial valve.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 90, 313, 1985

31. Samways, D. W.  
Cardiac peristalsis: its nature and effects.  
Lancet 1; 1898: 927
32. Forssmann, W.  
Die Sondierung des rechten Herzens.  
Klein. Wochenschr. 1929; 8: 2085
33. Carpentier, A.  
Principles of Tissue Valve Transplantation.  
In: Ionescu, M. I.; et al.: Biological Tissue in Heart Valve Replacement  
Butterworth, London 1972; S. 49
34. Carpentier, A.; Dubost, C.  
From Xenograft to Bioprosthesis: Evolution of Concepts and Techniques of Valvular  
Xenografts.  
In: Ionescu, M. I.; et al.: Biological Tissue in Heart Valve Replacement  
Butterworth, London 1972; S. 515
35. Carpentier, A.; Lemaigre, G.; Robert, L.; et al.  
Biologic factors affecting long – term results of valvular heterografts.  
J Thorac Cardiovasc Surg 1969; 58: 467 - 83
36. Wengerter, K.; Dardik, H.  
Biological vascular grafts  
Semin Vasc Surg. 1999; 12 (1): 46 – 51
37. Murayama, Y.; Satoh, S.; Oka, T.; Imanishi, J.; Noishiki, Y.  
Reduction of the antigenicity and immunogenicity of xenografts by a new cross – linking  
reagent.  
ASAIO Trans. 1988; 34 (3): 546 - 9
38. Hamaguchi, K.; Tatsumoto, N.; Fujii, S.; Okeda, T.; Nakamura, M.; Yamaguchi, K.;  
Fujimori, O.; Takaki, R.  
Microencapsulation of pancreatic islets. A technique and its application to culture and  
Transplantation.  
Diabetes Res Clin Pract. 1986; 2 (6) : 337 – 45
39. Boninsegna, S.; Bosetti, P.; Carturan, G.; Dellagiacomma, G.; Dal Monte, R.; Rossi, M.  
Encapsulation of individual pancreatic islets by sol – gel SiO<sub>2</sub>: a novel procedure for  
perspective cellular grafts.  
J Biotechnol. 2003; 100 (3): 277 – 86
40. Dahm, M.; Husmann, M.; Eckard – Meyer; Prufer, D.; Groh, E.; Oelert, H.  
Relevance of immunologic reactions for tissue failure of bioprosthetic heart valves.  
Ann Thorac Surg. 1995; 60 (2): 348 – 52

41. Dahm, M.; Lyman, W.; Schwell, A.; Factor, S.; Frater, R. W.  
Immunogenicity of glutaraldehyde – tanned bovine pericardium.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 1990; 99: 1080 – 90
42. Renz – Polster, H.; Braun, J.  
Basislehrbuch Innere Medizin  
Urban – Fischer – Verlag 1999; 2. Auflage
43. Davis, E. A.; Pruitt, S. K. ; Greene, P. S.; Ibrahim, S.; Lam, T. T.; Levin, J. L.; Baldwin, W. M.; Sanfilippo, F.  
Inhibition of complement, evoked antibody, and cellular response prevents rejection of pig – to – primate cardiac xenografts.  
Transplantation 1996; 62: 1018 – 1023
44. Lawson, J. H.; Platt, J. L.  
Molecular barriers to xenotransplantation.  
Transplantation 1996; 62: 303 – 310
45. Oriol, R.; Ye, Y.; Koren, E.; Cooper, D. K. C.  
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: 1433 – 1442
46. Cotterell, A. H.; Collins, B. H.; Parker, W.; Harland, R. C.; Platt, J. L.  
The humoral immune response in humans following cross – perfusion of porcine organs.  
Transplantation 1995; 60: 861 – 868
47. McCurry, K. R.; Parker, W.; Cotterell, A. H.; Weidner, B. C.; Lin, S. S.; Daniels, L. J.; Holzkecht, Z. E.; Byrne, G. W.; Diamond, L. E.; Logan, J. S.; Platt, J. L.  
Humoral responses to pig – to – baboon cardiac transplantation: implications for the pathogenesis and treatment of acute vascular rejection and for accommodation.  
Hum. Immunol. 1997; 58: 91 – 105
48. Cooper, D. K.; Koren, E.; Oriol, R.  
Oligosaccharides and discordant transplantation.  
Immunol. Rev. 1994; 141: 31 – 58
49. Lindeborg, E.; Kumagai – Braesch, M.; Tibell, A.; Moller, E.  
Continued production of xenimmune antibodies 6 – 8 years after clinical transplantation of fetal pig islet – like cell – clusters.  
Xenotransplantation 2001; 8 (4): 273 – 283

50. Galili, U.; LaTemple, D. C.; Walgenbach, A. W.; Stone, K. R.  
Porcine and bovine cartilage transplants in cynomolgus monkey: II. Changes in anti – Gal response during chronic rejection.  
Transplantation 1997; 63 (5): 646 - 651
  
51. Good, H.; Cooper, D. K. C.; Malcolm, A. J.; Ippoloto, R. M.; Koren, E.; Neethling, F. A.; Ye, Y.; Zuhdi, N.; Lamontagne, L. R.  
Identification of carbohydrate structures which bind human anti – porcine antibodies: Implications for discordant xenografting in man.  
Transplant Proc. 1992; 24: 559 – 562
  
52. Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D. K.  
Kurzes Lehrbuch der Immunologie  
Georg – Thieme Verlag 1995; Stuttgart – New York
  
53. Platt, J. L.; Fischel, R. J.; Matas, A. J. et al  
Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine – to – primate model.  
Transplantation 52, 214, 1991
  
54. Platt, J. L.  
Hyperacute xenograft rejection.  
R. G. Landes Company, Austin, 1995
  
55. Cooper, D. K. C.; Human, P. A.; Lexer, G.; et al.  
Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon.  
J Heart Transplant. 7, 238, 1988
  
56. Dalmaso, A. P.; Vercellotti, G. M.; Fischel, R. J.; et al.  
Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients.  
Am J Pathol. 1992;140: 1157 - 1166
  
57. Rose, A. G.; Cooper, D. K. C.; Human, P. A.; Reichenspurner, H.; Reichert, B.  
Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts.  
J Heart Lung Transplant. 10, 223, 1991
  
58. Alexandre, G. P. J.; Gianello, P.; Latinne, D.; et al.  
Plasmapheresis and splenectomy in experimental renal xenotransplantation  
In edited by Hardy, M. A. (Ed.) Xenograft 25. Elsevier Science Publishers, New York, NY, 1989, p. 259
  
59. Parker, W. R.; Bruno, D.; Holzknecht, Z. E.; Platt, J. L.  
Xenoreactive natural antibodies: isolation and initial characterisation.  
J Immunol. 153, 3791, 1994

60. Platt, J. L.; Holzknrecht, Z. E.  
Porcine platelet antigens recognized by human xenoreactive natural antibodies.  
*Transplantation* 57, 327, 1994
61. Holzknrecht, Z. E.; Platt, J. L.  
Identification of porcine endothelial cell membrane antigens recognized by human xenoreactive antibodies.  
*J. Immunol.* 154, 5500, 1995
62. Collins, B. H.; Cotterell, A. H.; McCurry, K. R.; et al.  
Cardiac xenografts between primate species provide evidence for the importance of the  $\alpha$  - galactosyl determinant in hyperacute rejection.  
*J. Immunol.* 154, 5500, 1995
63. Galili, U.; Clark, M. R.; Shohet, S. B.; Buehler, J.; Macher, B. A.  
Evolutionary relationship between the natural anti – Gal antibody and the Gal $\alpha$ 1 – 3 Gal epitope in primates.  
*Proc. – Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1369, 1987
64. Galili, U.; Shohet, S. B.; Kobrin, E.; Stults, C. L. M.; Macher, B. A.  
Man, apes and the old world monkeys differ from other mammals in the expression of  $\alpha$  – Galactosyl epitopes on nucleated cells.  
*J. Biol. Chem.* 263, 17755, 1988
65. Platt, J. L.  
Mechanisms of tissue injury in hyperacute xenograft rejection.  
*ASAIO J.* 1992; 38 (1): 8 - 16
66. Schuurman, H. J.; Cheng, J.; Lam, T.  
Pathology of xenograft rejection: a commentary.  
*Xenotranspl.* 2003; 10 (4): 293 – 9
67. Bach, F. H.; Dalmaso, A. P.; Platt, J. L.  
Xenotransplantation: a current perspective.  
*Transplant Rev.* 1992; 6: 163 – 74
68. Platt, J. L.; Vercellotti, G. M.; Dalmaso, A. P.; et al.  
Transplantation of discordant xenografts: a review of progress.  
*Immunol. Today* 11, 450, 1990
69. Miyagawa, S.; Hirose, H.; Shirakura, R.; et al.  
The mechanism of discordant xenograft rejection.  
*Transplantation* 46, 825, 1988



70. Saadi, S.; Ihrcke, N. S.; Platt, J. L.  
Pathophysiology of xenograft rejection.  
In Lieberman, R.; Morris, R. (eds.): Principles of immunomodulatory drug development in transplantation and autoimmunity.
71. Ihrcke, N. S.; Platt, J. L.  
Shedding of heparan sulfate proteoglycan by stimulated endothelial cells: evidence for proteolysis of cell surface molecules.  
J. Cell Physiol. 168, 625, 1996
72. Ihrcke, N. S.; Wrenshall, L. E.; Lindman, B. J.; Platt, J. L.  
Role of heparan sulfate in immune – system blood vessel interaction.  
Immunol. Today 14, 500, 1993
73. Stevens, R. B.; Wang, Y. L.; Kaji, H. et al  
Administration of nonanticoagulant Heparin inhibits the loss of glycosaminoglycans from xenogeneic cardiac grafts and prolongs graft survival.  
Transplant. Proc. 25, 382, 1993
74. Wrenshall, L. E.; Carlson, A.; Cerra, F. B.; Platt, J. L.  
Modulation of cytolytic T – cell responses by heparan sulfate.  
Transplantation 57, 1087, 1994
75. Wrenshall, L. E.; Cerra, F. B.; Singh, R. K.; Platt, J. L.  
Heparan sulfate initiates signals in murine macrophages leading to divergent biological outcomes.  
J. Immunol. 154, 871, 1995
76. Saadi, S.; Platt, J. L.  
Transient perturbation of endothelial integrity induced by antibodies and complement.  
J. Exp. Med. 181, 21, 1995
77. Hattori, R.; Hamilton, K. K.; Fugate, R. D.; McEver, R. P.; Sims, P. J.  
Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP – 140.  
J. Biol. Chem. 264, 7768, 1989
78. Hattori, R.; Hamilton, K. K.; McEver, R. P.; Sims, P. J.  
Complement proteins C5b – 9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP – 140 to the cell surface.  
J. Biol. Chem. 264, 9053, 1989
79. Riede, U. - N.; Werner, M.; Schaefer, H. – E.  
Allgemeine und spezielle Pathologie.  
Georg - Thieme – Verlag 2004; 5. Auflage

80. Balkwill, F. R.; Burke, F.  
The cytokine network.  
Immunol. Today 10, 299, 1989
  
81. Berthold, Susanne  
Funktionelle Charakterisierung Herpesvirus Saimiri – infizierter Humaner Zellen.  
Naturwissenschaftliche Fakultäten der Friedrich – Alexander – Universität Erlangen –  
Nürnberg, 1993
  
82. Thomson, A. W.  
The cytokine handbook.  
Academic Press, New York, 1991
  
83. Liebich, H. G.  
Funktionelle Histologie.  
Schattauer Verlag, 1990
  
84. Mayer, A.; Eißner, G.; Mayr – Bibrack, B.  
Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin.  
Paul Parey Verlag, 1984
  
85. Van Snick, J  
Interleukine – 6: an overview.  
Annu Rev Immunol. 8, 253, 1990
  
86. Ibelgaufts, Horst  
Dictionary of Cytokines.  
Special Edition for Editions Roche, Basel, Switzerland; 1995
  
87. Hirano, T.; Kishimoto, T.  
Interleukin – 6.  
In: Handbook of Experimental Pharmacology, Peptide Growth Factors and Their  
Receptors; edited by M. B. Sporn, A. B. Roberts  
Berlin, Springer – Verlag 1990, S. 633 - 665
  
88. Seghal, P. B.; Greininger, G.; Tosato, G.  
Regulation of the acute phase and immune responses: Interleukin – 6.  
Ann. NY Acad. Sci. 1989; 557, 1 – 583
  
89. Uyttenhove, C.; Coulie, P. G.; Van Snick, J.  
T Cell growth and differentiation induced by HP1/IL-6, the murine  
hybridoma/plasmocytoma growth factor.  
J Exp Med 1988; 167: 1414 – 1427

90. Lotz, M.; Jirik, F.; Kabouridis, R.; Tsoukas, C.; Hirano, T.; Kishimoto, T.; Carson, D.  
B Cell stimulating factor 2/interleukin-6 is a costimulant for human thymocytes and T –  
Lymphocytes.  
J Exp Med 1988; 167: 1253 – 58
91. Helle, M.; Brakenhoff, J. P. J.; De Groot, E. T.; Aarden, L. A.  
IL-6 is involved in IL-1 induced activities.  
Eur J Immunol 1988; 18: 957 – 59
92. Okada, M.; Kitahara, N.; Kishimoto, S.; Matsuda, T.; Hirano, T.; Kishimoto, T.  
IL-6/BSF2 functions as a killer helper factor in the in – vitro induction of cytotoxic T Cells.  
J Immunol 1988; 141: 1543 – 49
93. Renauld, J. C.; Vink, A.; Van Snick, J.  
IL-1 and IL-6 in CTL induction – accessory signals in murine cytolytic T Cell responses:  
Dual requirement for IL-1 and IL-6.  
J Immunol 1989; 143: 1894 – 98
94. Luger, T. A.; Krutman, J.; Kirnbauer, T.; Urbanski, A.; Schwarz, T.; Klappacher, G.;  
Kock, A.; Micksche, M.; Malejczyk, K. J.; Schauer, E.; May, L. T.; Sehgal, P. B.  
IFN $\beta$ /IL-6 augments the activity of human natural killer cells.  
J Immunol 1989; 143: 1206 – 09
95. Hirano, T.; Teranishi, T.; Lin, B. H.; Onoue, K.  
Human helper T Cell factor(s). IV. Demonstration of a human late – acting B Cell  
differentiation factor acting on Staphylococcus aureus Cowen I – stimulated B Cells.  
J Immunol 1984; 133: 798 – 802
96. Muragudin, A.; Hirano, T.; Tang, B.; Matsuda, T.; Horii, Y.; Nakamima, K.; Kishimoto,  
T.  
The essential role of B Cell stimulatory factor 2 (BSF2/IL-6) for the terminal  
differentiation of B Cells.  
J Exp Med 1988; 67: 332 – 344
97. Taga, T.; Kawanishi, Y.; Hardy, T. T.; Hirano, T.; Kishimoto, T.  
Receptors for B Cell stimulatory factor 2.  
J Exp Med 1987; 166: 967 – 81
98. Ambrosino, D. N.; Delaney, N. R.; Shamburger, R. C.  
Human polysaccharide – specific B Cells are responsive to pokeweed mitogen and IL-6.  
J Immunol 1990; 144: 1221 – 26
99. Takatsuki, F.; Okano, A.; Suzuki, C.; Chieda, R.; Takahara, Y. , Hirano, T.; Kishimoto,  
T.; Hamuro, J.; Akiyama, Y.  
Human recombinant IL-6/B Cell stimulatory factor 2 augments murine antigen – specific  
antibody responses in – vitro and in – vivo.  
J Immunol 1988; 141: 3072 – 77

100. Endres, S.; Siegmund, B.; Hartmann, G.; Eigler, A.  
Pharmakologische Suppression der Synthese von Tumor – Nekrose – Faktor.  
Arzneim. – Forsch./Drug Res. 50 (I), Nr. 2, 2000
101. Vilcek, J.; Le, J.  
Immunology of cytokines : an introduction  
In: A. W. Thomson (ed.), 1991: The cytokine handbook, Acad. Press, New York: 1, 1991
102. Birmele, B.; Thibault, G.; Nivet, H.; Gruel, Y.; Bardos, P.; Lebranchu, Y.  
Human lymphocyte adhesion to xenogeneic porcine endothelial cells: modulation by human TNF  $\alpha$  and involvement of VLA – 4 and LFA – 1.  
Transpl. Immunol. 1996; 4 (4): 265 – 70
103. Economou, J. S.; McBride, W. H.; Essner, R.; Rhoades, K.; Golub, S.; Holmes, E. C.  
; Morton, D. L.  
Tumor necrosis factor production by IL – 2 – activated macrophages in vitro and in vivo.  
Immunol. 1989; 67 (4), 514 - 9
104. Cerdan, C.; Martin, Y.; Brailly, H.; Courcoul, M.; Flavetta, S.; Costello, R.; Mawas, C.  
; Birg, F.; Olive, D.  
IL – 1 alpha is produced by T – Lymphocytes activated via the CD 2 plus CD 28  
Pathways.  
J. Immunol. 1991; 146, 560
105. Jashari, R.; Herijgers, P.; Verbeken, E.; Van Lommel, A.; Nishimura, Y.; Racz, R.;  
Flameng, W.  
Calcification and degeneration characteristics of the Biocor no – react bovine internal  
mammary artery (BIMA) – in vivo evaluation in a sheep model.  
Cardiovasc Surg. 2001; 9(1): 44 - 49
106. Abolhoda, A.; Yu, S.; Oyarzun, J. R.; Allen, K. R.; McCormick, J. R.; Han, S.; Kemp,  
F. W.; Bogden, J. D.; Lu, Q.; Gabbay, S.  
No – React Detoxification Process: A Superior Anticalcification Method For  
Bioprotheses.  
Ann Thorac Surg 1996 Dec; 62 (6): 1724 – 30
107. Schoen, F. J.; Kujovich, J. L.; Levy, R. J.; Sutton, M. S. J.  
Bioprosthetic valve failure.  
Cardiovasc. Clin. 1987; 18: 289 – 97
108. Deiwick, M.; Glasmacher, B.; Pettenazzo, E.; Hammel, D.; Castellon, W.; Thiene, G.  
; Reul, H.; Berendes, E.; Scheld, H. H.  
Primary tissue failure of bioprotheses: new evidence from in vitro tests.  
Thorac Cardiovasc Surg. 2001; 49 (2): 78 – 83

109. Deiwick, M.; Glasmacher, B.; Baba, H. A.; Roeder, N.; Reul, H.; von Bally, G.; Scheld, H. H.  
In vitro testing of bioprotheses: influence of mechanical stresses and lipids on Calcification.  
Ann Thorac Surg. 1998; 66 (6): 206 – 11
110. Jorge – Herrero, E.; Fernandez, P.; Turnay, J.; Olmo, N.; Calero, P.; Garcia, R.; Freile, I.; Castello – Ollivares, J. L.  
Influence of different chemical cross – linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen.  
Biomaterials 1999; 20 (6): 539 – 45
110. Bakos, D.; Jorge – Herrero, E.; Koller, J.  
Resorption and calcification of chemically modified collagen/hyaluronan hybrid Membranes.  
Polim Med. 2000; 30 (3 – 4): 57 – 64
111. Grabenwoger, M.; Sider, J.; Fitzal, F.; Zelenka, C.; Windberger, U.; Grimm, M.; Moritz, A.; Bock, P.; Wolner, E.  
Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material.  
Ann Thorac Surg. 1996; 62 (3): 772 – 7
113. Jorge – Herrero, E.; Fernandez, P.; Escudero, C.; Garcia – Paez, J. M.; Castello – Ollivares, J. L.  
Calcification of pericardial tissue pretreated with different amino acids  
Biomaterials 1996; 17 (6): 571 – 5
114. Lee, W. K.; Park, K. D.; Kim, Y. H.; Suh, H.; Park, J. C.; Lee, J. E.; Sun, K.; Baek, M. J.; Kim, H. M.; Kim, S. H.  
Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO or heparin after glutaraldehyde fixation.  
J Biomed Mater Res. 2001; 58(1): 27 – 35
115. Lee, W. K.; Park, K. D.; Han, D. K.; Suh, H.; Park, J. C.; Kim, Y. H.  
Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis.  
Biomaterials 2000; 21 (22): 2323 – 30
116. Schoen, F. J.; Tsao, J. W.; Levy, R. J.  
Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprotheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization.  
Am J Pathol. 1986; 123 (1): 134 - 45
117. Gabbay, S.; Chuback, J. A.; Khavarlan C.; Donahoo, J.; Oyarzum, R.; Scoma, R.  
In Vitro and Animal Evaluation with the Biocor No - React™ Anticalcification Treatment for Bioprotheses (New Concept in Anticalcification Treatment).  
In: New Horizons and the Future of Heart Valve Bioprotheses 1994; First Edition

118. Hsu, L. C.  
Heparin – coated cardiopulmonary bypass circuits: current status.  
Perfusion 2001; 16 (5): 417 – 28
119. Pelosi, M. A. 2nd; Pelosi, M. A. 3rd  
A new nonabsorbable adhesion barrier for myomectomy.  
Am J Surg. 2002; 184 (5): 428 - 32
120. Luciani, G. B.; Santini, F.; Auriemma, S. , Barozzi, L.; Bertolini, P.; Mazzucco, A.  
Long – term results after aortic valve replacement with the Biocor PSB stentless xenograft in the elderly.  
Ann Thorac Surg. 2001; 71 (5): 306 – 10
121. Herijgers, P.; Ozaki, S.; Verbeken, E.; Van Lommel, A.; Jashari, R.; Nishida, T.; Leunens, V.; Flameng, W.  
The No – React anticalcification treatment: a comparison of Biocor No – React II and Toronto SPV stentless bioprotheses implanted in sheep.  
Semin Thorac Cardiovasc Surg. 1999; 11 (4): 171 – 5
122. Pearl, J. M.; Cooper, D. S.; Bove, K. E.; Manning, P. B.  
Early failure of the Shelhigh pulmonary valve conduit in infants.  
Ann Thorac Surg. 2002; 74 (2): 542 – 8; discussion 548 – 9
123. Ishizaka, T.; Ohye, R. G.; Goldberg, C. S.; Ramsburg, S. R.; Suzuki, T.; Devan, E. J.; Bove, E. L.  
Premature failure of small – sized Shelhigh No – React porcine pulmonic valve conduit model NR – 4000.  
Eur J Cardiothorac Surg. 2003; 23 (5) : 715 – 8
124. Assicot, M.; Gendrel, G.; Carsin, H.; Raymond, J.; Guilbaud, J.; Bohuon, C.  
High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection.  
Lancet 1993; 341 (8844): 515 – 8
125. Al – Nawas, B.; Krammer, I.; Shah, P. M.  
Procalcitonin in diagnosis of severe infections.  
Eur J Med Res 1996; 1, 331 – 333
126. Gramm, H. J.; Beier, W.; Zimmermann, J.; Oedra, N.; Boese – Landgraf, J.  
Procalcitonin (ProCT) – a biological marker of the inflammatory response with prognostic properties.  
Clin. Intensive Care 1995; 6 (Suppl. 2): 71
127. David, T. E.  
The use of pericardium in acquired heart disease: a review article.  
J. of Heart Valve Disease 1998; 7: 13 – 18

128. Tissue – Guard product family worldwide units sold from date of PDA clearance  
On file at Synovis Surgical Innovations 2002
129. Synovis Surgical Innovations´ products worldwide reported adverse events  
On file at Synovis Surgical Innovations 2002
130. Sachs, L.  
Angewandte Statistik.  
Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 4. Auflage, 1974
131. Cerottini, J. C.; Engers, H. D.; MacDonald, H. R.; Brunner, T.  
Generation of cytotoxic T – lymphocytes in vitro. I. Response of normal and immune mouse spleen cells in mixed leukocyte cultures.  
J Exp Med. 1974; 140 (3): 703 - 717
132. Oka, Y.; Murata, A.; Nishijima, J.; Yasuda, T.; Hiraoka, N.; Ohmachi, Y.; Kitagawa, K.; Toda, H.; Tanaka, N.; Mori, T.  
Circulating interleukin 6 as a useful marker for predicting postoperative complications.  
Cytokine 4, 1992, 298 – 304
133. Van Oers, M. H. J.; Van der Heyden, A. A. P. A. M.; Aarden, L. A.  
Interleukin – 6 (IL – 6) in serum and urine of renal transplant recipients.  
Clin. Exp. Immunol. 1988; 71, 314ff.
134. Maury, P. J.; Teppo, A. M.  
Raised serum levels of cachectin/tumor necrosis factor alpha in renal allograft rejection.  
J. Exp. Med. 1987; 166 (4), 1132 - 37
135. McLaughlin, P. J.; Aikawa, A.; Davies, H. M. , Ward, R. G.; Bakran, A.; Sells, R. A.; Johnson, P. M.  
Evaluation of sequential plasma and urinary tumor necrosis factor alpha levels in renal allograft recipients.  
Transplantation 1991; 51 (6), 1225 - 9
136. Holler, E.; Kolb, H. J.; Moller, A.; Kempeni, J.; Liesenfeld, S.; Pechumer, H.; Lehmacher, W.; Ruckdeschel, G.; Gleixner, G.; Riedner, C.; et al.  
Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation.  
Blood 1990; 75 (4), 1011 - 6
137. Sardas, O. S.; Beksac, M.; Koc, H.; Ilhan, O.; Akan, H.; Gurman, G.  
Tumor necrosis factor alpha in human bone marrow recipients  
Blood 1990; 76 (12), 2639 – 40

## 8. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN – TABELLEN - BILDER

### Abbildungen

Abb. 1:	<i>IL – 6 Tag 1</i> für Kontrolle, No – React und Periguard in Suspensionen .....	39
Abb. 2:	<i>IL – 6 Tag 3</i> für Kontrolle, No – React und Periguard in Suspensionen .....	41
Abb. 3:	<i>IL – 6 Tag 5</i> für Kontrolle, No – React und Periguard in Suspensionen .....	42
Abb. 4:	<i>TNF <math>\alpha</math> Tag 1</i> für Kontrolle, No – React und Periguard in Suspensionen .....	45
Abb. 5:	<i>TNF <math>\alpha</math> Tag 3</i> für Kontrolle, No – React und Periguard in Suspensionen .....	46
Abb. 6:	<i>TNF <math>\alpha</math> Tag 5</i> für Kontrolle, No – React und Periguard in Suspensionen .....	48
Abb. 7:	<i>IL – 6 RPMI 5%</i> im Zeitverlauf .....	50
Abb. 8:	<i>IL – 6 normales Serum</i> im Zeitverlauf .....	51
Abb. 9:	<i>IL – 6 inaktives Serum</i> im Zeitverlauf .....	52
Abb. 10:	<i>TNF <math>\alpha</math> RPMI 5%</i> im Zeitverlauf .....	53
Abb. 11:	<i>TNF <math>\alpha</math> normales Serum</i> im Zeitverlauf .....	54
Abb. 12:	<i>TNF <math>\alpha</math> inaktives Serum</i> im Zeitverlauf .....	55

### Tabellen

Tab. 1:	<i>Klinik/Diagnostik/Therapie/Verlauf der Koblenzer Patienten</i> .....	24
Tab. 2:	<i>Mikrobiologische Untersuchungen und Ergebnisse in Koblenz</i> .....	26
Tab. 3:	<i>Suspensionen mit RPMI 5%</i> .....	34
Tab. 4:	<i>Suspensionen mit 100%igem Serum</i> .....	34
Tab. 5:	<i>Suspensionen mit inaktivem Serum</i> .....	34
Tab. 6:	<i>Signifikanzen (IL – 6) zwischen No – React und Vergleichssuspensionen</i> .....	44
Tab. 7:	<i>Signifikanzen (TNF <math>\alpha</math>) zwischen No – React und Vergleichssuspensionen</i> .....	49



## Bilder

Bild 1: Intraoperative Aufnahme während der Reoperationen .....	23
Bild 2: Intraoperative Aufnahme während der Reoperationen .....	23
Bild 3: <b>Nativ</b> präparat eines Periguard – Patches .....	57
Bild 4: <b>Nativ</b> präparat eines No – React – Patches .....	57
Bild 5: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>RPMI 5%</b> und <b>MAC</b> – Färbung.....	58
Bild 6: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>RPMI 5%</b> und <b>MAC</b> – Färbung.....	59
Bild 7: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>normalem</b> Serum und <b>MAC</b> – Färbung .....	60
Bild 8: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>normalem</b> Serum und <b>MAC</b> – Färbung.....	60
Bild 9: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>inaktivem</b> Serum und <b>MAC</b> – Färbung.....	61
Bild 10: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>inaktivem</b> Serum und <b>MAC</b> – Färbung .....	61
Bild 11: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>RPMI 5%</b> und <b>C3c</b> – Färbung .....	62
Bild 12: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>RPMI 5%</b> und <b>C3c</b> – Färbung.....	62
Bild 13: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>normalem</b> Serum und <b>C3c</b> – Färbung.....	63
Bild 14: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>normalem</b> Serum und <b>C3c</b> – Färbung .....	64
Bild 15: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>inaktivem</b> Serum und <b>C3c</b> – Färbung .....	65
Bild 16: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>inaktivem</b> Serum und <b>C3c</b> – Färbung.....	65
Bild 17: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>RPMI 5%</b> und <b>Ig</b> – Färbung .....	66
Bild 18: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>RPMI 5%</b> und <b>Ig</b> – Färbung.....	66
Bild 19: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>normalem</b> Serum und <b>Ig</b> – Färbung .....	67
Bild 20: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>normalem</b> Serum und <b>Ig</b> – Färbung.....	67
Bild 21: <i>No – React</i> – Patch nach Inkubation in <b>inaktivem</b> Serum und <b>Ig</b> – Färbung.....	68
Bild 22: Periguard – Patch nach Inkubation in <b>inaktivem</b> Serum und <b>Ig</b> – Färbung .....	68

## LEBENS LAUF

Name: Christoph Eimer  
Geburtsdatum, -ort: 12.03.1977 in Neuss

Schulbildung:  
08/ 1983 - 07/ 1987 Görres Grundschule Neuss; Dreikönigen Grundschule Neuss  
09/ 1993 - 04/1994 Marlborough College Wiltshire/ England  
08/ 1987 - 05/ 1996 Quirinus - Gymnasium Neuss  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:  
04/1998 - 03/2000 Studium der Humanmedizin an der Ludwig - Maximilians -  
Universität zu München  
04/2000 - 05/2005 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität zu  
München

Examina:  
03/ 2000 Ärztliche Vorprüfung  
03/ 2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/ 2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/ 2005 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Approbation: 2. August 2005

Promotion:  
10/2002 – 10/2005 Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für  
Chirurgische Forschung der Ludwig - Maximilians – Universität  
München  
Betreuer: Dr. E. Thein, Prof. Dr. Dr. Hammer