

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

EINFLUSS DES GLYKOPROTEIN IIB/IIIa-ANTAGONISTEN TIROFIBAN
AUF DIE HYPERAKUTE ABSTOSSUNGSREAKTION VON
hDAF-TRANSGENEN UND NICHT-TRANSGENEN
SCHWEINEHERZEN

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

vorgelegt von
Hannah Jöckle
aus Starnberg

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Bruno Reichart
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Rainer Haas PD Dr. med. Rudolf Hatz
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Ulrike Brandl-Selvåg
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	08.05.2008

In Liebe und Dankbarkeit
meinen Eltern gewidmet.

	Seite
<u>A.</u> <u>EINLEITUNG</u>	8
1. Geschichte der Xenotransplantation	8
2. Xenotransplantation als Möglichkeit zur Behebung des Organmangels	11
3. Hyperakute Xenotransplantatabstoßung	14
4. Fragestellung	19
<u>B.</u> <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	20
1. Operative Versuchsvorbereitung	20
1.1. Versuchstiere	20
1.1.1. Nicht-transgene Tiere	20
1.1.2. Transgene Tiere	20
1.2. Versuchsgruppen	21
1.3 Anästhesie	22
1.3.1. Sedierung	22
1.3.2. Narkose	22
1.3.3 Lagerung und Überwachung	23
1.4 Operatives Vorgehen	24
1.4.1. Herzexplantation	24
1.4.2 Herzpräparation	24

2.	Organperfusion	26
2.1.	Working-Heart-Modell	26
2.2.	Perfusat	27
2.3.	Perfusionsprotokoll	28
2.4.	ex vivo-Perfusionsanlage	29
2.4.1.	Perfusionsvorbereitungen	29
2.4.2.	Perfusion	29
2.4.3.	Perfusionsende	30
3.	Messparameter	31
3.1.	Organphysiologie und Hämodynamik	31
3.1.1.	Druckmessung	31
3.1.2.	Herzminutenvolumen	31
3.1.3.	Schlagarbeitsindex	31
3.1.4.	Koronarfluss	31
3.1.5.	Koronarwiderstand	32
3.1.6.	Sauerstoffverbrauch	32
3.1.7.	Überlebenszeit	32
3.1.8.	Gewichtszunahme	32
3.2.	Gerinnungsparameter	33
3.3.	Serumchemie	33
3.4.	Hämatologie	34
3.5.	Immunologische Parameter	35
3.5.1.	Komplement	35
3.5.2.	Anti-Pig-Antikörper	35
3.5.3.	Anti-Gal α 1,3Gal-Antikörper	35

3.5.4.	Leukozytenoberflächenantigene	36
3.6.	Histo- und Immunhistopathologie	37
3.6.1.	Materialgewinnung und Materialkonservierung	37
3.6.2.	Histologie	37
3.6.3.	Immunhistologie	37
3.7.	Statistik-Auswertung	38
C.	<u>ERGEBNISSE</u>	39
1.	Organphysiologie und Hämodynamik	39
1.1.	Druckmessung	39
1.2.	Herzminutenvolumen	40
1.3.	Schlagarbeitsindex	41
1.4.	Koronarfluss	42
1.5.	Koronarwiderstand	43
1.6.	Sauerstoffverbrauch	44
1.7.	Überlebenszeit	45
1.8.	Gewichtszunahme	46
2.	Gerinnungsparameter	47
2.1.	Antithrombin III	47
2.2.	Protein C	48
2.3.	Fibrinogen	49
3.	Serumchemie	50
3.1.	Kreatinkinase und CK-MB	50
3.2.	Aspartataminotransferase	52
3.3.	Lactatdehydrogenase	53

4.	Hämatologie	54
4.1.	Thrombozyten	54
4.2.	Leukozyten	55
5.	Immunologische Parameter	56
5.1.	Komplement	56
5.2.	Anti-Pig-Antikörper	58
5.3.	Anti-Gal α 1,3Gal-Antikörper	59
5.4.	Leukozytenoberflächenantigene	61
6.	Histo- und Immunhistopathologie	62
6.1.	Makroskopischer Aspekt	62
6.2.	Histologische Bewertung	63
6.2.1.	Landrassegruppe ohne Tirofiban	63
6.2.2.	Landrassegruppe mit Tirofiban	64
6.2.3.	hDAF-transgene Gruppe mit Tirofiban	65
<u>D.</u>	<u>DISKUSSION</u>	66
1.	Einführung	66
2.	Versuchskonzept	70
2.1.	Perfusionsmodell	70
2.2.	Wahl des Thrombozytenaggregationshemmers	73
3.	Xenotransplantatabstoßung	77
3.1.	Hyperakute Xenotransplantatabstoßung	77
3.2.	Verzögerte Xenotransplantatabstoßung	81
3.3.	Chronische Xenotransplantatabstoßung	83

4.	Pathologie der Gerinnung bei der Xenotransplantation	84
5.	Komplementregulation	90
6.	Immunologie	95
7.	Histologie und Immunhistologie	98
<u>E.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	101
<u>F.</u>	<u>ANHANG</u>	103
1.	Abkürzungen	103
2.	Abbildungsverzeichnis	105
3.	Literaturverzeichnis	107
4.	Publikationen	128
5.	Lebenslauf	133
6.	Danksagung	134

A. EINLEITUNG

1. Geschichte der Xenotransplantation

Die Vorstellung, menschliche und tierische Körperteile in einem Körper miteinander zu vereinen, übte bereits vor Tausenden von Jahren eine große Faszination auf die Menschen aus.

Die prähistorischen Höhlenmalereien von Lascaux, Frankreich, zeigen einen Menschen mit dem Kopf eines Vogels. Etwa 2500 v. Chr. schufen die Ägypter die Sphinx von Gizeh als Mischgestalt aus Frauenkopf und Löwenkörper, welche im alten Ägypten als Zeichen der Königsmacht verehrt wurde. Ein indischer Sanskrit-Text aus dem 12. Jahrhundert v. Chr. beschreibt, wie die hinduistische Gottheit Ganesha aus einem Menschenkörper und dem Kopf eines Elefanten geschaffen wurde. Die griechische Mythologie berichtet unter anderem von den Kentauren mit Pferdeleib und menschlichem Oberkörper als Bewohner der Gebirge Thessaliens sowie von Minotaurus, einem Stier-Mensch-Wesen, das von König Minos von Kreta in einem Labyrinth gefangengehalten wurde. Von der griechischen Sagengestalt Chimära, einem feuerschnaubenden Ungeheuer mit Körperteilen von Löwe, Ziege und Schlange, leitet sich der heute in der Biologie verwendete Begriff Chimäre ab als Bezeichnung für Individuen, die aus genetisch unterschiedlichen Komponenten bestehen [52].

Bereits im 17. Jahrhundert fanden in England und Frankreich Transfusionen von Tierblut auf Menschen statt [28, 52]. Im Jahre 1668 wurde in Russland die Schädelverletzung eines hohen Adligen mit einem Knochenstück eines Hundeschädels versorgt. Da ihm die Exkommunikation angedroht wurde, ließ der Patient das Implantat jedoch wieder entfernen [52, 154].

Im Zuge des rapiden Fortschritts von Wissenschaft, sowie von medizinisch-anatomischen Kenntnissen und chirurgischen Möglichkeiten wurde die Xenotransplantation, also die Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen einer Spezies auf eine andere, Ziel wissenschaftlicher Bemühungen [116]. Anfang des 20. Jahrhunderts wurden erste Versuche unternommen, Patienten zum Beispiel im terminalen Nierenversagen durch Xenotransplantation zu retten. Die Transplantate

versagten jedoch innerhalb kürzester Zeit aufgrund von massiver Thrombosierung [52, 154, 163].

Die Geschichte der kardialen Xenotransplantation reicht einige Jahrzehnte zurück und beinhaltet Versuche mit den verschiedensten Spendertieren. Einige dieser Versuche mit humanen Transplantatempfängern sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

<u>Jahr</u>	<u>Operateur</u>	<u>Spenderspezies</u>	<u>Transplantation</u>	<u>Überlebenszeit</u>
1964	Hardy et al.	Schimpanse	orthotop	2 Std.
1968	Cooley et al.	Schaf	orthotop	sofortige Abstoßung
1968	Ross et al.	Schwein	heterotop	sofortige Abstoßung
1969	Marion et al.	Schimpanse	orthotop (?)	4 Std.
1977	Barnard et al.	Pavian	heterotop	5 Std.
1977	Barnard et al.	Schimpanse	heterotop	4 Tage
1984	Bailey et al.	Pavian	orthotop	20 Tage
1992	Czaplicki et al.	Schwein	orthotop	< 24 Std.
1996	Baruah (unveröffentl.)	Schwein	orthotop	< 24 Std.

Tabelle 1: Versuche mit humanen Transplantatempfängern [42, 48, 52, 169]

Schon bald zeigte sich, dass nicht alle transplantierten Organe in den Empfängern dieselbe immunologische Abstoßungsreaktion hervorriefen. Fand eine Organtransplantation zwischen zwei Spezies statt, die phylogenetisch nur entfernt miteinander verwandt sind – wie zum Beispiel Mensch und Schwein –, kam es zu einer hyperakut verlaufenden Abstoßungsreaktion [27, 130]. 1970 prägte Sir Roy Calne für diese Spender-Empfänger-Konstellation die Bezeichnung „diskordant“ [27]. Im Gegensatz dazu nannte Calne diejenigen Spender-Empfänger-Kombinationen aus nah verwandten Spezies – beispielsweise Mensch und Primat – „konkordant“, bei denen die Abstoßungsreaktion ähnlich wie bei allogenen Transplantationen verlief [27]. Die allogene Transplantation, das heißt die Übertragung von Organen innerhalb einer Spezies, stellt die einzige bisher in der Klinik durchgeführte Organübertragung dar.

In den letzten drei Jahrzehnten hat sich die allogene Herztransplantation zur Behandlung der Wahl für Patienten, die sich im Endstadium ihrer Herzerkrankung (NYHA III oder IV) befinden, entwickelt [42]. Die häufigste zur Herztransplantation führende Grunderkrankung ist die Kardiomyopathie unterschiedlichster Genese, gefolgt von der koronaren Herzerkrankung. Auch bei erworbenen Herzfehlern wie fortgeschrittenen Herzklappenerkrankungen, bei denen es zu einer irreversiblen Schädigung des Herzmuskels gekommen ist, sowie bei angeborenen Herzfehlern (hypoplastisches Linksherzsyndrom, Kardiomyopathie, komplexe Herzmissbildungen) stellt die Herztransplantation die einzige Therapieoption dar. Weitere, seltene Indikationen zur Herztransplantation können Herztumore oder ventrikuläre Rhythmusstörungen sein [53, 93].

Bei der allogenen Transplantation besteht unverändert das Problem, dass deutlich mehr Patienten gelistet sind und auf ein Organ warten, als allogene Spenderorgane zur Verfügung stehen [42, 121, 165]. Beispielsweise wurden in Deutschland im Jahr 2006 ca. 750 Patienten neu zur Herztransplantation angemeldet, aber lediglich 412 Herztransplantationen durchgeführt [53]. Etwa 16,5% der gelisteten Patienten sterben, bevor ein geeignetes Spenderorgan gefunden werden kann [93, 168]. Verschärft wird diese Situation durch eine weltweit zu verzeichnende Abnahme an Spenderorganen [57, 93, 170].

2. Xenotransplantation als Möglichkeit zur Behebung des Organmangels

Derzeit werden verschiedene Lösungsansätze zur Behebung des Organmangels diskutiert und erforscht.

Eine Entspannung der Situation könnte beispielsweise durch eine Änderung des Transplantationsgesetzes von der „erweiterten Zustimmungsregelung“ hin zur „Widerspruchsregelung“ erzielt werden. Im Rahmen der in Deutschland geltenden „erweiterten Zustimmungsregelung“ muss der Verstorbene zu Lebzeiten einer Organentnahme zum Beispiel per Organspendeausweis zugestimmt haben. Ist dies nicht der Fall, können die Angehörigen aufgrund des ihnen bekannten oder mutmaßlichen Willens des Verstorbenen über eine Entnahme entscheiden. Bei der in einigen anderen europäischen Ländern geltenden „Widerspruchsregelung“ können Organe zur Transplantation entnommen werden, sofern der Verstorbene nicht zu Lebzeiten einer Organentnahme ausdrücklich widersprochen hat [53]. Im Rahmen der Widerspruchsregelung ist somit eine wesentlich größere Anzahl von Organentnahmen möglich.

Teilweise oder vollständig implantierbare, mechanische Unterstützungssysteme kommen sowohl rechts- oder linksventrikulär, als auch biventrikulär zur Anwendung. Diese Systeme zur Unterstützung der kardialen Pumpfunktion werden zur Überbrückung bis zu einer Transplantation oder zur Entlastung des erkrankten Gewebes bis zur Wiederaufnahme seiner selbständigen Funktionsfähigkeit angewandt. Erfolge dieser Therapiemöglichkeit werden durch thrombembolische Ereignisse, Infektionen und technische Probleme erschwert [34, 54, 73, 121].

Weitere Konzepte zur Behebung des Organmangels sind das cardiac tissue engineering mit dem Ziel, Ersatzmyokard und kontraktile Myozyten zu züchten, die Organogenese, das heißt der Versuch, aus fetalem Gewebe ein komplettes Herz herzustellen sowie die Verwendung von Stammzellen beispielweise zur Regeneration von ischämisch geschädigtem Myokard [34, 73, 104, 121].

Die Indikationen für Transplantationen sind aufgrund der begrenzten Zahl an Spenderorganen eng gefasst. Eine Akzeptanz von grenzwertigen allogenen Spenderorganen, die nach strengen Richtlinien nicht für eine Transplantation in Frage kämen, wird teilweise bereits praktiziert. Die Anzahl der dadurch verfügbaren Organe würde zwar zu einer Verbesserung der derzeitigen Situation führen, wäre jedoch bei weitem nicht ausreichend, um den tatsächlichen Bedarf zu decken. Es

wird geschätzt, dass der zukünftige Bedarf etwa um den Faktor 10 steigen wird, da durch die Xenotransplantation nicht nur die Versorgung aller nach bisherigen Kriterien gelisteten Patienten, sondern auch eine Erweiterung der geltenden strengen Transplantationsindikationen möglich wäre [88, 109, 126].

Die Xenotransplantation würde bei ihrer klinischen Anwendung im Vergleich zur Alлотransplantation einige Vorteile bieten. Es stünde eine uneingeschränkte Anzahl an Organen zur Transplantation zur Verfügung. Somit könnten die Auswahlkriterien für Transplantatempfänger neu definiert werden und viele Patienten Transplantate erhalten, denen dies aufgrund der bisherigen Regelungen versagt blieb [42, 54, 63, 76, 168]. Wirtschaftlich von Nutzen wäre der Wegfall kostspieliger präoperativer Wartezeiten [42, 116]. Die Transplantationen könnten elektiv durchgeführt werden [42, 54, 76], so dass eine Verringerung der Ischämiezeit und die optimale Vorbereitung des Empfängers – zum Beispiel durch eine präoperative Immunsuppression – möglich wären [33, 76, 116].

Eine vorbestehende koronare Herzkrankheit oder andere Erkrankungen des Spenderorgans könnten ausgeschlossen werden. Die pathophysiologischen Auswirkungen durch den Hirntod des Organspenders auf das Spenderherz könnten umgangen werden [42, 76, 168]. Außerdem könnten nicht nur größenkompatible Xenotransplantate zur Verfügung gestellt werden, sondern diese xenogenen Organe darüber hinaus auch genetisch modifiziert werden [10, 33, 54, 116, 168].

Diese Möglichkeiten sind nicht auf kardiale Transplantationen begrenzt. Durch die Xenotransplantation könnten in der gesamten Transplantationsmedizin verschiedenste tierische Zellen und Organe für den therapeutischen Einsatz zur Anwendung kommen.

Die Studien von Schmoeckel et al. sowie von anderen Forschungsgruppen, von denen porcine Herzen orthotop in nicht-humane Primaten transplantiert wurden, lassen die Annahme zu, dass die Funktionsfähigkeit von Schweineherzen im menschlichen Organismus in einem zur Lebenserhaltung notwendigen Maße möglich wäre [21, 156].

Aus verschiedenen Gründen gilt das Schwein als Organspender der Wahl. Die ethischen Bedenken gegenüber Schweinen als Spendertieren sind begrenzt [42, 80, 163]. Die Schweinezucht ist seit langem in der Landwirtschaft etabliert [87, 163, 165]. In den vergangenen Jahren fanden weltweit Millionen von Schweinen

Verwendung in der Lebensmittelindustrie sowie als Spender für Herzklappen und Insulin [74, 130]. Schweine haben eine Tragzeit von nur 114 ± 2 Tagen [13, 178] und sind mit bis zu 12 Nachkommen pro Wurf polypar [87, 165, 178]. Die kurze Tragzeit und die zahlreichen Nachkommen bieten gute Voraussetzungen für genetische Manipulationen in der Erzeugung von Spenderschweinen [87, 130, 165]. So gelang es verschiedenen Forschungsgruppen Mitte der neunziger Jahre, Schweine zu züchten, welche für humane Komplementregulatoren transgen sind [43, 62, 101, 111, 148].

Die Anatomie und Hämodynamik des Schweineherzens ähnelt in ausreichendem Maße der des Menschen [42, 87, 165]. Schweine wachsen schnell heran und bieten auch für Erwachsene die passende Organgröße [42, 80, 163]. Noch ist nicht geklärt, ob und in welchem Ausmaß ein weiteres Wachstum des porzinen Spenderherzens im humanen Empfänger erfolgen könnte. Die Verwendung von Organen von Miniatur-Schweinen, welche ein Maximalgewicht von weniger als 135 kg erreichen, könnte ein überschießendes Wachstum im Empfänger verhindern [42].

Trotz dieser insgesamt günstigen Voraussetzungen als Organspenderspezies tritt vor allem bei der Transplantation von vaskularisierten Organen wie dem Herzen die Problematik der diskordanten Konstellation Schwein – Mensch in den Vordergrund. Die Transplantation von vaskularisierten Organen führt stets zur unmittelbaren Exposition des Spenderendothels gegenüber den Blutbestandteilen des Empfängers [33, 121, 141]. Bei Xenotransplantationen kommt es dabei innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden zu einer hyperakuten Xenotransplantatabstoßung (HXR) des vaskularisierten Organs [9, 27, 49, 126, 133].

3. Hyperakute Xenotransplantatabstoßung

Die hyperakute Abstoßung tritt per definitionem innerhalb von 24 Stunden nach erfolgter Xenotransplantation auf und ist durch präformierte Antikörper vermittelt [1, 10, 146, 152, 160], die vor allem der Klasse IgM angehören [9, 72, 87, 125, 133, 152]. Etwa 80% [87, 126] dieser xenoreaktiven natürlichen Antikörper (XNA) sind gegen das Gal α 1,3-Gal β 1,4-GlcNAc-R-Epitop (Gal α 1,3Gal-Epitop) auf den Endothelzellen gerichtet [70, 152].

Nur Menschenaffen und Menschen besitzen xenoreaktive Anti-Gal α 1-3Gal-Antikörper, da ihnen das Enzym α 1,3-Galactosyltransferase zur Bildung des Gal α 1,3Gal-Epitops fehlt und sie somit das Antigen nicht exprimieren [13, 70]. Gebildet werden die präformierten xenoreaktiven Antikörper als immunologische Antwort auf im Darm befindliche Mikroben wie zum Beispiel Escherichia coli, die das Gal α 1,3Gal-Epitop tragen [55, 69, 70, 130].

Nach der Anlagerung der Anti-Gal α 1,3Gal-Antikörper an das endothelständige Gal α 1,3Gal-Epitop wird die Komplementkaskade durch die Bindung von C1q an den Fc-Teil der XNA über den klassischen Weg aktiviert (siehe Abb. 1) [9, 70, 87, 133].

Klassischer Aktivierungsweg

Antigen-Antikörper-Komplex + C1q

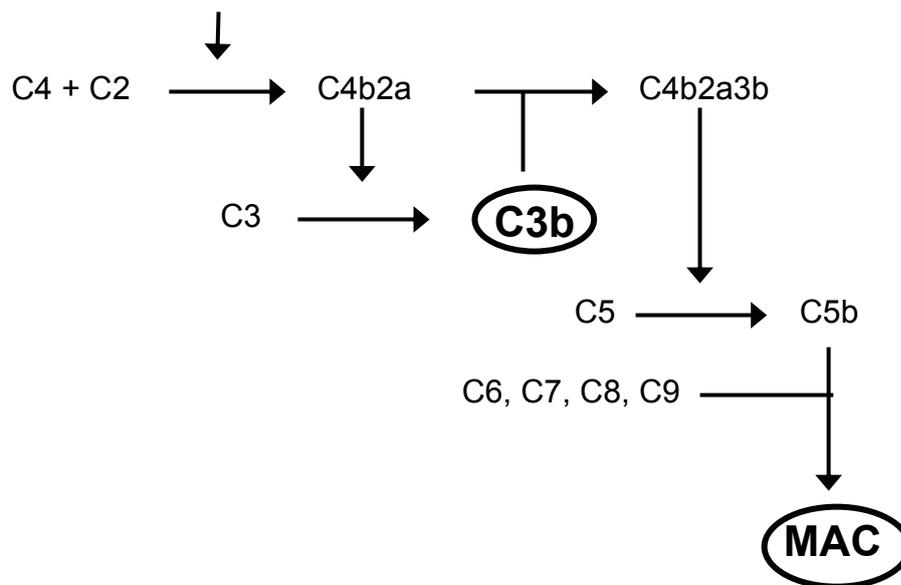


Abb. 1: Schematische Darstellung der Komplementaktivierung über den klassischen Aktivierungsweg mit Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (MAC) [1, 49, 87].

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Regulation der Komplementaktivität unter anderem durch ein Phosphatidylinositol-gebundenes Glykoprotein auf der Zelloberfläche, den decay accelerating factor (DAF, CD55). Dieser 1969 von Hoffmann erstmals beschriebene, transmembrane Komplementregulator ist auf allen peripheren Blutzellen, Endothelien und verschiedenen Epithelzellen der Schleimhäute zu finden und beschleunigt den Abbau der C3-Konvertase, also C4b2a [1, 7]. Somit wird nicht nur die Bildung von C3b und der weitere physiologische Ablauf der Aktivierungskaskade, sondern auch die Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes und die dadurch verursachte Endothelläsion verhindert.

Durch Kontakt mit XNA sowie durch C5b67 und MAC kommt es zu einer Veränderung der Endothelzellformation, wodurch etwa 5µm große interzelluläre Lücken entstehen und die Kontinuität des Endothels unterbrochen wird [10, 12, 126]. Die endotheliale Barrierefunktion zwischen intra- und extravasalem Raum geht verloren und Plättchen-aktivierende Proteine der subendothelialen Basalmembran wie zum Beispiel Kollagen und der von Willebrand-Faktor (vWF) sowie Gewebsthromboplastin (TF) auf den glatten Muskelzellen der Gefäßwände werden freigelegt [10, 65, 126, 150].

Im Falle einer Endothelschädigung kann es somit über den Glykoprotein Ib/IX/V-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche zur Bindung von Thrombozyten an den subendothelialen vWF und damit zur Thrombozytenadhäsion an das Endothel kommen [10, 65, 149, 158, 179].

Der Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes und dessen Einlagerung in die Membran von Endothelzellen folgt durch den Anstieg der zytoplasmatischen Kaliumkonzentration die endotheliale Freisetzung von thrombogenen Mediatoren wie dem Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) und vWF oder die unmittelbare Lyse der Endothelzellen [12, 83]. Die komplementvermittelte Endothelzellschädigung verursacht darüber hinaus eine lokale Vasokonstriktion aufgrund des Verlustes von Stickstoffmonoxyd-Molekülen (NO), was die ischämische Schädigung des Transplantats durch Minderperfusion des Gewebes begünstigt [134].

Antikoagulatorische Faktoren wie Thrombomodulin (TM), tissue factor pathway inhibitor (TFPI) und das Ektoenzym ADPase, das durch Abbau des aus den Thrombozyten stammenden Adenosindiphosphates (ADP) eine Stimulation der

Thrombozytenaggregation durch ADP verhindert, gehen verloren oder können ihre Wirkung aufgrund von speziesspezifischen Differenzen nicht entfalten [9, 10, 82, 91, 143].

Bis zu 50% der endothelialen Heparansulfat-Proteoglykane gehen ebenfalls verloren. Unter physiologischen Bedingungen unterstützen die endothelialen Heparansulfat-Proteoglykane die Barrierefunktion des Endothels und reagieren mit Superoxid-Dismutase zur Inaktivierung freier Radikale sowie mit Antithrombin III zur Hemmung von Thrombin [1, 10, 49, 80, 91, 110, 132]. Aufgrund der beeinträchtigten Wirkungsfähigkeit von Antithrombin III fehlt somit einer der potentesten Inhibitoren des Gerinnungssystems [132, 141]. Das unter physiologischen Bedingungen antithrombotische und antikoagulatorische Endothel wird durch diese Prozesse prokoagulatorisch [9].

Bei der Reperfusion von vaskularisierten Transplantaten kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Histamin, PAF, Thrombin, Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und den Komplementkomponenten C3a und C5a, welche zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führen und die Endothelschädigung verstärken [10, 12, 136, 141]. Diese Form der Endothelzellaktivierung wurde von Bach et al. als Aktivierung vom Typ I bezeichnet, wobei im Gegensatz zur Aktivierung vom Typ II weder die Aktivierung von Genen noch eine de novo-Proteinsynthese eine Rolle spielen [9, 19, 54, 82, 106].

Die endotheliale Sekretion von Mediatoren wie IL-1, TNF- α oder Monozyten-chemotaktischem Peptid-1 (MCP-1) sowie die Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin auf der Endothelzelloberfläche, welches auf nicht-aktivierten Endothelzellen fehlt, bewirken die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten, welche die Endothelzellschädigung noch verstärken können [10, 78, 136, 141].

Es resultiert der Verlust der endothelialen Barrierefunktion mit nachfolgender Ödembildung, interstitieller Hämorrhagie und Bildung von Fibrinthromben [4, 9, 55, 106, 126, 133, 146]. Im Zuge von thrombogenen Prozessen am Endothel und den dadurch gebildeten Blutgerinnsel und Fibrinablagerungen kommt es innerhalb von Minuten nach Gefäßanastomosierung zur Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und zu einem raschen thrombotischen Verschluss der Blutgefäße des Transplantates,

welcher für die hyperakute Xenotransplantatabstoßung kennzeichnend ist und zur Zerstörung des Transplantates führt [1, 9, 87, 141].

Das gestörte Gleichgewicht zwischen thrombogenen und thrombolytischen Vorgängen stellt somit eine Hauptursache für die Zerstörung des Xenotransplantates im Rahmen der hyperakuten Abstoßungsreaktion dar. Die Verbesserung dieser Gerinnungssituation könnte somit einen positiven Einfluss auf diesen Abstoßungsprozess nehmen.

1979 identifizierten Marguerie et al. einen spezifischen Fibrinogenrezeptor auf der Thrombozytenoberfläche [109]. Dieser Rezeptor entspricht dem Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) [128], dessen Vorkommen auf Megakaryozyten und Thrombozyten beschränkt ist [166]. GPIIb/IIIa besteht aus einer α -Untereinheit (IIb) und einer β -Untereinheit (IIIa) und gehört als Integrin zu den Adhäsionsmolekülen der Thrombozytenzellmembran [18, 30, 37, 39, 158]. GPIIb/IIIa dient als Bindungsstelle für Fibrinogen bei der Thrombozytenaggregation [128, 158, 179] und besitzt darüber hinaus eine hohe Affinität für vWF [149, 158, 161].

Die Aktivierung der Thrombozyten durch Mediatoren wie zum Beispiel ADP, PAF, Serotonin, Kollagen, Thromboxan A_2 und Thrombin oder auch durch den Komplementfaktor C1q bewirkt eine Konformationsänderung im GPIIb/IIIa-Rezeptor und dessen Aktivierung, was die Bindung an Fibrinogen und vWF ermöglicht [4, 10, 12, 65, 153]. In diesem Zusammenhang wird das GPIIb/IIIa auch als gemeinsame Endstrecke der Plättchenaggregation bezeichnet, da die Thrombenbildung durch Bindung von Fibrinogen an das GPIIb/IIIa unabhängig vom Thrombozytenaktivierenden Stimulus erfolgt [37, 39, 65, 153].

Als multivalente Moleküle können Fibrinogen und vWF an die GPIIb/IIIa-Rezeptoren verschiedener Thrombozyten binden. Daraus resultiert die Thrombozytenaggregation mit konsekutiver Thrombenbildung [149, 158, 161].

Zur Vermeidung von Thrombenbildung, Mikroembolisation und ischämischen Komplikationen werden bei kardialen Eingriffen wie zum Beispiel bei perkutanen Koronarinterventionen (perkutane transluminale Koronar-Angioplastie, Stentimplantation, Atherektomie) und beim akutem Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris sowie myokardiale Infarkte mit oder ohne ST-Streckenhebungen) Antikoagulanzen verwendet, mit denen der Gerinnungsprozess an verschiedenen Stellen gehemmt werden kann.

Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten binden an den GPIIb/IIIa-Rezeptor, verhindern dadurch die Bindung von Fibrinogen und hemmen die Thrombozytenaggregation unabhängig vom Aktivierungsreiz [30].

Der in dieser Arbeit verwendete Thrombozytenaggregationshemmer Tirofiban (MK-383, Aggrastat[®]) ist ein nicht-peptidischer Antagonist des GPIIb/IIIa-Rezeptors, der in der Klinik vor allem nach Durchführung einer perkutanen transluminalen Koronar-Angioplastie (PTCA) und Stentimplantation sowie zur Therapie des akuten Koronarsyndroms verwendet wird [15, 30, 153, 179]. Tirofiban blockiert kompetitiv die Fibrinogen-Bindungsstellen der GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche und verhindert somit die Plättchenaggregation [161].

4. Fragestellung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit besteht darin, den Einfluss des GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban (Aggrastat[®]) auf die hyperakute Transplantatabstoßung bei der ex vivo-Perfusion von Schweineherzen mit humanem Blut zu untersuchen.

Des Weiteren wurde beobachtet, welche Auswirkungen die hDAF-Transgenität von Schweineherzen im Zusammenhang mit der Applikation von Tirofiban (Aggrastat[®]) während der hyperakuten Transplantatabstoßung bei der ex vivo-Xenoperfusion hat.

Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang war, ob der GPIIb/IIIa-Antagonist Tirofiban eine Verminderung der für das Transplantatüberleben fatalen Gerinnungsvorgänge während der hyperakuten Xenotransplantatabstoßung bei ex vivo-Perfusionen bewirken konnte.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Operative Versuchsvorbereitung

1.1. Versuchstiere

Die am Institut für Chirurgische Forschung durchgeführten Versuche erfolgten nach der Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern.

1.1.1. Nicht-transgene Tiere

Zwei Versuchsgruppen bestanden aus nicht-transgenen Schweinen der Deutschen Landrasse. Die Tiere waren beiderlei Geschlechts und stammten aus dem Lehr- und Versuchstiergut Badersfeld der Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleissheim, Deutschland, beziehungsweise aus dem Institut für Tierzucht und Tierverhalten der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Neustadt-Mariensee, Deutschland.

1.1.2. Transgene Tiere

Die dritte Versuchsgruppe bestand aus transgenen Schweinen, die das humane, endothelständige Komplement-Regulatorprotein hDAF exprimierten. Bezogen wurden diese Tiere von der Novartis Pharma AG über HARLAN ITALY Srl, Correzzana, Italien.

Die Schweine entstammen einer transgenen Linie (A74), welche über die sogenannte Mikroinjektionstechnik generiert wurde. Dieses Verfahren ist bereits seit 1966 bekannt und wurde erstmals im Jahre 1980 erfolgreich für den Transfer von Fremd-DNA in Mäuseembryonen eingesetzt [119].

Für die Produktion der hDAF-transgenen Schweine wurde der Pronukleus befruchteter Eizellen mittels Mikroinjektion eines 6,5 kB langen Minigen-Konstrukts manipuliert. Dieses Minigen-Konstrukt besteht zum einen aus einem 4 kB langen humanen DNA-Fragment, welches die genetische Information des hDAF-Gens enthält. Dazu gehören die nicht übersetzte 5'-Region, die Signalpeptidsequenz sowie das erste Exon und 0,4 kB des ersten Introns des Gens.

Zum anderen beinhaltet das Minigen-Konstrukt ein cDNA-Fragment, das mit obigem Fragment verbunden ist und die letzten zehn Exons des hDAF-Gens enthält [44, 101, 148].

1.2. Versuchsgruppen

Gruppe 1 (G1):

Die Herzen dieser Gruppe stammten aus nicht-transgenen Schweinen der Deutschen Landrasse (n=6). Die Organperfusion erfolgte mit heparinisiertem Humanblut.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere beiderlei Geschlechts betrug 15,1 kg \pm 1,9 kg.

Gruppe 2 (G2):

Wie bei G1 dienten nicht-transgene Schweine der Deutschen Landrasse als Spender für die Herzen (n=6). Im Unterschied zu G1 wurde dem Perfusat nun der GPIIb/IIIa-Antagonist Tirofiban zugegeben.

Gemäß der vom Hersteller (MSD SHARP & DOHME GMBH, Haar, Deutschland) empfohlenen Dosierungsanleitung würden einem 70 kg schweren Empfänger mit 5 l Blutvolumen eine Initialinfusionsrate von 32 ml/h für 30 min und anschließend eine Erhaltungsinfusionsrate von 8 ml/h verabreicht werden. Ausgehend von dieser Dosierung wurden für die verwendeten 500 ml Perfusat eine Initialinfusionsrate von 3,2 ml/h sowie eine Erhaltungsinfusionsrate von 0,8 ml/h errechnet.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere beiderlei Geschlechts betrug 10,4 kg \pm 2,1 kg.

Gruppe 3 (G3):

Für die Versuche dieser Gruppe wurden die Herzen der hDAF-transgenen Schweine verwendet (n=6). Auch in dieser Gruppe enthielt das Perfusat den GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban in der bereits beschriebenen Dosierung.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere beiderlei Geschlechts betrug 12,9 kg \pm 0,9 kg.

1.3. Anästhesie

Im Tierstall des Instituts hatten die Tiere präoperativ freien Zugang zu Wasser bei Nahrungskarenz ab dem Vorabend des Versuchs.

1.3.1. Sedierung

Etwa eine halbe Stunde vor Operationsbeginn erhielten die Tiere zur Sedierung 10 mg/kg KG Azaperon (Stresnil[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 10 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) intramuskulär, sowie 0,007 mg/kg KG Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun[®], B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) subkutan. Anschließend wurde eine Ohrvene der Schweine (BD Insite-W[™] 24, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Inc., Sandy, USA) zur intravenösen Applikation von Medikamenten und zur Volumensubstitution kanüliert.

1.3.2. Narkose

Die Tiere erhielten zur Narkoseeinleitung vor der Intubation in Rückenlage 5-10 mg Midazolamhydrochlorid (Midazolam-ratiopharm[®], ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), 0,1-0,2 mg Fentanyl (Fentanyl-Janssen[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), sowie 0,1 mg/kg KG Pancuroniumbromid (Pancuronium CuraMED[®], CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) intravenös. Die Intubation erfolgte mit einem Spiral-Trachealtubus der Stärke 5.0 (Safety-Flex[™], Mallinckrodt, Athlone, Irland). Die Versuchstiere wurden mit einem Sauerstoff-Druckluftgemisch volumenkontrolliert beatmet (Servo Ventilator 900B, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland), wobei sich die Atemfrequenz mit $f = 20/\text{min}$ und das Tidalvolumen mit $V_T \approx 15\text{ml/kg KG}$ an Werten aus dem Humanbereich orientierten.

Zur Narkoseerhaltung erhielten die Tiere 3 ml/h Propofol (Recofol[®] 2%, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) per infusionem und bis zur Sternotomie in Abhängigkeit von der bereits verabreichten Dosis weitere 0,3-0,4 mg Fentanyl (Gesamtdosis 0,5 mg).

1.3.3. Lagerung und Überwachung

Direkt nach der Intubation wurden die Tiere mit Mullbinden an den Extremitäten in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert.

Die arterielle Blutdruckmessung erfolgte über einen Katheter, welcher in Seldinger Technik in die chirurgisch freigelegte Arteria iliaca externa platziert worden war (LEADER CATH, Ø 0,9mm, Vygon, Ecoen, Frankreich). Blutproben aus diesem Zugang wurden zur arteriellen Blutgasmessung (Gas Analyser 348[®], Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) und zur Kontrolle des Blutverlustes durch Hämoglobinbestimmung (Coulter AcT, Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland) verwendet.

Über einen zentralvenösen Zugang (BD Insyte-W[™] 24, Becton Dickinson Infusion Therapie Systems Inc., Sandy, USA) in die Vena iliaca externa derselben Leiste konnten eine adäquate Flüssigkeitssubstitution mit NaCl (Isotone Kochsalzlösung 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland) fortgeführt und Medikamente appliziert werden.

Die Präparation der Leistengefäße erfolgte unter sorgfältiger chirurgischer Blutstillung (Elektrotom 300B, Martin Medizin Elektronik, München, Deutschland).

Der arterielle Blutdruck und das EKG wurden kontinuierlich überwacht (Sirecust 304D, Siemens AG, Erlangen, Deutschland).

1.4. Operatives Vorgehen

1.4.1. Herzexplantation

Der chirurgische Zugang erfolgte über eine mediane Sternotomie und Perikardiotomie.

Nach ihrer Separation wurden Aorta, Vena cava superior und Vena cava inferior angeschlossen. Die systemische Vollheparinisierung (Heparin-Natrium Braun[®], B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) mit 500I.E./kg KG erfolgte über die Vena cava superior.

In die Aorta ascendens wurde eine Tabaksbeutelnaht zur Fixierung der Aortenwurzelkanüle (DLP[®], Aortic Root Canula, Medtronic Inc., Minneapolis, USA) angelegt. Nach Fixierung der Kanüle wurde das entlüftete und mit HTK-Lösung nach Bretschneider (Custodiol[®], Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) gefüllte Perfusionssystem angeschlossen.

Anschließend erfolgte die Ligatur und Inzision der Vena cava inferior sowie die Querklemmung der Vena cava superior, was das Leerschlagen des Herzens zur Folge hatte. Nach dem Abklemmen der Aorta ascendens distal der Perfusionskanüle und der Eröffnung einer linken Lungenvene zur linksventrikulären Entlastung wurde die antegrade Koronarperfusion mit 50 ml/kg KG kalter Bretschneider'scher Lösung (4°C) sowie eine topische Kühlung mit 4°C kalter Ringer-Spüllösung (Ringer Spüllösung DeltaSelect, DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland) vorgenommen. Im Anschluß an die Perfusion und nach Entfernung der Aortenwurzelkanüle wurde die Tabaksbeutelnaht um die Einstichstelle zugezogen und verknotet.

Nach Durchtrennung von Vena cava inferior, Vena cava superior, Truncus pulmonalis, Arcus aortae und Trachea sowie der Lungenvenen wurden Herz und Lunge en bloc entnommen.

1.4.2. Herzpräparation

Während der gesamten Dauer der Back-Table-Präparation wurde das Herz mit 4°C kalter Ringer-Spüllösung topisch gekühlt.

Nachdem alle Lungenvenen ligiert und beide Lungenflügel abgetrennt worden waren, wurde das Herz noch vor dem Einnähen der Adapterkanülen gewogen (Mettler PL1200, Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz). Die Venae cavae inferior et superior wurden mit einer Ligatur verschlossen. Um das Herz an das

Perfusionssystem anschließen zu können, wurden Kanülen in das Atrium sinistrum, die Aorta ascendens und den Truncus pulmonalis eingebracht.

Die kalte Ischämiezeit betrug durchschnittlich $59 \text{ min} \pm 13,5 \text{ min}$.

In der Gruppe G1 betrug die kalte Ischämiezeit $59,8 \pm 9,6 \text{ min}$, in der Gruppe G2 $59,5 \pm 14,3 \text{ min}$ und in der Gruppe G3 $57,3 \pm 17,8 \text{ min}$.

Zwischen den Ergebnissen der einzelnen Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede ($P = 0,947$ im One Way ANOVA-Verfahren).

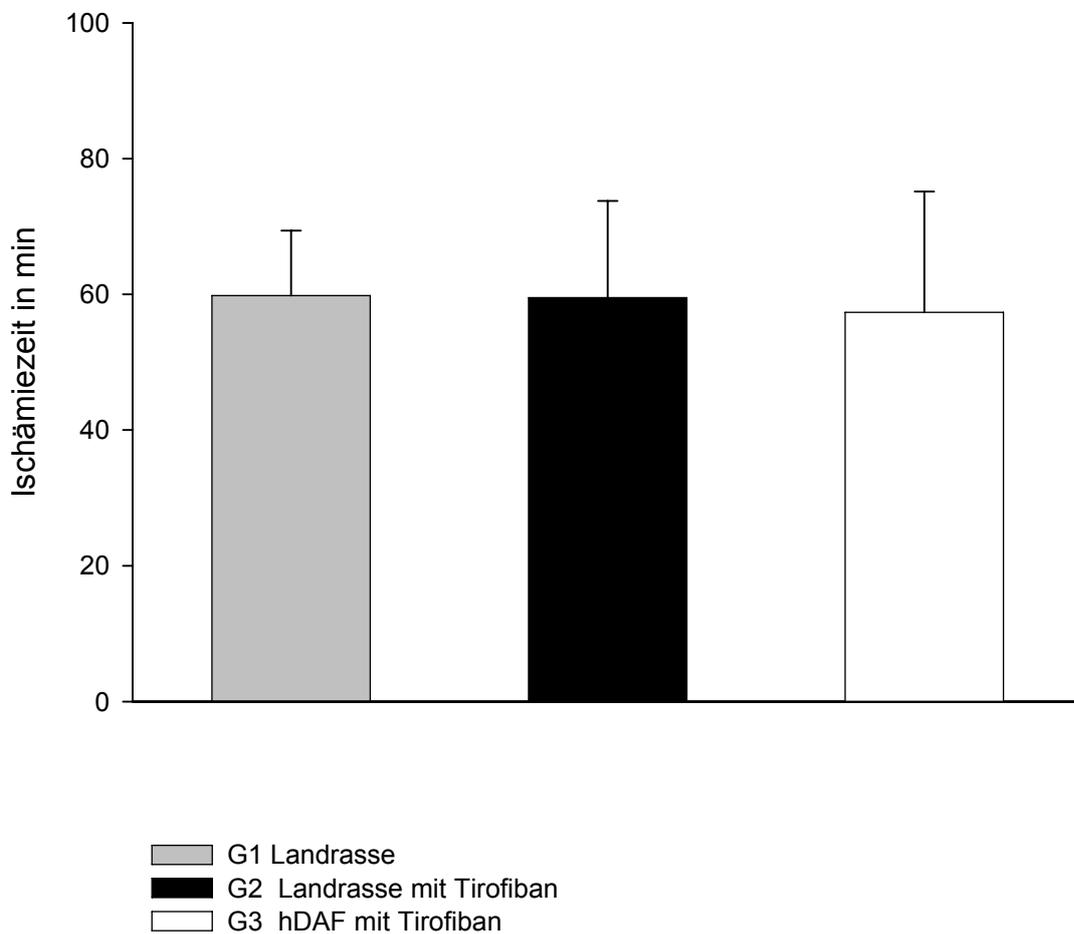


Abb. 2: Kalte Ischämiezeit

2. Organperfusion

2.1. Working-Heart-Modell

Das verwendete Perfusionsmodell orientierte sich an dem Working-Heart-Modell, welches in dieser Form erstmals 1993 von Forty et al. beschrieben und von Suckfüll et al. weiter modifiziert worden war (siehe Abb. 3) [63, 167].

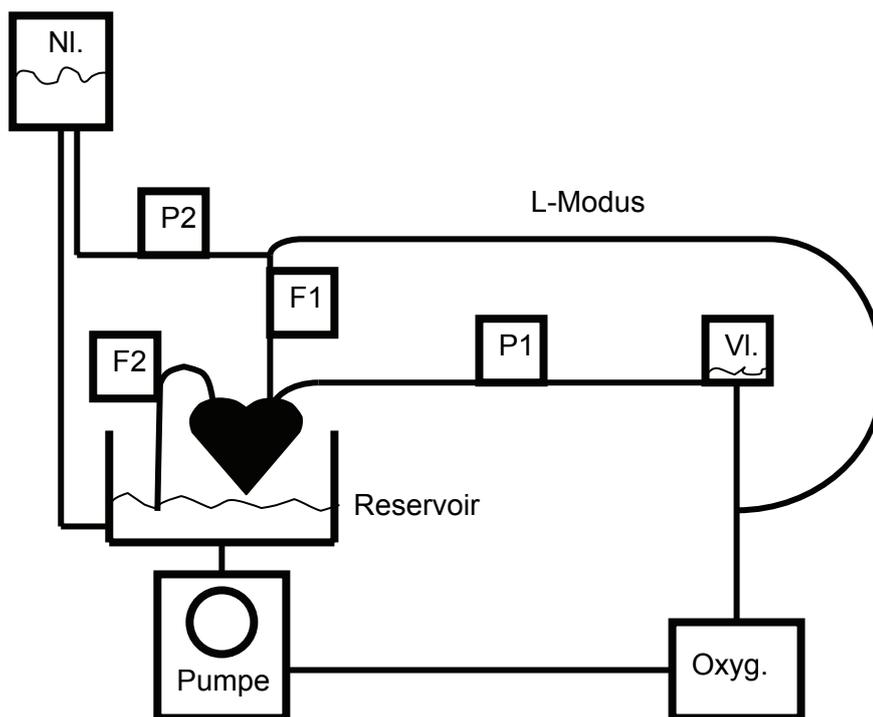


Abb. 3: Schematische Darstellung des Working-Heart-Modells

L-Modus	Blutverlauf während des Langendorff Modus
NI.	Nachlast-Blutpool (55 mmHg)
Oxyg.	Oxygenator mit Wasserbad und Temperatursonde
Pumpe	Rollerpumpe
P1	Druckmessung von LAP
P2	Messung von Blutdruck und MAP, Blutentnahme (arteriell)
F1	Messung des Herzminutenvolumens
F2	Messung des koronaren Blutflusses, Blutentnahme (venös)
Reservoir	Blutreservoir mit Wasserbad und Temperatursonde
VI.	Vorlast-Säule (11 mmHg)

2.2. Perfusat

Als Perfusat diente humanes Warmblut von männlichen Spendern im Alter zwischen 20 und 30 Jahren. Bei den randomisiert ausgewählten Blutspendern lagen zum Zeitpunkt der Blutentnahme weder Allergien oder Infekte noch eine regelmäßige oder kürzlich erfolgte Medikamenteneinnahme vor. Für die Entnahme von 500ml Blut wurden mit 100 I.E./50ml heparinisierte (Heparin-Natrium Braun[®], B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) Perfusorspritzen verwendet.

Das frisch entnommene Blut wurde ca. 35 min vor Perfusionsbeginn in das Perfusionssystem gefüllt und das Perfusionssystem entlüftet. Das Blut wurde mit Voll-Elektrolyt-Lösung auf den Hämatokrit von 30% verdünnt, welcher dem natürlichen porzinen Hämatokrit entspricht [79, 80]. Das Perfusionssystem enthielt somit ein Gesamtvolumen von ungefähr 800ml.

In den Gruppen G2 und G3 wurden dem heparinisierten Perfusat vor Perfusionsbeginn 90mg DL-Lysinmono(acetylsalicylat) (Aspisol[®], Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) sowie Tirofibanhydrochlorid (Aggrastat[®], MSD SHARP & DOHME GMBH, Haar, Deutschland) in der unter 1.2 beschriebenen Dosierung zugegeben.

2.3. Perfusionsprotokoll

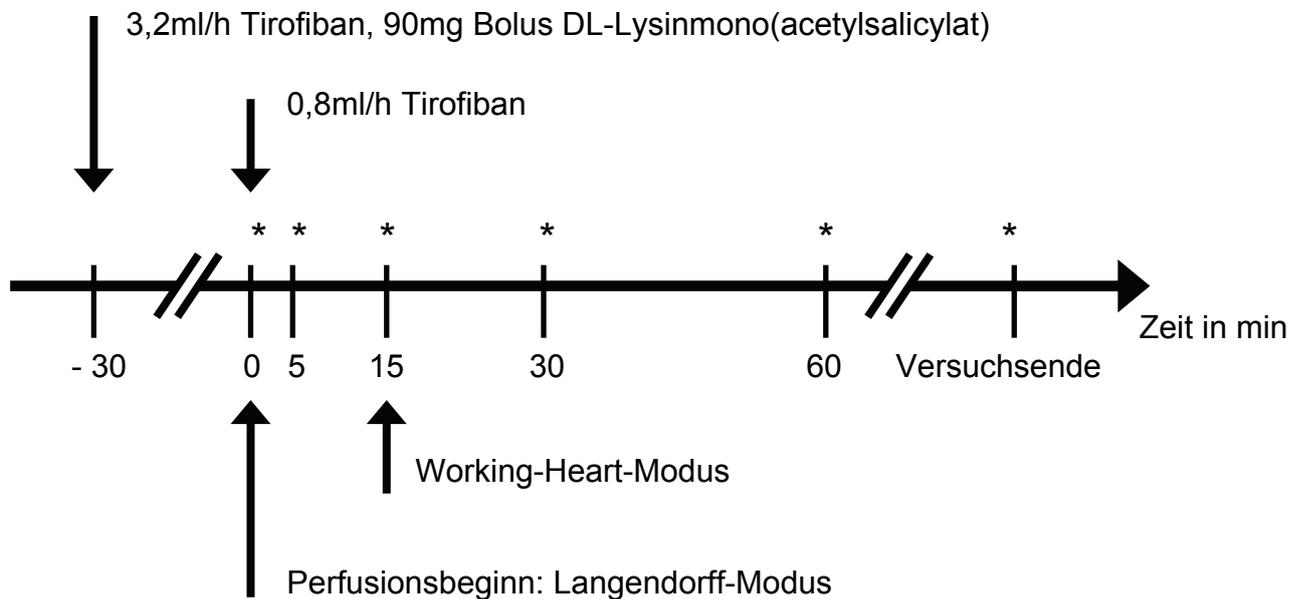


Abb. 4: Diagramm des Perfusionsablaufes

In der obigen Abbildung nicht dargestellt ist der Zeitpunkt etwa eine Stunde vor Perfusionsbeginn, an dem die Blutentnahme direkt vom humanen Spender erfolgte. Die Entnahme von Blutproben aus dem System fand an sieben verschiedenen Zeitpunkten statt. Zum Zeitpunkt 1, d.h. eine halbe Stunde vor Beginn der Organperfusion, wurde die erste Blutprobe aus dem Perfusionssystem entnommen. Der Zeitpunkt 2 markiert weitere Blutentnahmen zu Beginn der Xenoperfusion, welche initial im Langendorff-Modus erfolgte. Zum Zeitpunkt 3 wurde 5 min nach Perfusionsbeginn weitere Blutproben aus dem System entnommen. Zum Zeitpunkt 4, d.h. nach 15 min Perfusionsdauer erfolgten weitere Blutentnahmen sowie die Umstellung vom Langendorff-Modus in den Working-Heart-Modus. 30min und 60 min nach Perfusionsbeginn sowie am Versuchsende wurden ebenfalls Blutproben entnommen. Alle Blutproben wurden gleich nach Entnahme bei 4000U/min für 10 min zentrifugiert. Das abpipettierte Serum wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -72°C gelagert.

Zusätzlich zu den Blutentnahmen erfolgten ab Perfusionsbeginn bis zum Versuchsende zu den jeweiligen Zeitpunkten 2 bis 7 Druck-, Blutgas-, Herzfrequenz- und Flussmessungen, welche in der Abbildung 4 mit Stern (*) gekennzeichnet sind.

2.4. ex vivo-Perfusionsanlage

2.4.1. Perfusionsvorbereitung

Während der Vorbereitungsphase wurden mehrere Kontrollen von Blutgasen und Elektrolyten durchgeführt (Gas Analyser 348[®], Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) und etwaige Abweichungen ausgeglichen (Natriumhydrogencarbonat 8,4% Infusionslösungskonzentrat B. Braun[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; Calcium Braun 10%[®], Calciumgluconat 1H₂O, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; 1M-Kaliumchlorid-Lösung pfrimmer, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). In das Perfusionssystem integrierte Wasserbäder gewährleisteten die Erwärmung des Perfusates auf etwa 37,0°C sowie die Aufrechterhaltung dieser Temperatur. Dies wurde mittels Temperatursonden im Perfusat kontrolliert.

2.4.2. Perfusion

Das gesamte Perfusionssystem bestand aus PVC- und Silikonschläuchen für den medizinischen Gebrauch mit einem Durchmesser von 0,8 cm (Versuchsset, Firma Stöckert Instrumente GmbH, München, Deutschland).

Initial fand die Reperfusion des Herzens im retrograden Langendorff-Modus statt. Das Blut aus dem Oxygenator wurde unter Umgehung der Vorlastsäule gegen die Schwerkraft direkt in die Nachlastsäule gepumpt. Die Reperfusion der Koronarien erfolgte somit antegrad über den retrograden Blutfluss in der Nachlastsäule.

Nach 15 min Perfusion im Langendorff-Modus fand die rasche Umstellung auf den Working-Heart-Modus statt. Im Working-Heart-Modus wurde das Blut aus dem linken Ventrikel gegen die Schwerkraft zum Nachlastreservoir gepumpt, wobei das Herz eine Nachlast von 55 mmHg zu bewältigen hatte. Mittels einer Flowprobe (Transonic[®] Flowprobe, Transonic Systems Inc., Ithaca, USA) wurde dabei das Herzminutenvolumen ermittelt. Vom Nachlastreservoir gelangte das Blut über ein hydrostatisches Druckgefälle in das Hauptreservoir. Das im Hauptreservoir befindliche Blut wurde konstant über eine Rollerpumpe (MCP-Pumpantrieb, IsmaTec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) zu einem Oxygenator (D 902 LILLIPUT 2, DIDECO, Mirandola, Italien) gepumpt. Der Oxygenator war an eine Sauerstoffzufuhr von 0,2 l/min sowie an eine Kohlenstoffdioxidzufuhr von 0,01 l/min angeschlossen. Der Sauerstoff stammte aus der zentralen Gasversorgung des OPs. Die

Kohlenstoffdioxidversorgung erfolgte über Gasflaschen. Die Zufuhr der Gase konnte bei Bedarf über eine Gasuhr reguliert werden. Vom Oxygenator gelangte das sauerstoffreiche Blut über eine Vorlastsäule von 11 mmHg in den linken Vorhof des Herzens. Der Weitertransport des Blutes hing nun von der Pumpleistung des Herzens ab. Das über die Koronarien und das Myokard ins rechte Herz gepumpte koronarvenöse Blut wurde über einen Schlauch im kanülierten Truncus pulmonalis direkt in das Hauptreservoir zurückgeleitet. Der koronare Blutfluss wurde dabei durch eine Flowprobe (Transonic[®] Flowprobe, Transonic Systems Inc., Ithaca, USA) bestimmt.

Im Falle einer Bradykardie oder Asystolie wurde das Herz über passagere Schrittmachersonden (MEDTRONIC[®] 5375 Demand-Schrittmacher, MEDTRONIC GMBH, Düsseldorf, Deutschland) stimuliert. Für die Behandlung tachykarder Rhythmusstörungen stand ein Defibrillator (Theracard 361D, Siemens, Deutschland) mit internen Defibrillatorpaddels (internal paddles for children, Lohmeier Medizin Elektronik GmbH & Co., München, Deutschland) zur Verfügung.

Zwei Wasserbäder waren in das Perfusionssystem integriert, um das zirkulierende Blut auf der gewünschten Temperatur von etwa 37,0°C zu halten. Ein Wasserbad (Haake E423, Gebrüder Haake, Berlin-Lichtenfelde, Deutschland) lieferte warmes Wasser für ein Schlauchsystem, das den zu- und den abführenden Nachlastschlauch erwärmte. Dasselbe Wasserbad versorgte auch das Hauptreservoir mit warmem Wasser. Das Hauptreservoir war doppelwandig konstruiert, so dass das Blut im Reservoir permanent von außen angewärmt wurde. Der Oxygenator enthielt ein integriertes Wärmeaustauschsystem, welches aus einem gesonderten Wasserbad versorgt wurde (thermamed 5001, GFL electronic, Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co., Burgwedel, Deutschland).

Die Einhaltung der Zieltemperatur des Perfusates wurde durch Temperatursonden im Hauptreservoir und im Oxygenator überwacht.

2.4.3. Perfusionsende

Als Versuchsende galt der Zeitpunkt, an dem das Herz die Nachlast von 55 mmHg nicht mehr bewältigen konnte und somit das Transplantatversagen eingetreten war.

3. Messparameter

3.1. Organphysiologie und Hämodynamik

3.1.1. Druckmessung

Im Perfusionsprotokoll waren zu definierten Zeitpunkten Druckmessungen vorgesehen. Um diese Messungen durchführen zu können, wurden an zwei Stellen im Perfusionskreislauf Druckabnehmer (Einfach-Dom-Set, Becton Dickinson Critical Care Systems Pte. Ltd., Singapur; Physiological Pressure Transducer, OHMEDA, Madison, USA) installiert (P1 und P2 in Abbildung 2), über welche die Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und des linksatrialen Druckes (LAP) erfolgte. Die Daten der Druckmessung wurden kontinuierlich über Monitor angezeigt (SIRECUST 960, Siemens, USA).

3.1.2. Herzminutenvolumen

Das Herzminutenvolumen (HMV) als Maß für die Auswurfleistung des Herzens wurde über eine Flowprobe (Transonic® Flowprobe, Transonic Systems Inc., Ithaca, USA) gemessen, die kurz hinter der Aortenkanüle in das Perfusionssystem eingefügt worden war. Um den unterschiedlichen Herzgrößen gerecht zu werden, wurden die Ergebnisse der Messung nach dem jeweiligen Herzgewicht korrigiert.

Die Auswertung und Darstellung der Flussmessungen erfolgte über einen Rechner mit entsprechender Software (DASYLAB, Datalog, Mönchengladbach, Deutschland).

3.1.3. Schlagarbeitsindex

Die Berechnung des Schlagarbeitsindex (SAI) als Maß für die Funktionsfähigkeit des Herzens erfolgte nach der Formel:

$$\text{SAI} = ((P - \text{LAP}) * 1333 * \text{HMV}) / (\text{HF} * \text{HG})$$

3.1.4. Koronarfluss

Die Flowprobe zur Messung des Koronarflusses war direkt hinter der Kanüle im Truncus pulmonalis platziert.

Das Ergebnis der Messung wurde nach dem jeweiligen Herzgewicht korrigiert, um den unterschiedlichen Herzgrößen gerecht zu werden.

3.1.5. Koronarwiderstand

Die Berechnung des Koronarwiderstandes (KW) erfolgte anhand folgender Formel:

$$KW = MAP / \text{Koronarfluss}$$

3.1.6. Sauerstoffverbrauch

Die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ($avDO_2$) im Perfusat als Maß für die Anstrengung des Herzens wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$avDO_2 = (h \cdot pO_{2 \text{ art}} \cdot Hb_{\text{art}}) - (h \cdot pO_{2 \text{ ven}} \cdot Hb_{\text{ven}})$$

Die in der Formel verwendete Konstante h ist die Sauerstoffbindungskapazität von Hämoglobin (Hüfner-Zahl):

$$h = 1,34 \text{ ml O}_2/\text{g Hb}$$

Der arterielle und der venöse Sauerstoffpartialdruck [$pO_{2 \text{ art}}$] und [$pO_{2 \text{ ven}}$] sowie die arterielle und die venöse Hämoglobinkonzentration [Hb_{art}] und [Hb_{ven}] wurden mit Hilfe eines Blutgasmessgerätes (Gas Analyser 348[®], Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) ermittelt.

3.1.7. Überlebenszeit

Als Überlebenszeit eines Herzens galt der Zeitraum zwischen dem Perfusionsbeginn und dem Transplantatversagen.

3.1.8. Gewichtszunahme

Das Herzgewicht (HG) wurde zum einen nach der Organexplantation vor dem Einnähen der Kanülen, zum anderen nach dem Perfusionsende und dem Entfernen der Kanülen bestimmt (Mettler Feinwaage PL1200, Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz). Die Gewichtszunahme als Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Gewicht nach Perfusion wurde in Prozenten des Ausgangsgewichts angegeben.

3.2. Gerinnungsparameter

Die vorliegenden Gerinnungsparameter wurden nach Standardverfahren am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, bestimmt. Die Konzentrationen der Gerinnungsinhibitoren Antithrombin III und Protein C wurden in Prozenten des Ausgangswertes angegeben. Der Verbrauch von Fibrinogen, also der Plasmakonzentrationsabfall als Maß für bereits stattgefundene Gerinnungsvorgänge, wurde ebenfalls in Prozenten des Ausgangswertes angegeben. Als Ausgangswert galt die jeweilige Plasmakonzentration zu Beginn der Perfusion, das heißt nach Verdünnung auf den Zielhämatokrit von 30%.

Sowohl die Prothrombinzeit als auch die partielle Thromboplastinzeit wurden zur Überprüfung der Heparinisierung routinemäßig bestimmt, um größere Schwankungen im System zu vermeiden (Heparinisierung des Spenderblutes ab dem Zeitpunkt der Blutentnahme in die Perfusorspritzen mit 100 I.E./50ml).

3.3. Serumchemie

Die Bestimmung der geltenden Parameter als Maß für den Untergang von Herzmuskelgewebe erfolgte nach Standardmethoden am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Ermittelt wurden die Kreatinkinase (CK) und deren Isoenzym CK-MB, das vor allem im Myokard zu finden ist. Die Kreatinkinase (CK) und deren Isoenzym CK-MB werden als intrazelluläre Enzyme beim Untergang von Muskelzellen freigesetzt und finden Verwendung als Marker für eine myokardiale Schädigung.

Auch die Serumkonzentrationen von Aspartataminotransferase (ASAT) und Lactatdehydrogenase (LDH), die beide in den Myokardzellen enthalten sind und bei Herzmuskelschädigung einen Serumkonzentrationsanstieg aufweisen, wurden bestimmt. Für die Bestimmung von pH-Wert, Bicarbonatkonzentration und Basenexzess stand ein Blutgasmessgerät (Gas Analyser 348[®], Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) zur Verfügung, welches auch bei der Konzentrationsbestimmung der Elektrolyte Natrium, Kalium und Kalzium Verwendung fand.

3.4. Hämatologie

Ermittelt wurden die Konzentrationen von Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten und Leukozyten (Coulter AcT, Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland). Die Ergebnisse der Thrombozyten- und Leukozytenbestimmung wurden in Prozenten des Ausgangswertes angegeben. Als Ausgangswert galt die jeweilige Plasmakonzentration zu Beginn der Perfusion, das heißt nach Verdünnung auf den Zielhämatokrit von 30%.

Die Färbung der Blutausrichre für die Differentialblutbestimmung erfolgte nach Pappenheim (panoptische Kontrastfärbung) in einem automatischen Färbungsbad (Varistain 4, Shandon Southern Products Ltd., Remcorn, England). Die Auswertung wurde lichtmikroskopisch (biokulares Lichtmikroskop, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt.

3.5. Immunologische Parameter

3.5.1. Komplement

Die Messung der Komplementfaktoren C3 und C4 wurde am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, nach Standardverfahren durchgeführt und in Prozenten des Ausgangswertes angegeben, wobei auch hier die jeweilige Plasmakonzentration zu Beginn der Perfusion als Ausgangswert galt.

3.5.2. Anti-Pig-Antikörper

Nach der Entnahme aus dem Perfusionssystem wurden die Proben bei 4000U/min für 10 min zentrifugiert, die Seren anschließend abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -72°C eingefroren. Für die Erstellung der assays wurden die Proben zunächst für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde von jeder Serumprobe eine Verdünnungsserie mit einem Komplement-Fixationsverdünner (CFD, complement fixation test diluent, ICN, Costa Mesa, USA) von 1:10 bis 1:1280 auf einer Mikrotiterplatte erstellt. Sowohl nach der Zugabe von Kaninchen-Komplement (Serotec, Kidlington, UK), als auch nach der anschließenden Zugabe von porzinen Erythrozyten der Organspender wurden die Platten bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nachdem die Mikrotiterplatten 10 min lang bei 1800U/min zentrifugiert worden waren, wurden je $100\mu\text{l}$ des Überstandes auf Photometerplatten übertragen. Die photometrische Auswertung erfolgte mit einem Multiscan Platten-Ablesegerät bei einer Wellenlänge von 420nm. Für jede Probe wurde die mittlere Absorption berechnet und in AUC-Einheiten ausgedrückt. Humanblutproben dienten als positive Kontrolle. Die gemessene Absorption der humanen Kontrollseren wurde als Standard mit 1000 AUC-Einheiten bewertet.

3.5.3. Anti-Gal α 1,3Gal-Antikörper

Die Serumkonzentration der Anti-Gal α 1,3Gal-Antikörper wurde mittels enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) bestimmt. Nach der Entnahme aus dem Perfusionssystem wurden die Proben bei 4000U/min für 10 min zentrifugiert, die Seren anschließend abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -72°C eingefroren. Die Mikrotiterplatten wurden mit dem Gal α 1,3Gal-Antigen in Form eines Linear-B Trisaccharid Gal α 1,3-Gal β 1,4-GlcNAc-HSA-Komplexes (Dextra Labs, Reading, UK, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ in Karbonpuffer pH 9,6 + 4% bovines Serumalbumin)

vorbeschichtet. Die Kontrollplatten wurden mit PBS beschichtet. Anschließend wurden alle Platten mit blocking solution (Aqua dest., PBS, Tween 20) versetzt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Für die Erstellung der assays wurden die Proben für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Nach Zentrifugieren bei 13000U/min für 5 min wurden die Seren in Verdünnungsreihen auf alle Mikrotiterplatten pipettiert und die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Platten wurden dann mit Anti-IgM- beziehungsweise Anti-IgG-Antikörpern (Dextra Labs, Reading, UK) versetzt und erneut bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurde den Platten zur Induktion einer Farbreaktion ein Phenyldiamin-Kit (Sigma, St. Louis, USA) zugegeben. Die Fixierung erfolgte mit 1M H₂SO₄. Die photometrische Auswertung erfolgte mit einem Multiscan Platten-Ablesegerät bei einer Wellenlänge von 420nm. Die gemessene Absorption der humanen Kontrollseren wurde als Standard mit 1000 AUC-Einheiten bewertet.

3.5.4. Leukozytenoberflächenantigene

Die Oberflächenexpression von HLA-DR, CD3, CD4, CD8, CD11b und CD62L auf Leukozyten wurde nach Antikörpermarkierung mittels Immunfluoreszenzmessung bestimmt. Zu 100µl einer Blutprobe wurden jeweils 5 µl eines monoklonalen mouse-anti-human-Antikörpers zugegeben (Anti-HLA-DR FITC {Klon L243}, CD3 PE {Klon SK7}, CD4 FITC {Klon SK3}, CD8 FITC {Klon SK1}, CD11b PE {Klon D12}, CD62L FITC {Klon SK11}, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA). Nach Inkubation für 30min bei 4°C in Dunkelheit wurde den Proben zur Fixierung der Zellen FACS Lysing Solution (BD FACS™ Lysing Solution, BD Biosciences, San Jose, USA) zugegeben. Nach zweimaliger Waschung mit PBS (PBS 0,81, Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland) wurden die Proben zentrifugiert (Hettich Universal 30RF, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland).

Bis zur Auswertung wurden die Proben bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

Die Immunfluoreszenzbestimmung erfolgte mit Hilfe der Software Cell Quest (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) an einem FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durch Analyse von jeweils 10.000 Ereignissen.

3.6. Histo- und Immunhistopathologie

3.6.1. Materialgewinnung und Materialkonservierung

Im Anschluß an die Herzexplantation wurden postoperativ aus folgenden Organen des Spendertieres Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen entnommen: Lunge, Leber, Nieren, Milz, Aorta ascendens und Truncus pulmonalis sowie Haut von Ohr, Stamm und einer Extremität. Diese Gewebeproben wurden sowohl in 4%igem Formalin fixiert, als auch nach Fixierung mit Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) in flüssigem Stickstoff bei -144°C kryokonserviert und anschließend bei -72°C gelagert.

Unmittelbar nach Perfusionsende wurden Myokardproben aus beiden Atrien und beiden Ventrikeln entnommen und wie die oben erwähnten Gewebeproben zum einen kryokonserviert und zum anderen in Formalin fixiert. Zusätzlich dazu wurde das gesamte noch verbleibende Herzgewebe in 4%igem Formalin konserviert.

Nach der Einbettung in Paraffin wurden die Gewebeproben in 5 μm dicke Präparatscheiben geschnitten.

Die pathologische Auswertung aller Proben erfolgte am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

3.6.2. Histologie

Die Färbung der histologischen Schnittpräparate erfolgte mit Hämatoxylin–Eosin als Standardfärbung für Zellen sowie mit Elastica–van Gieson zur Anfärbung von Muskulatur und kollagenen Fasern.

3.6.3. Immunhistologie

Für die immunhistologische Beurteilung wurden an den Schnittpräparaten verschiedene Färbungen vorgenommen. Alle Präparate wurden nach der Entparaffinierung gegen endogene Peroxidase-Aktivität (H_2O_2) und unspezifischer Hintergrundfärbung (DAKO Proteinblock serum free, Hamburg, Deutschland) behandelt.

Nach einer Vorbehandlung mit Target Unmasking Fluid (TUF, Quarkett, Berlin, Deutschland) in einer 30minütigen Mikrowellenexposition wurde der Human Fibrin-Antikörper (Chemicon, Hofheim, Deutschland, IgG-Konzentration 1,0 mg/ ml) 1:700 mit DAKO Antibody-Diluent (DAKO, Hamburg, Deutschland) verdünnt aufgetragen.

Der Human C5b-9-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland, IgG-Konzentration 0,2 mg/ml) wurde nach Dilution im Verhältnis 1:50 sowie einer 30minütigen Applikation von Protease 24 bei Raumtemperatur als Vorbehandlung zur Färbung der Präparate verwendet.

Zur Anfärbung der Schnittpräparate mit dem Human MPO-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland, Konzentration 0,7 mg/ml) wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:1500 vorgenommen. Eine Vorbehandlung fand nicht statt.

Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Detektion der gebundenen Primär-Antikörper durch DAKO Duet strept/ABCComplex/HRP Kit (Labelled StreptAvidin-Biotin LSAB, DAKO, Hamburg, Deutschland). Die Überprüfung der Färbespezifität erfolgte über eine Negativkontrolle. Dazu wurde der Primär-Antikörper durch Isotyp-Immunglobulin ersetzt.

3.7. Statistik-Auswertung

In die statistische Auswertung wurden alle physiologischen, immunologischen und biochemischen Parameter, die labortechnisch, über Monitoring oder Berechnung ermittelt worden waren, miteinbezogen. Die statistische Auswertung (SigmaStat 3.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA) erfolgte im Two Way ANOVA-Verfahren in erster Linie anhand des Tukey-Testes, in manchen Fällen auch anhand der Student-Newman-Keuls-Methode. Wenn erforderlich wurde das One Way ANOVA-Verfahren angewandt. Die statistische Auswertung der Überlebenszeiten erfolgte nach Kaplan-Meier.

Bei $P < 0,05$ wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen als statistisch signifikant erachtet.

Jeweils zwei Gruppen wurden miteinander verglichen. Zum einen wurde ein Vergleich der beiden Gruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen wurde. Ausschließlich die signifikanten Ergebnisse dieser Auswertung sind in und unter den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

Zum anderen wurde ein Vergleich der gesamten Gruppen miteinander durchgeführt. Die entsprechenden Resultate sind im Text über den jeweiligen Abbildungen zu finden.

C. ERGEBNISSE

1. Organphysiologie und Hämodynamik

1.1. Druckmessung

Der mittlere arterielle Druck (MAP) wurde nach dem jeweiligen Herzgewicht korrigiert, um den unterschiedlichen Herzgrößen gerecht zu werden.

Nach der Umstellung auf den Working-Heart-Modus 15 min nach Perfusionsbeginn wies der MAP in der Gruppe G1 Werte von $0,71 \pm 0,13$ mmHg/g, in der Gruppe G2 von $0,88 \pm 0,12$ mmHg/g und in der Gruppe G3 von $1,32 \pm 0,75$ mmHg/g auf. Im Verlauf der Perfusion kam es in allen drei Gruppen zur Abnahme des mittleren arteriellen Druckes, wobei die Druckverhältnisse in der Gruppe 3 noch deutlich über denen der anderen beiden Gruppen lagen.

Die statistische Auswertung ergab beim Gesamtvergleich der Gruppen miteinander signifikante Unterschiede für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban.

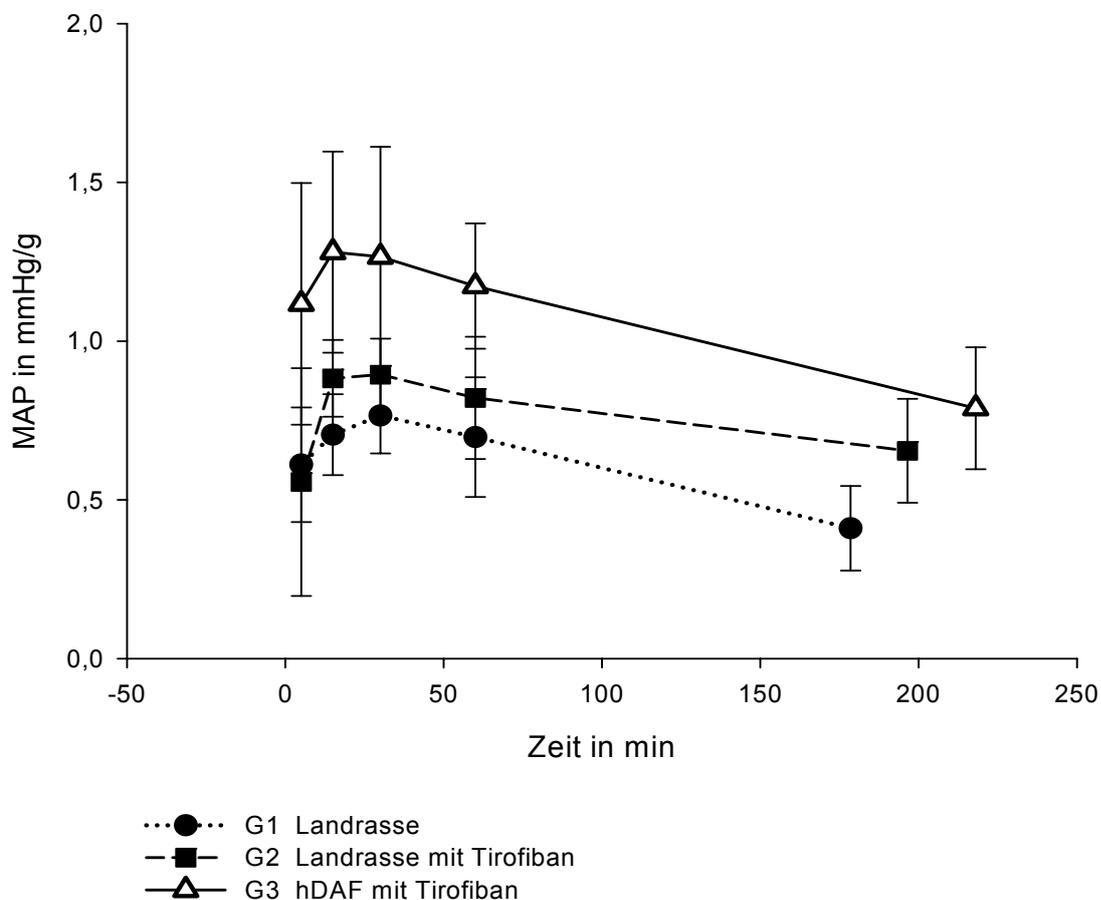


Abb. 5: Mittlerer arterieller Druck während der Perfusion

1.2. Herzminutenvolumen

Das Herzminutenvolumen (HMV) wurde nach dem jeweiligen Herzgewicht korrigiert, um den unterschiedlichen Herzgrößen gerecht zu werden. Zu Beginn des Working-Heart-Modus 15 min nach Perfusionsbeginn betrug das HMV als Maß für die Auswurfleistung des Herzens in der Gruppe G1 $2,58 \pm 0,80$ ml/(min x g), in der Gruppe G2 $2,34 \pm 0,48$ ml/(min x g) und in der Gruppe G3 $2,57 \pm 0,54$ ml/(min x g). Nach einem Anstieg des HMV bis 30 min nach dem Perfusionsbeginn kam es in allen drei Gruppen zu einer Abnahme des HMV, wobei der Werte der Gruppe G3 stets über denen der beiden anderen Gruppen lagen.

Beim statistischen Gesamtvergleich der Gruppen miteinander bestanden keine signifikanten Unterschiede.

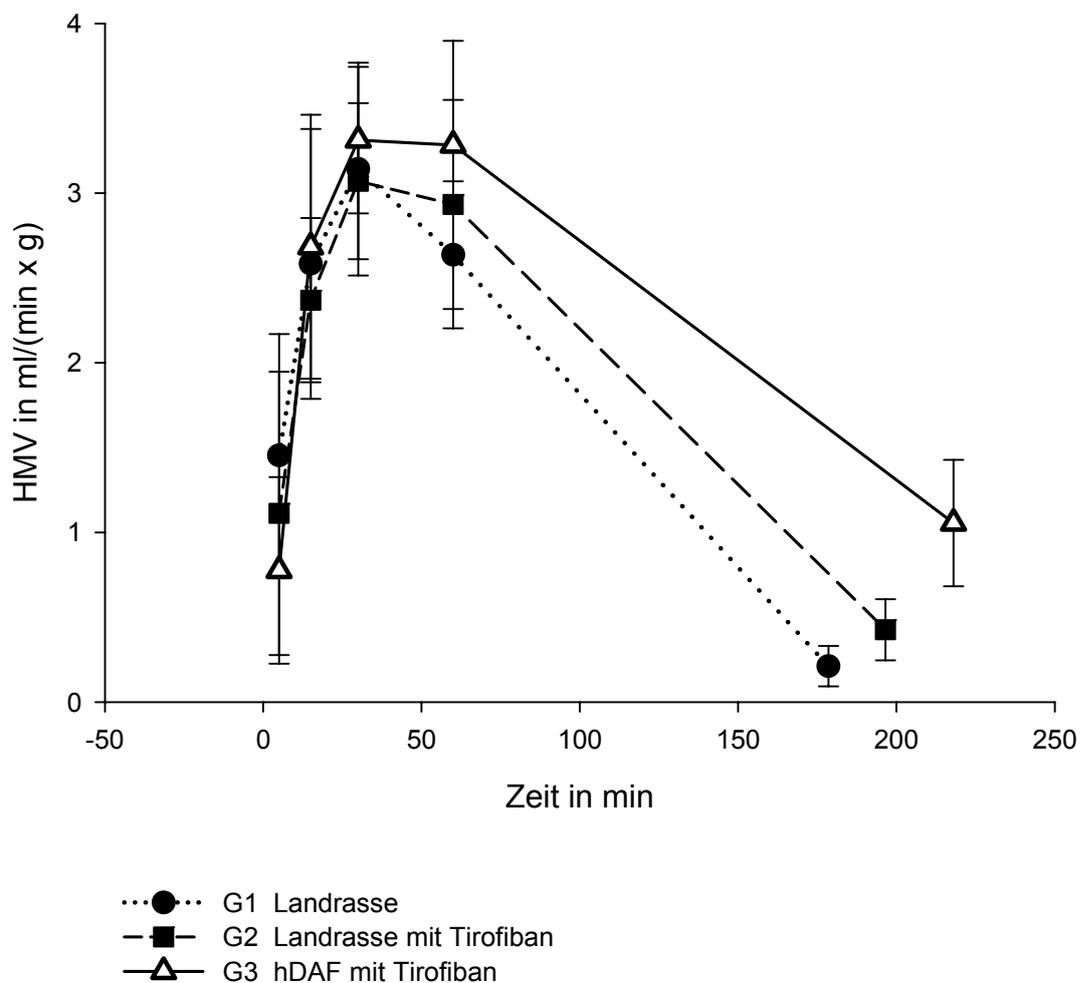


Abb. 6: Herzminutenvolumen während der Perfusion

1.3. Schlagarbeitsindex

Der Schlagarbeitsindex wies in der Gruppe G1 einen sehr steilen Anstieg und Abfall auf. Der Kurvenverlauf in der Gruppe G2 ähnelt dem der Gruppe G1, obwohl keine so hohen Werte wie bei Gruppe G1 erreicht wurden und der Kurvenabfall flacher verlief. In der Gruppe G3 ergab sich nur kurz nach der Reperfusion ein ebenso steiler Kurvenanstieg wie in Gruppe G1 und eine Stunde nach dem Beginn der Perfusion ein Kurvenabfall wie in Gruppe G2. Der dazwischen gelegene Kurvenabschnitt verlief im Vergleich zu den beiden anderen Kurven flach.

Beim Gesamtvergleich der Gruppen miteinander bestanden nach statistischer Auswertung zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

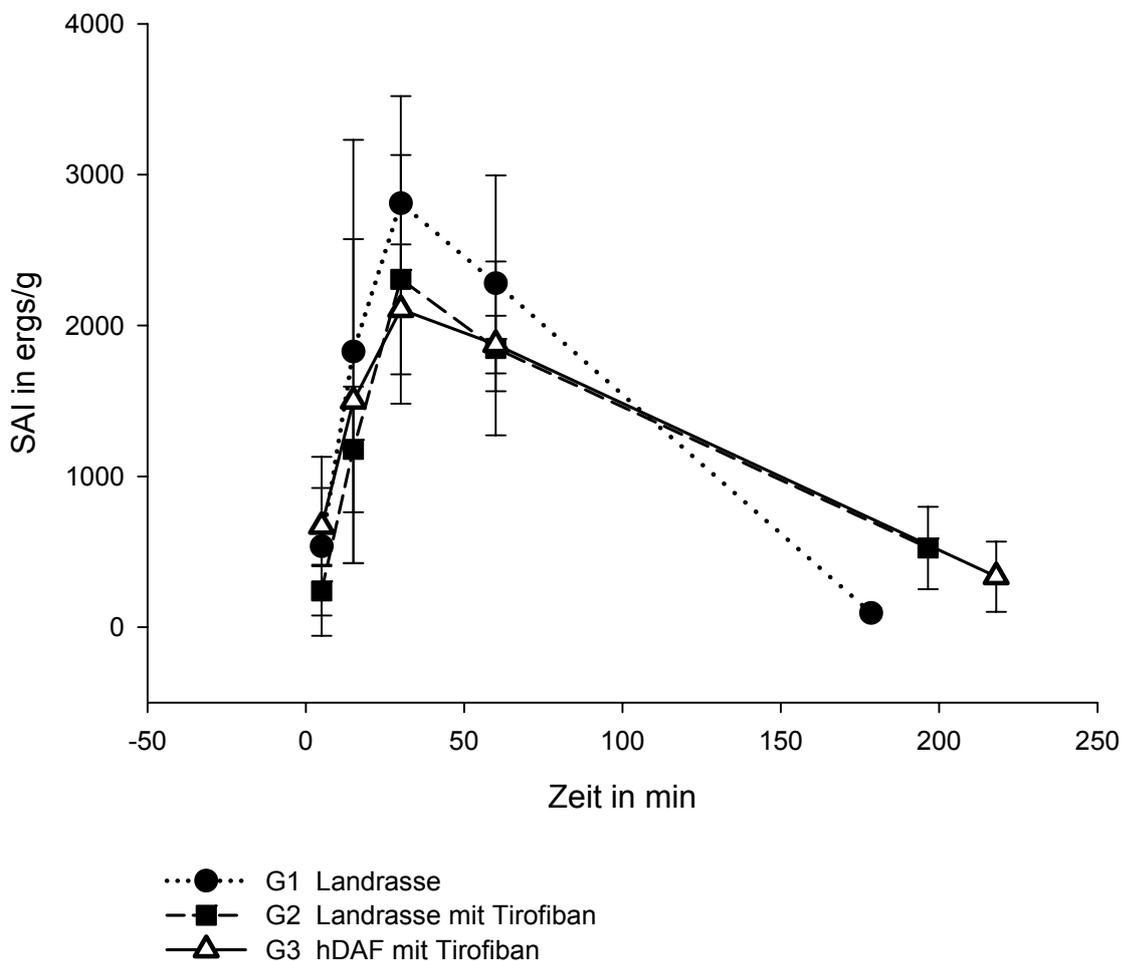


Abb. 7: Schlagarbeitsindex der Schweineherzen während der Perfusion

1.4. Koronarfluss

Der Koronarfluss wurde nach dem jeweiligen Herzgewichtes korrigiert. Zu Beginn der Perfusion wies die Gruppe G1 die steilste Zunahme des Koronarflusses auf. In den Gruppen G2 und G3 war in diesem Zeitraum ein flacherer und nahezu paralleler Kurvenanstieg zu finden. 60 min nach dem Perfusionsbeginn kam es in der Gruppe G3 zu einem Anstieg des Koronarflusses, während die Kurven der Gruppen G1 und G2 annähernd parallel verliefen.

Die statistische Auswertung ergab beim Gesamtvergleich der Gruppen miteinander keine signifikanten Unterschiede.

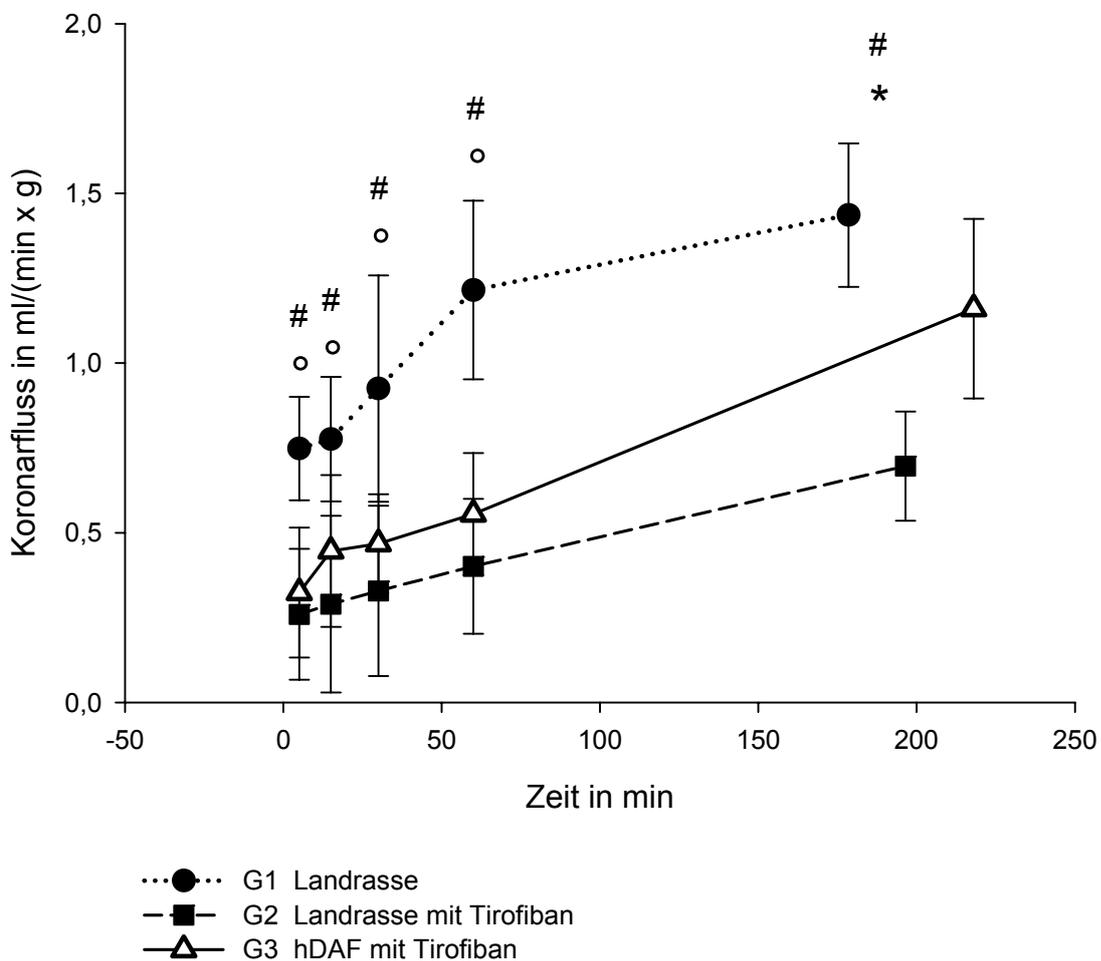


Abb. 8: Koronarfluss während der Perfusion

= P < 0,05 für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

° = P < 0,05 für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

* = P < 0,05 für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

1.5. Koronarwiderstand

Initial kam es in allen drei Gruppen zu einem Anstieg. 30 min nach dem Perfusionsbeginn folgte eine stetige Abnahme des Koronarwiderstandes. Die stärkste Abnahme war dabei in der Gruppe G3 zu verzeichnen, was dem vergleichsweise deutlicheren Anstieg des Koronarflusses in der Gruppe G3 entspricht.

Beim statistischen Gesamtvergleich der Gruppen miteinander ergaben sich signifikante Unterschiede für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban sowie für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban.

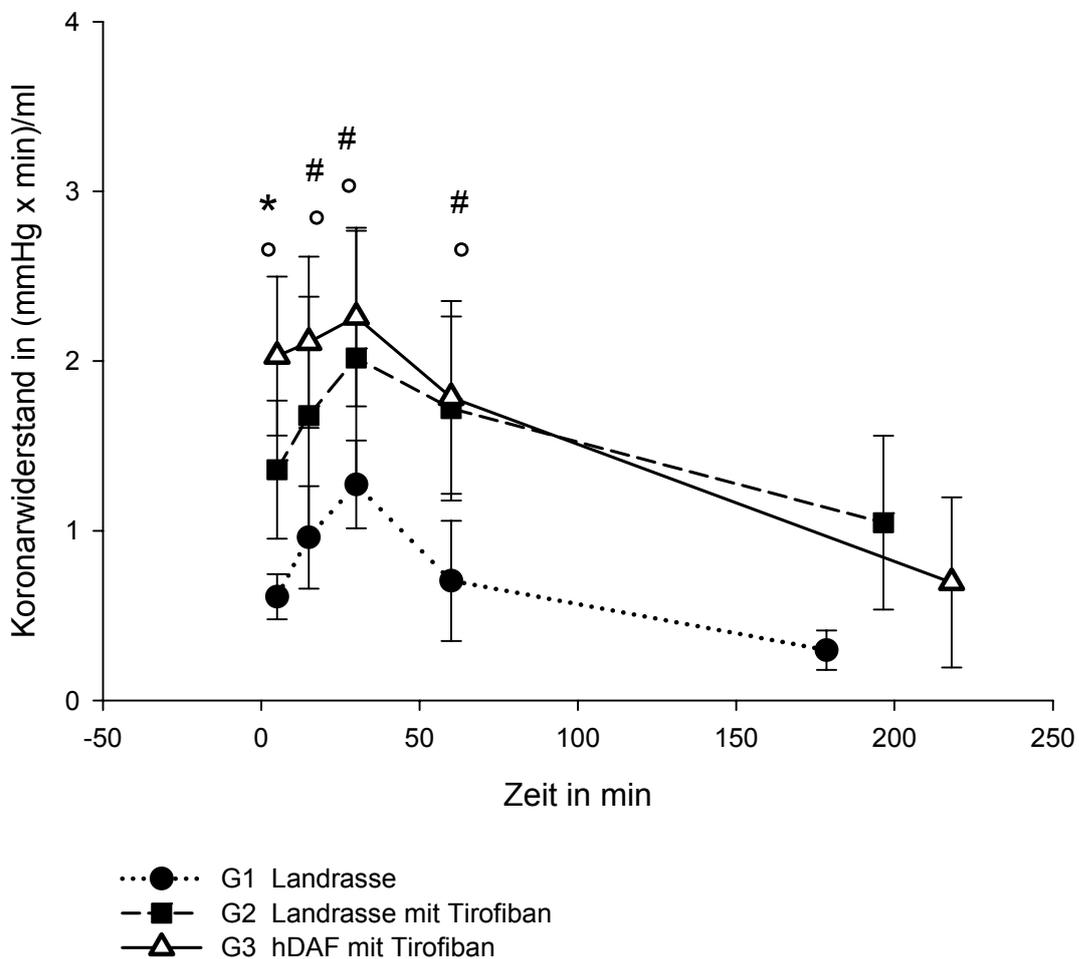


Abb. 9: Koronarwiderstand während der Perfusion

= P < 0,05 für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

° = P < 0,05 für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

* = P < 0,05 für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

1.6. Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch stieg in der Gruppe G1 im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen nach Reperfusion sehr steil an und fiel 30 min später besonders steil ab. Der Kurvenverlauf in den Gruppen G2 und G3 war wesentlich flacher und streckenweise parallel. Die Spitze der Kurve war in der Gruppe G3 bereits nach 15 min erreicht, während der höchste Punkt im Kurvenverlauf in der Gruppe G2 ebenso wie in G1 30 min nach Perfusionsbeginn erreicht wurde.

Der statistische Gesamtvergleich der Gruppen miteinander ergab keine signifikanten Unterschiede.

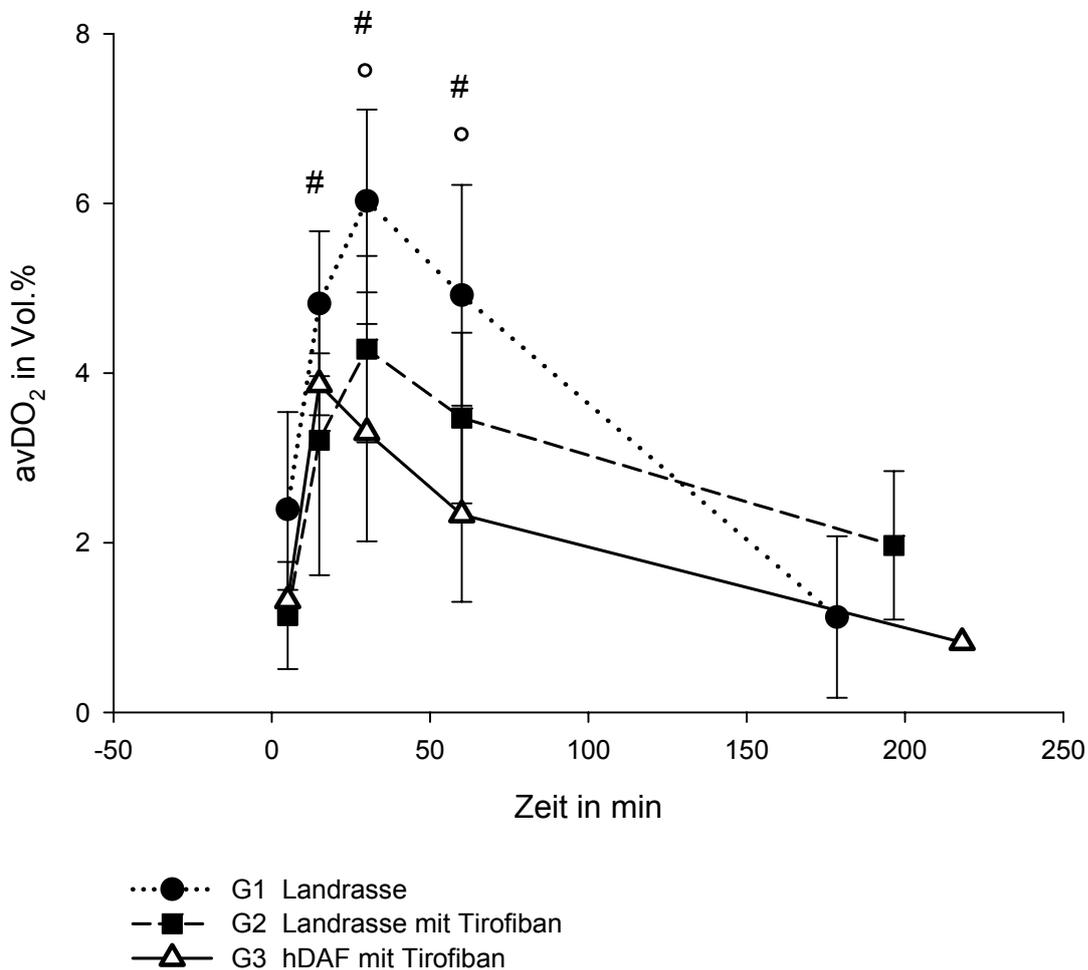


Abb. 10: Arteriovenöse Sauerstoffdifferenz im Perfusat während der Perfusion

= P < 0,05 für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

° = P < 0,05 für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

1.7. Überlebenszeit

Im Mittel erreichten die Herzen der Landrasse-Gruppe eine Überlebenszeit von 179 ± 78 min. Die Überlebenszeiten in den beiden anderen Gruppen lagen mit 197 ± 116 min für die Landrasse-Gruppe mit Tirofiban und 218 ± 155 min für die hDAF-transgene Gruppe mit Tirofiban sehr nah beieinander.

Beim Gesamtvergleich aller drei Gruppen miteinander ergab die statistische Auswertung anhand der Kaplan-Meier Überlebens-Analyse (Log-Rank-Statistik) keine signifikanten Unterschiede ($P = 0,809$).

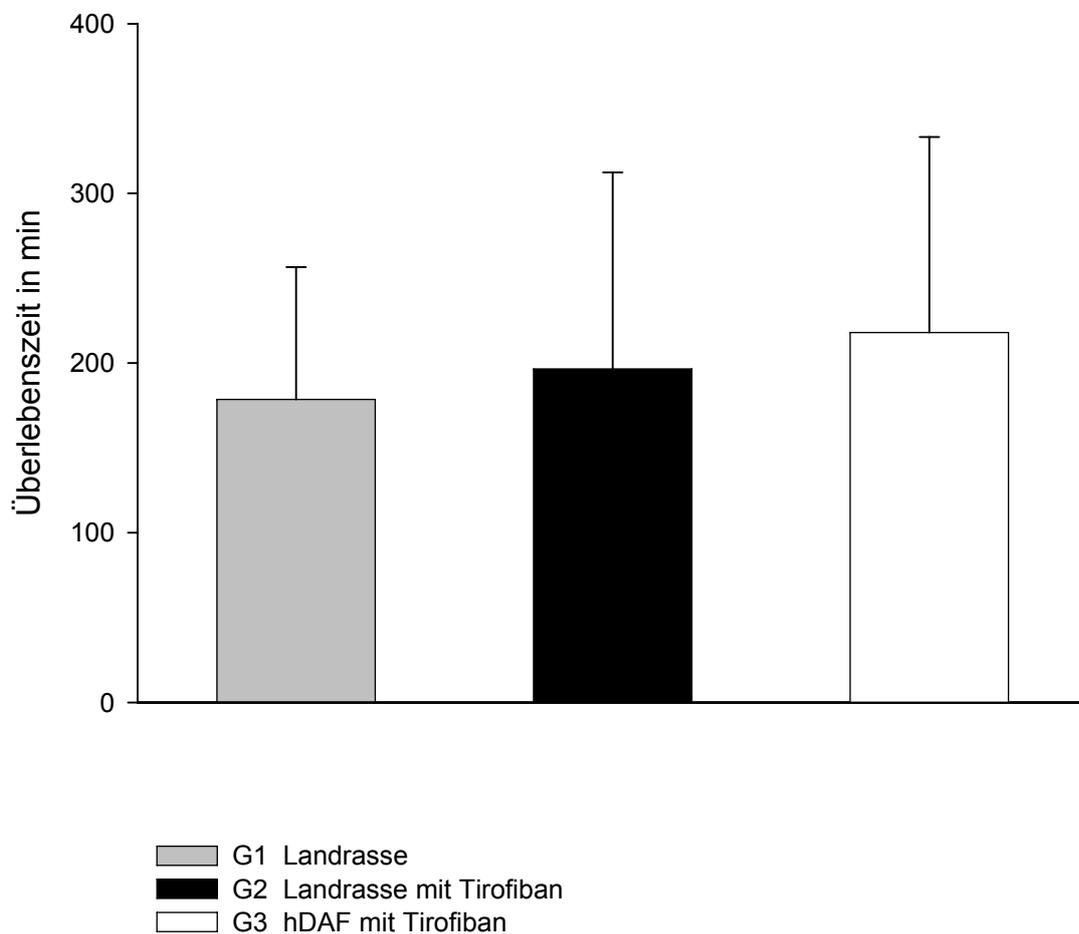


Abb. 11: Überlebenszeiten der Schweineherzen

1.8. Gewichtszunahme

Im Zuge der hyperakuten Abstoßung kam es zu Ödemen und interstitiellen Hämorrhagien, welche eine Zunahme des Herzgewichtes bedingten. Der größte prozentuale Unterschied zwischen dem Organgewicht vor und nach der Perfusion bestand mit $18,3 \pm 5,5$ % in der Gruppe G1. In der Gruppe G2 betrug die Differenz $14,2 \pm 3,2$ % und in der Gruppe G3 $7,4 \pm 3,2$ %.

Ein signifikanter Unterschied ergab sich beim Vergleich der Landrassegruppe ohne Tirofiban mit der hDAF-transgenen Gruppe mit Tirofiban und Landrassegruppe mit Tirofiban mit der hDAF-transgenen Gruppe mit Tirofiban ($P < 0,05$ im One Way ANOVA-Verfahren).

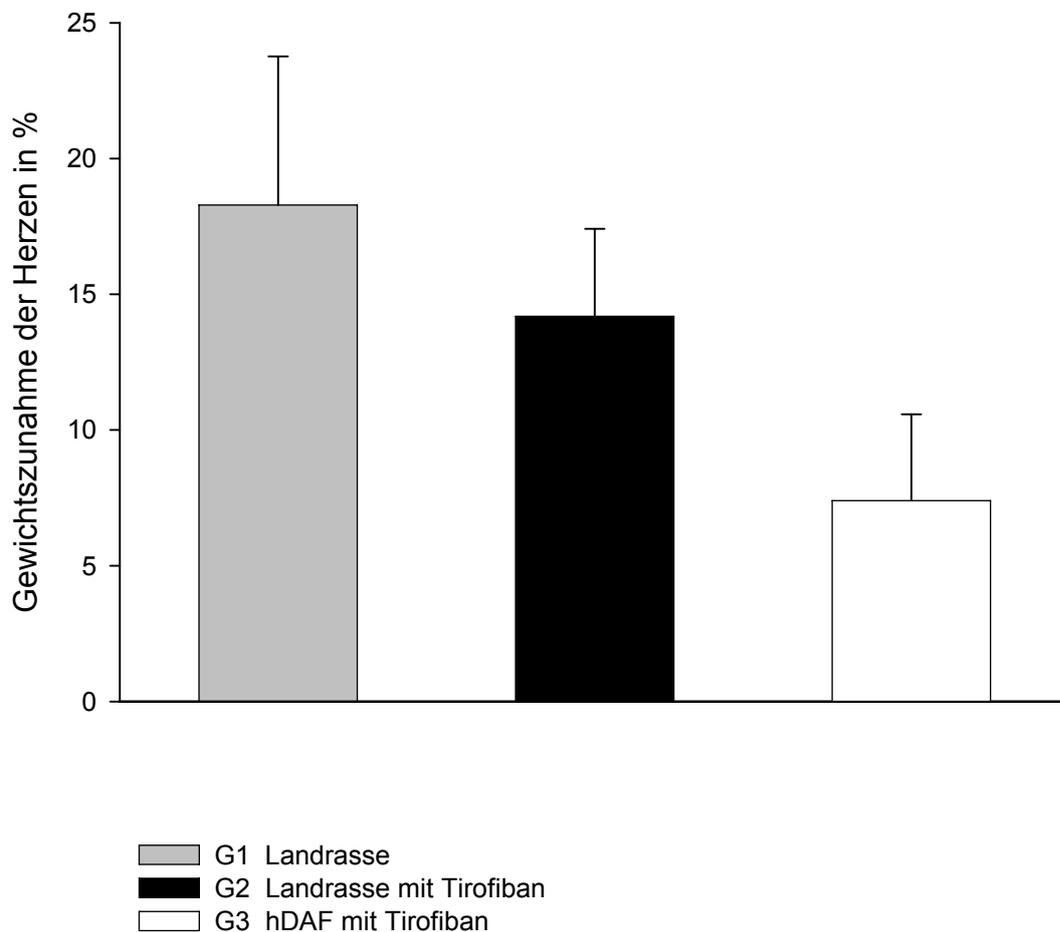


Abb. 12: Prozentuale Gewichtszunahme der Schweineherzen während der Perfusion

2. Gerinnungsparameter

2.1. Antithrombin III

Die Plasmakonzentration von Antithrombin III wurde in Prozenten des Ausgangswertes angegeben. In allen drei Gruppen kam es zu einer Abnahme der Plasmakonzentration, wobei der stärkste Konzentrationsabfall sowohl zu Beginn der Perfusion als auch im gesamten Verlauf in der Gruppe G3 zu finden war. Die Werte der Gruppen G1 und G2 lagen innerhalb der ersten Stunde nach dem Perfusionsbeginn nah beieinander. Am Versuchsende erreichten die Werte der Gruppe G1 ein Niveau unterhalb der Gruppe G3.

Im Gesamtvergleich der Gruppen miteinander bestand für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban und für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban ein statistisch signifikanter Unterschied.

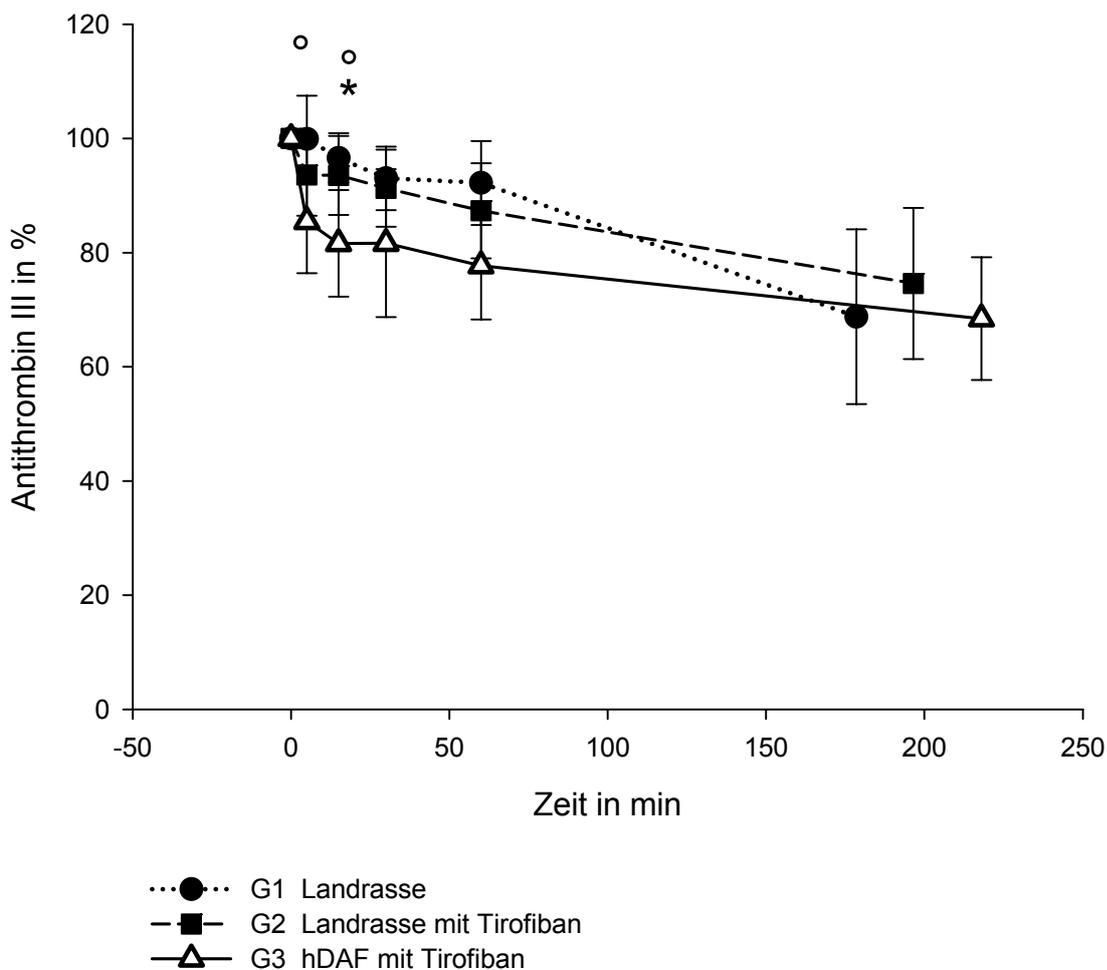


Abb. 13: Prozentuale Plasmakonzentration von Antithrombin III

° = $P < 0,05$ für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

* = $P < 0,05$ für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

2.2. Protein C

Die Plasmakonzentration des gerinnungsinhibierenden Protein C, dargestellt in Prozenten des Ausgangswertes, nahm in allen drei Gruppen in vergleichbarem Maße ab. Ein geringer Unterschied bestand zwischen der Gruppe G1 mit dem geringsten und der Gruppe G3 mit dem stärksten Konzentrationsabfall. Beim Gesamtvergleich aller drei Gruppen miteinander erwies sich dieser Unterschied als statistisch signifikant.

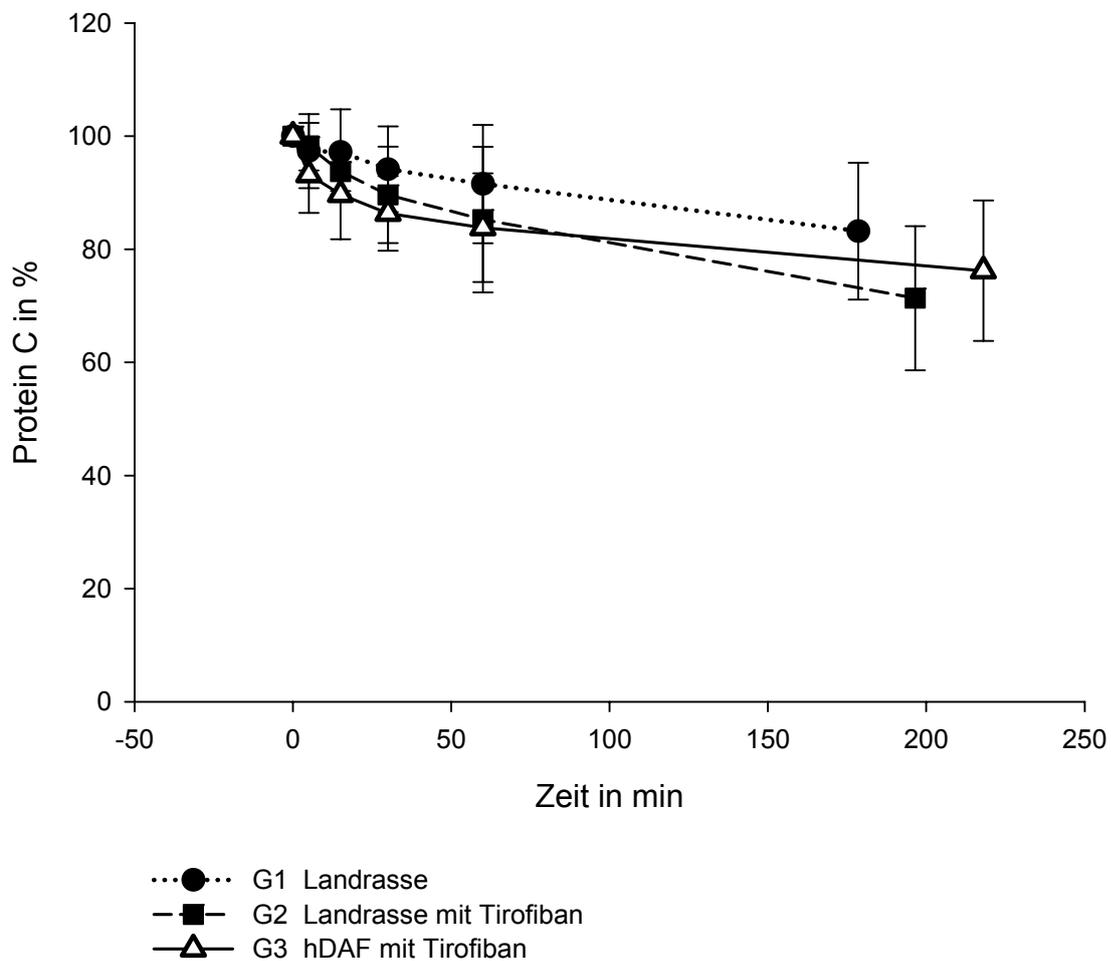


Abb. 14: Prozentuale Plasmakonzentration von Protein C

2.3. Fibrinogen

Die Veränderungen der Fibrinogenplasmakonzentration sind ebenfalls in Prozenten des Ausgangswertes dargestellt. Die Konzentrationsabnahme verlief in allen drei Gruppen so ähnlich, dass zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand.

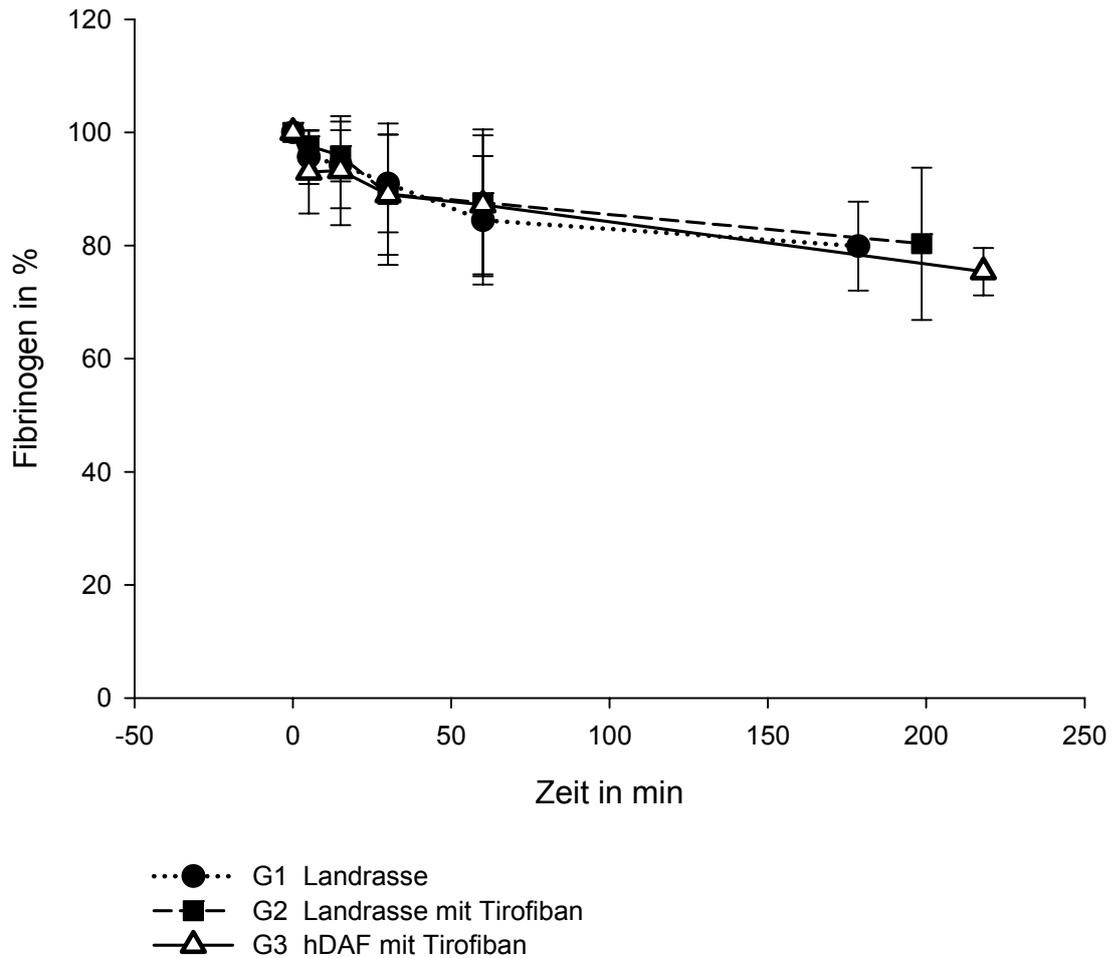


Abb. 15: Prozentuale Plasmakonzentration von Fibrinogen

3. Serumchemie

3.1. Kreatinkinase und CK-MB

Die Serumkonzentration der Kreatinkinase hatte in der Gruppe G1 den steilsten Anstieg und in der Gruppe G3 den flachsten Verlauf.

Im Gesamtvergleich der drei Gruppen miteinander bestand ein statistisch signifikanter Unterschied für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban, für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban sowie für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

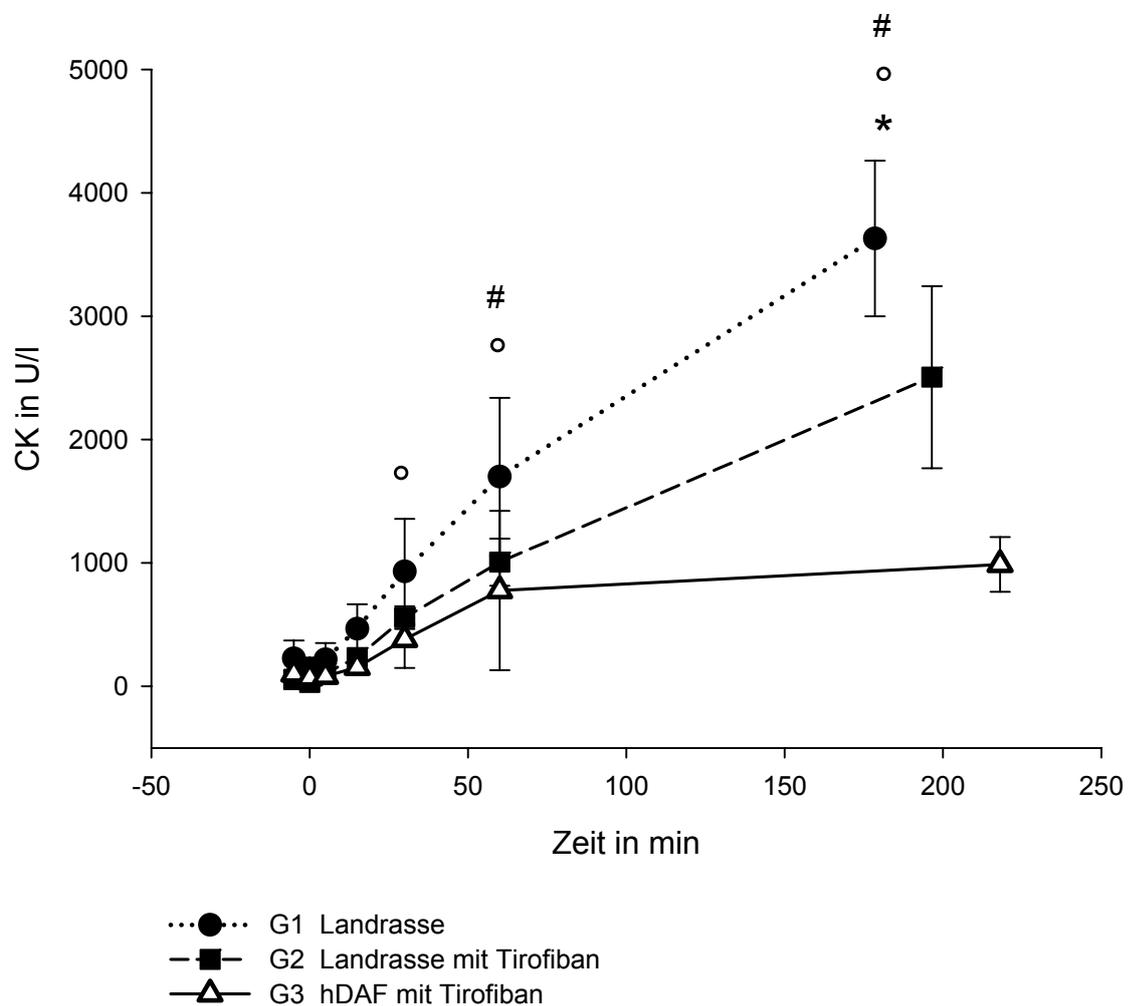


Abb. 16: Serumkonzentration der Kreatinkinase

= P < 0,05 für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

° = P < 0,05 für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

* = P < 0,05 für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

Der Anstieg der Serumkonzentration des Isoenzym CK-MB war ebenfalls in der Gruppe G1 am steilsten und in der Gruppe G3 am flachsten, wobei sich deutliche Unterschiede im Verlauf erst nach der ersten halben Stunde der Organperfusion zeigten.

Im Gesamtvergleich der drei Gruppen miteinander bestand für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban und für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban ein statistisch signifikanter Unterschied.

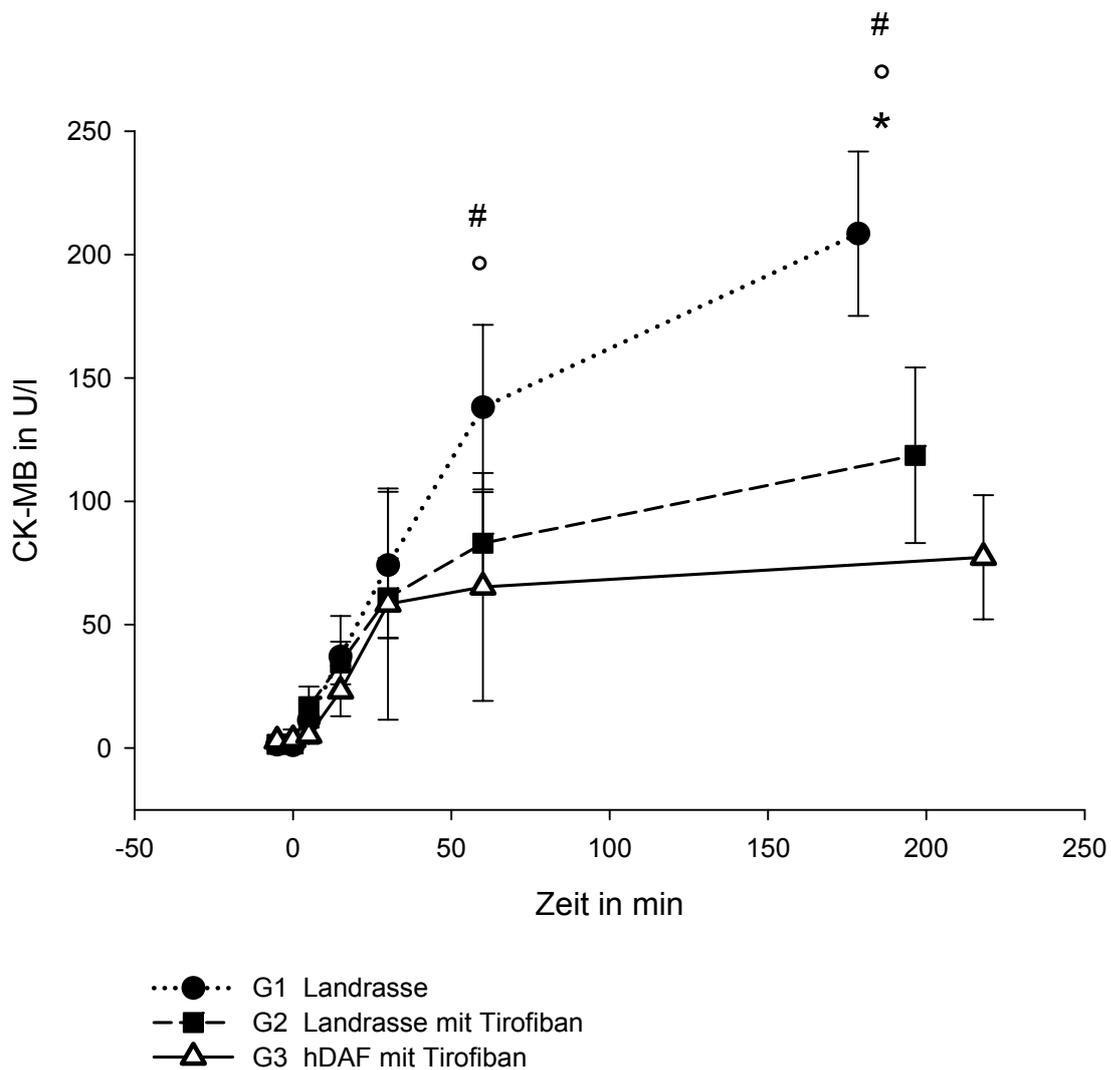


Abb. 17: Serumkonzentration des Kreatinkinase-Isoenzym CK-MB

= P < 0,05 für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

° = P < 0,05 für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

* = P < 0,05 für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

3.2. Aspartataminotransferase

In der Gruppe G1 kam es über den gesamten Messzeitraum zu einer deutlich steileren Serumkonzentrationszunahme als in den beiden anderen Gruppen. Der Serumkonzentrationsanstieg der Aspartataminotransferase (ASAT) als Zeichen der zunehmenden Organschädigung verlief in den Gruppen G2 und G3 anfangs nahezu gleich, steigerte sich jedoch zum Versuchsende in der Gruppe G2.

Im statistischen Gesamtvergleich der Gruppen bestand für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban, für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban sowie für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban ein signifikanter Unterschied.

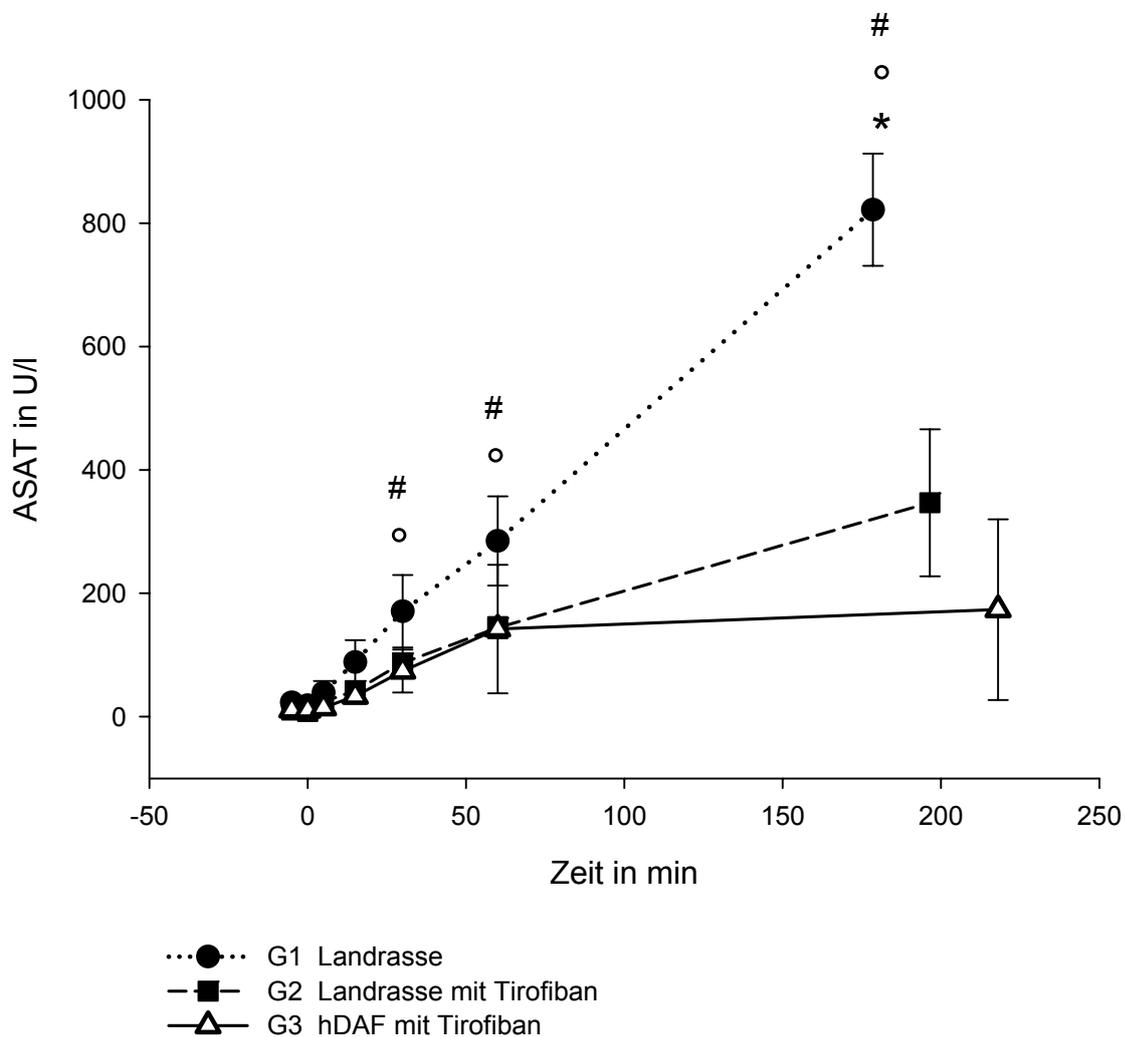


Abb. 18: Serumkonzentration der Aspartataminotransferase

= $P < 0,05$ für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

° = $P < 0,05$ für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

* = $P < 0,05$ für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

3.3. Lactatdehydrogenase

Die LDH-Serumkonzentration stieg ebenso wie bei den anderen bereits beschriebenen Markerenzymen für einen Myokardschaden besonders steil in der Gruppe G1 an. In der ersten halben Stunde nach Reperfusion verliefen die Kurven der drei Gruppen nah zusammen. Eine Stunde nach Perfusionsbeginn wies die Gruppe G3 den geringsten Konzentrationsanstieg auf.

Im Gesamtvergleich der Gruppen miteinander bestand für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban, für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban sowie für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban ein statistisch signifikanter Unterschied.

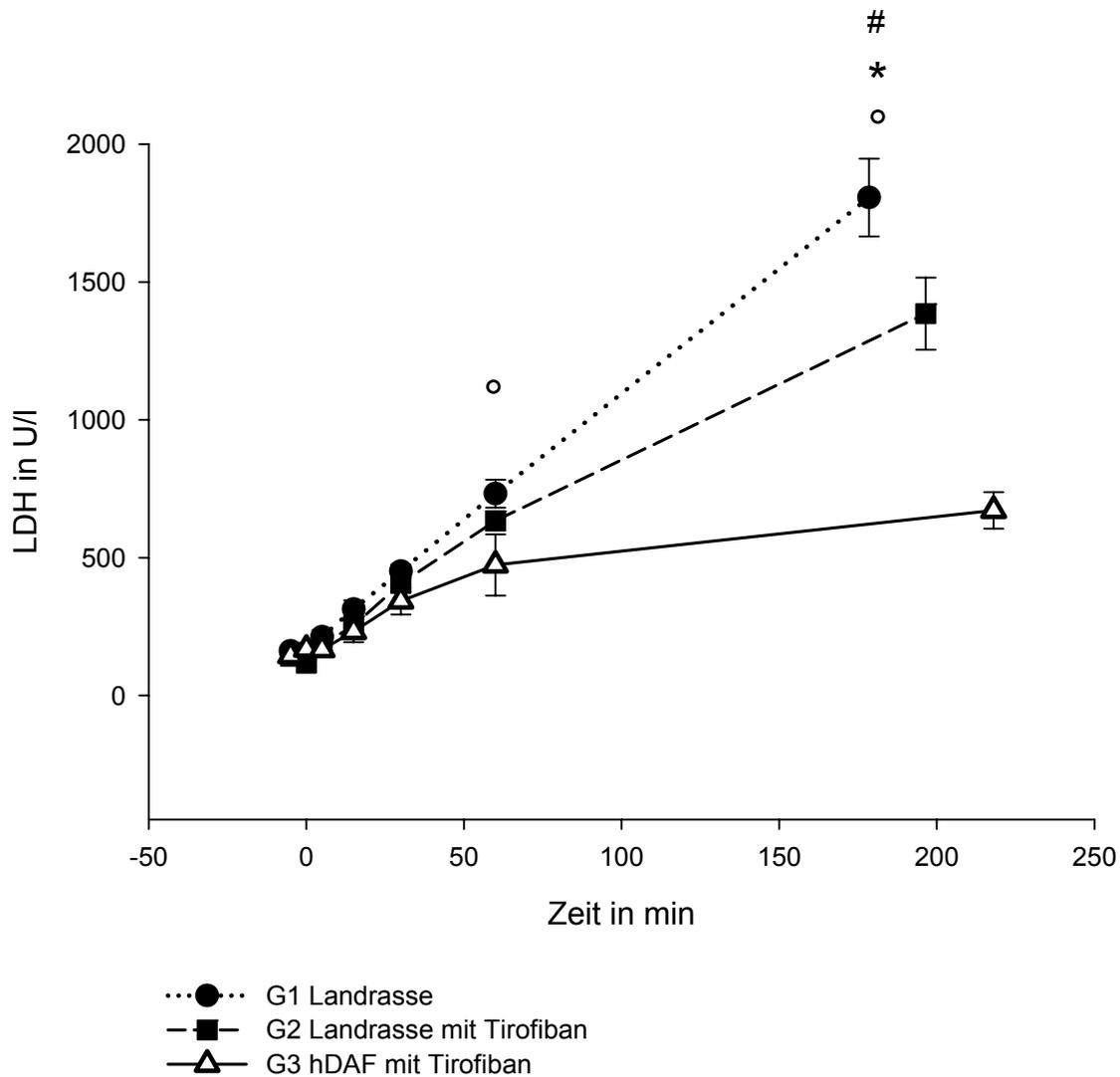


Abb. 19: Serumkonzentration der Lactatdehydrogenase

= $P < 0,05$ für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

° = $P < 0,05$ für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

* = $P < 0,05$ für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

4. Hämatologie

4.1. Thrombozyten

Die Thrombozytenkonzentration, dargestellt in Prozenten des Ausgangswertes, wies in der Gruppe G1 den steilsten Kurvenabfall auf. Bei den beiden anderen Gruppen fielen nach einem ähnlichen Kurvenverlauf die Werte der Gruppe G2 am Versuchsende steiler ab als die der Gruppe G3.

Im statistischen Gesamtvergleich der Gruppen miteinander bestand für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban und für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban ein signifikanter Unterschied.

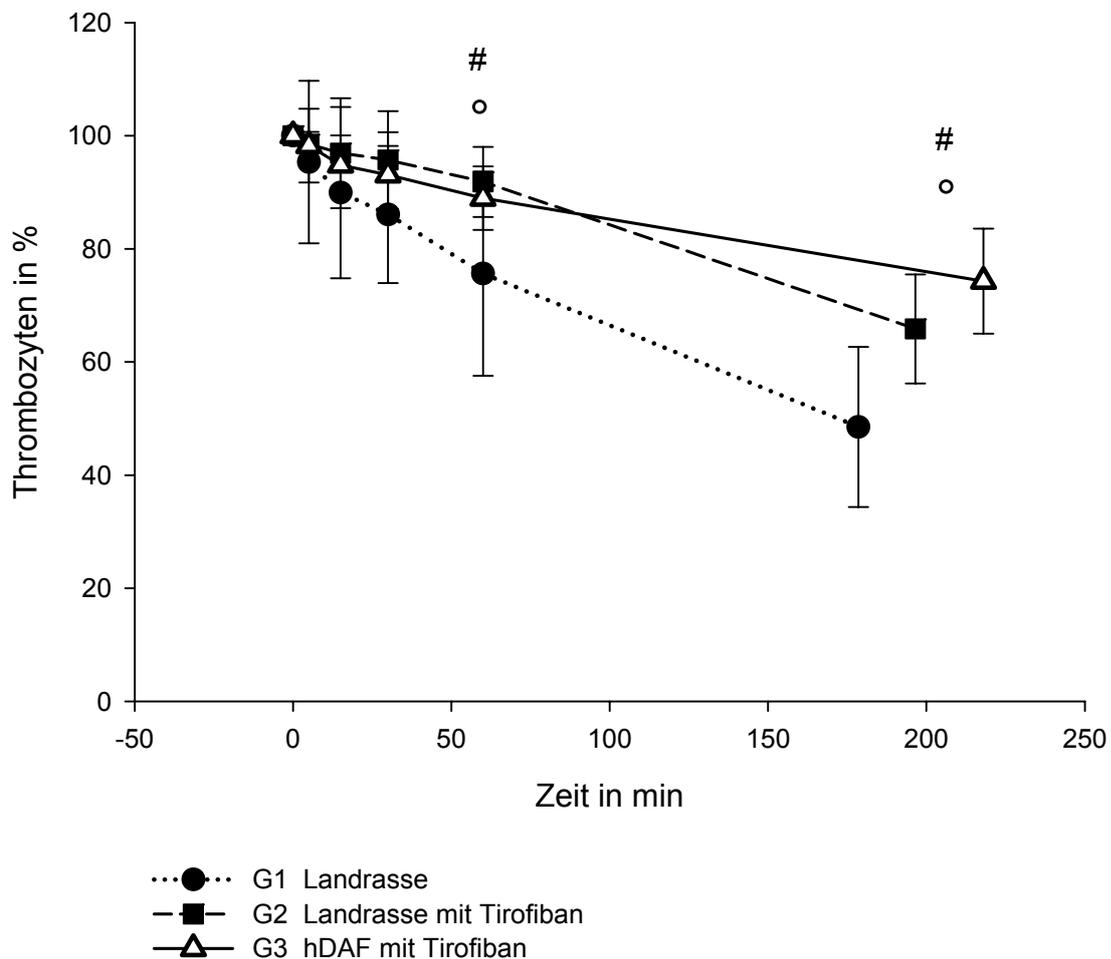


Abb. 20: Prozentuale Thrombozytenkonzentration im Vollblut

= $P < 0,05$ für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

° = $P < 0,05$ für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

4.2. Leukozyten

Der Konzentrationsabfall der Leukozyten im Perfusat ist in Prozenten des Ausgangswertes dargestellt. Den anfänglich steilsten Kurvenverlauf wies die Gruppe G1 auf. Der am Versuchsende stärkste Konzentrationsabfall war in der Gruppe G3 zu finden.

Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

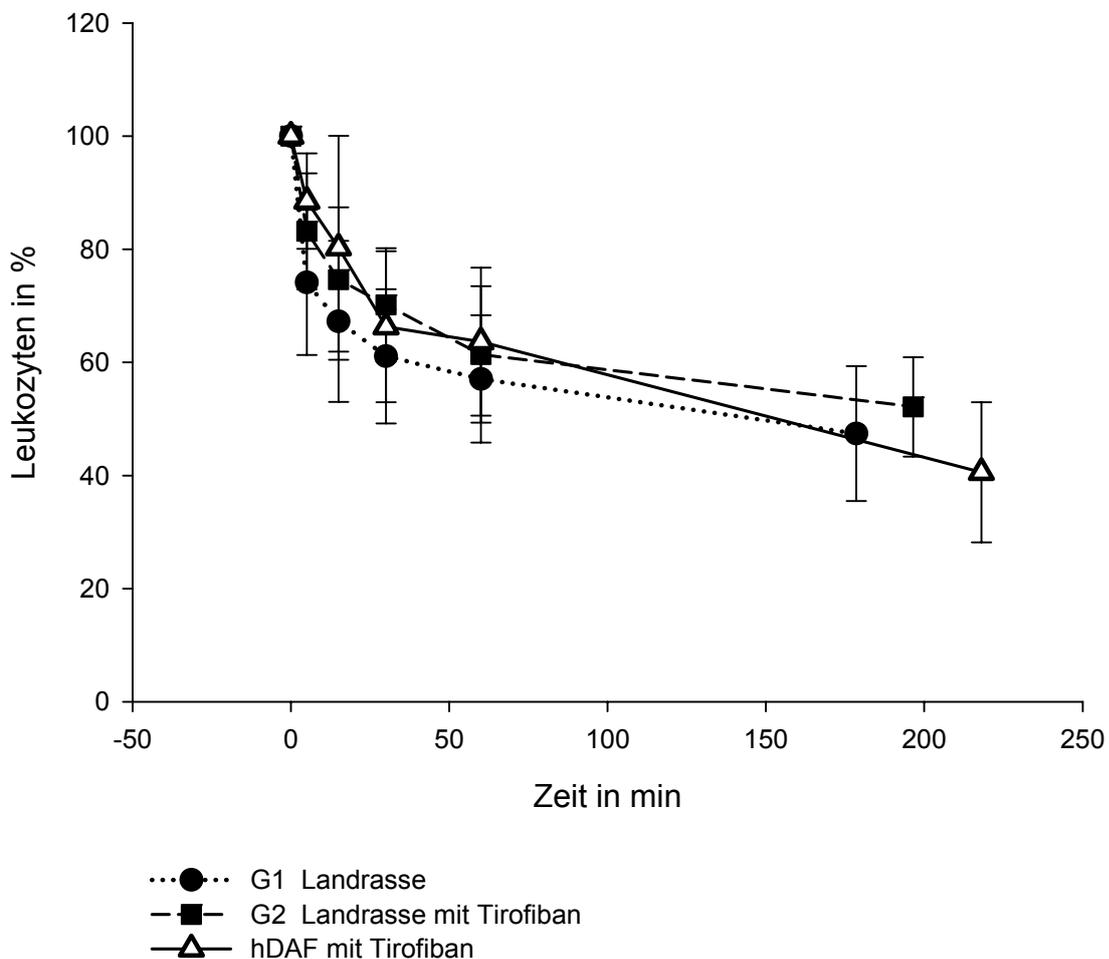


Abb. 21: Prozentuale Leukozytenkonzentration im Vollblut

Die lichtmikroskopische Auswertung der Ausstrichpräparate ergab im Hinblick auf die Differentialblutbestimmung keine aussagekräftigen Ergebnisse.

5. Immunologische Parameter

5.1. Komplement

Bei dem Verlauf der C3-Serumkonzentration, dargestellt in Prozenten des Ausgangswertes, zeigte sich die hDAF-Transgenität der Gruppe G3 in einem flacheren Konzentrationsabfall verglichen mit den beiden nicht-transgenen Gruppen. Den insgesamt steilsten Kurvenverlauf wies die Gruppe G2 auf.

Im Gesamtvergleich der Gruppen bestand für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban, für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban und für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban ein statistisch signifikanter Unterschied.

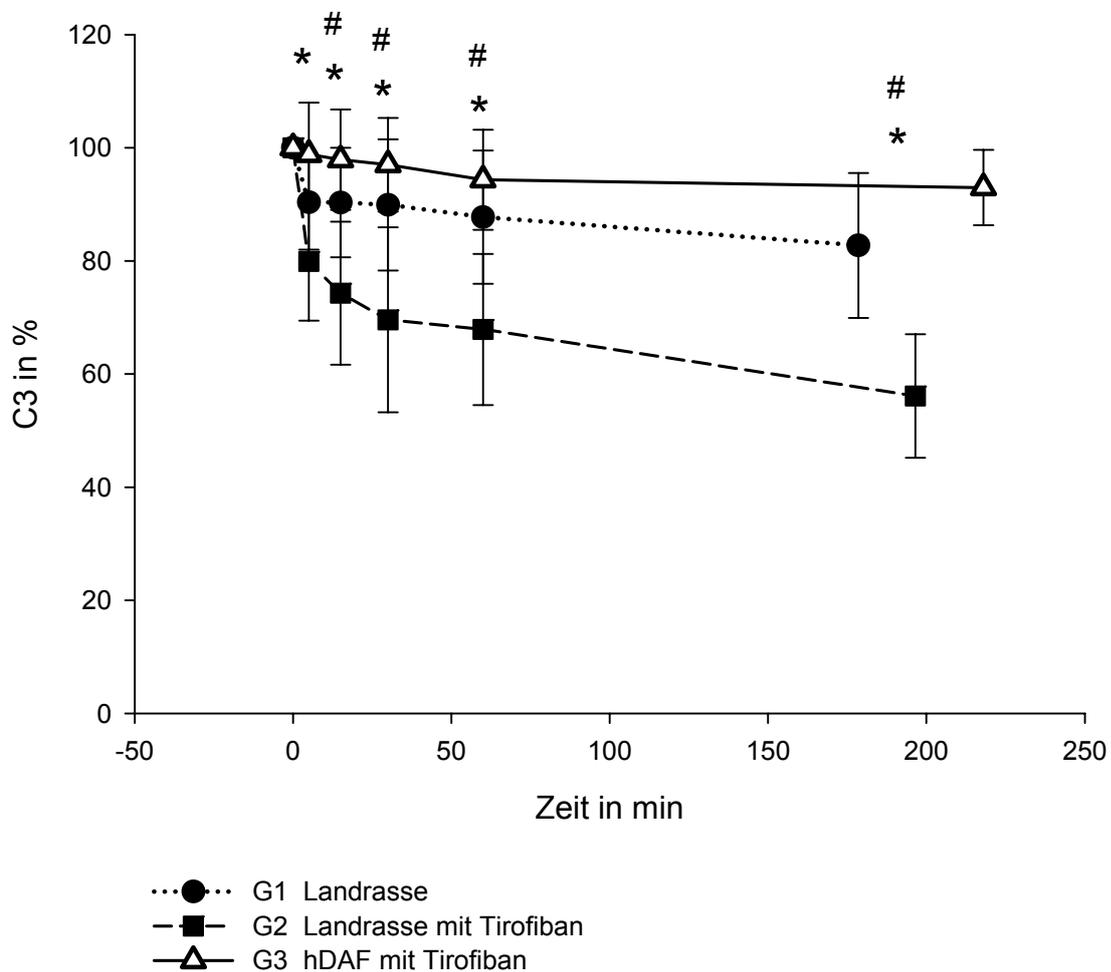


Abb. 22: Prozentuale Serumkonzentration von C3

= P < 0,05 für Landrasse vs. Landrasse mit Tirofiban

* = P < 0,05 für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

Die Serumkonzentration von C4 ist ebenfalls in Prozenten des Ausgangswertes angegeben. Der Kurvenabfall in der Gruppe G3 hob sich von der Konzentrationsabnahme in den beiden nicht-transgenen Gruppen G1 und G2 ab. Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

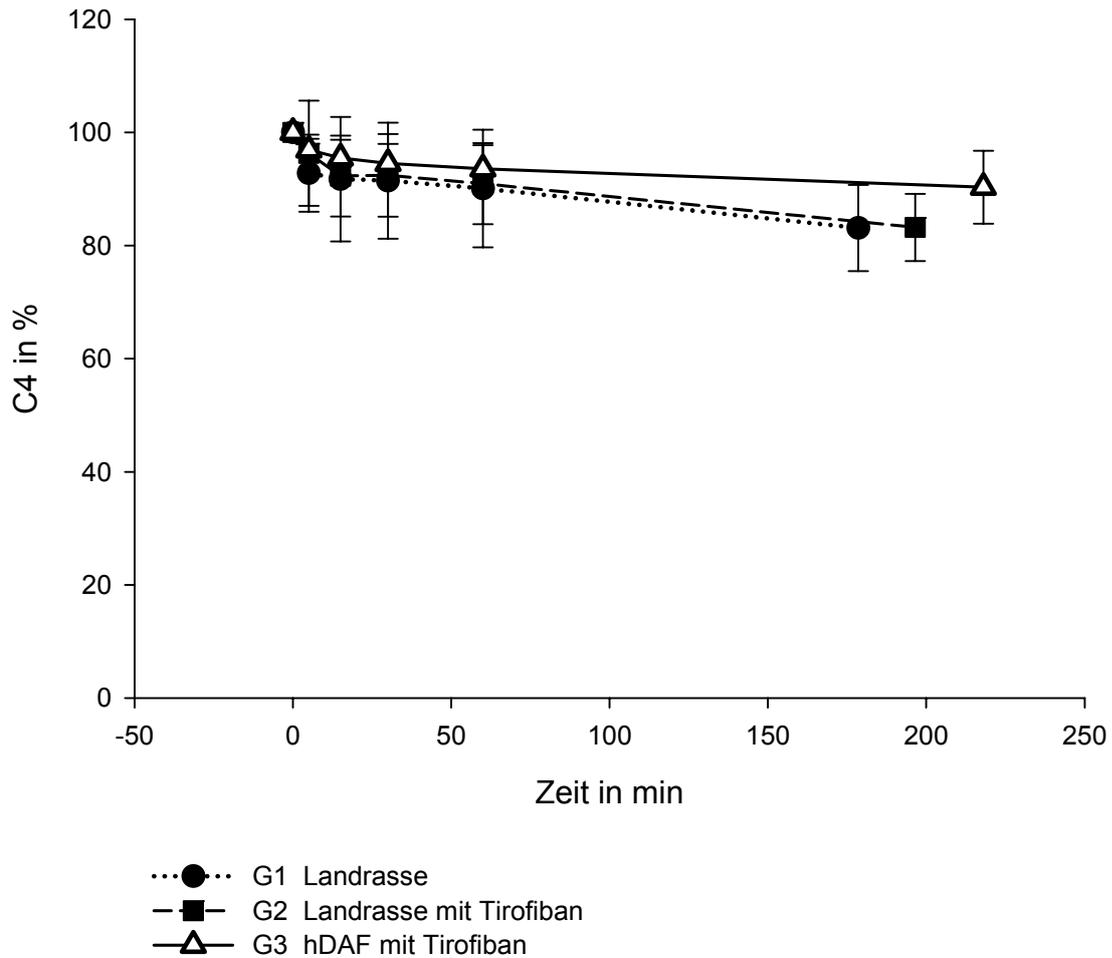


Abb. 23: Prozentuale Serumkonzentration von C4

5.2. Anti-Pig-Antikörper

Die Reduktion der Antikörperkonzentration im Serum vor dem eigentlichen Beginn der Organperfusion wurde durch die Dilution des Spenderblutes mitbedingt.

Über die gesamte Dauer der Perfusion kam es zu einer annähernd gleich stark ausgeprägten Abnahme der Anti-Pig-Antikörper-Serumkonzentrationen in allen drei Gruppen.

Ein statistischer Gruppenvergleich ist nicht sinnvoll, da abhängig von den Serumkonzentrationen der Spender unterschiedliche Ausgangskonzentrationen an Anti-Pig-Antikörpern vorlagen.

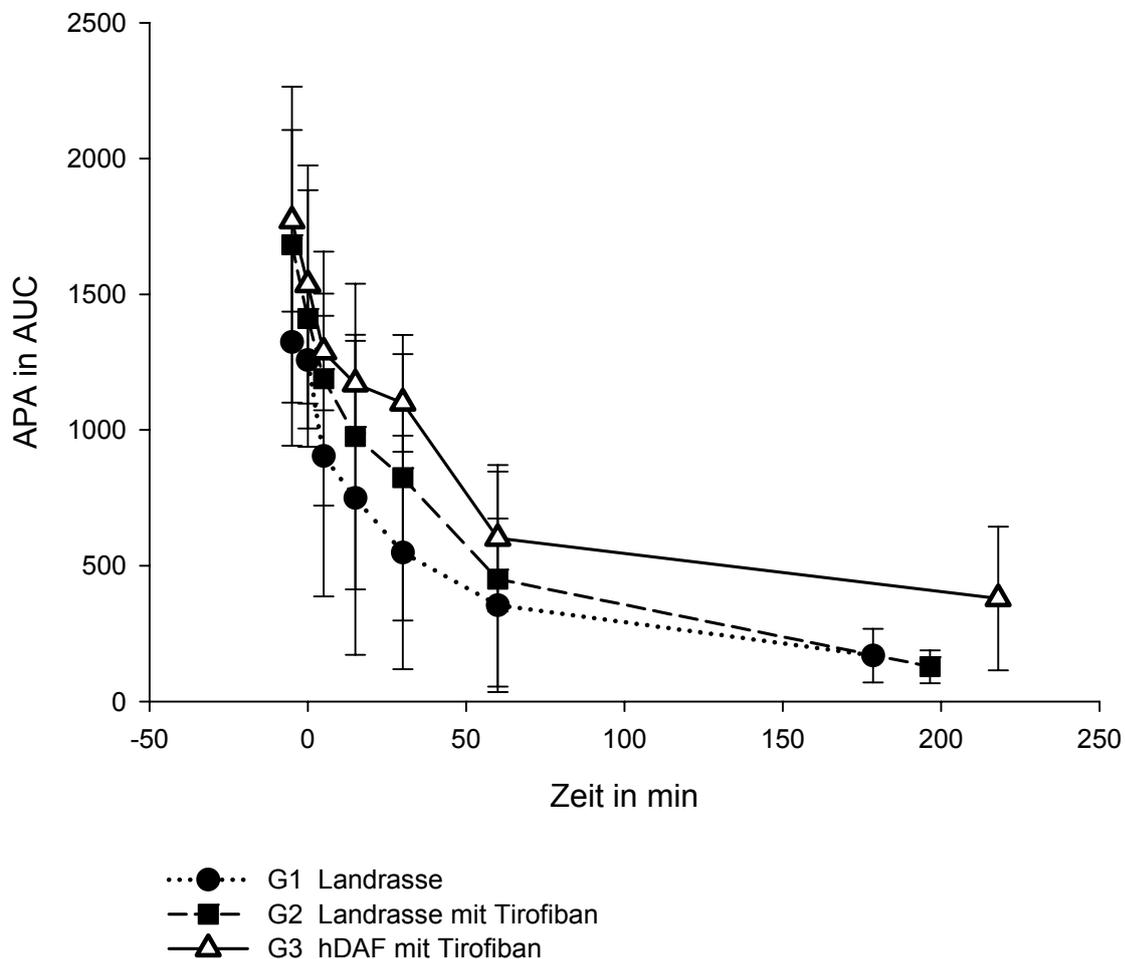


Abb. 24: Serumkonzentration der Anti-Pig-Antikörper

5.3. Anti-Gal α 1,3Gal-Antikörper

Die Reduktion der Antikörperkonzentration im Serum vor dem eigentlichen Beginn der Organperfusion wurde durch die Dilution des Spenderblutes mitbedingt.

Über die gesamte Dauer der Perfusion kam es zu einer anhaltenden Abnahme der Anti-Gal α 1,3Gal-Antikörper-Serumkonzentrationen in allen drei Gruppen.

Ein statistischer Gruppenvergleich ist nicht sinnvoll, da abhängig von den Serumkonzentrationen der Spender unterschiedliche Ausgangskonzentrationen an Anti-Gal α 1,3Gal-IgM und Anti-Gal α 1,3Gal-IgG vorlagen.

Anti-Gal α 1,3Gal-Immunglobulin M

Der Konzentrationsabfall der Anti-Gal α 1,3Gal-IgM war initial in der Gruppe G3 deutlicher ausgeprägt als in den Gruppen G1 und G2. Gegen Ende der Perfusion waren die Serumkonzentrationen aller drei Gruppen jedoch annähernd gleich hoch.

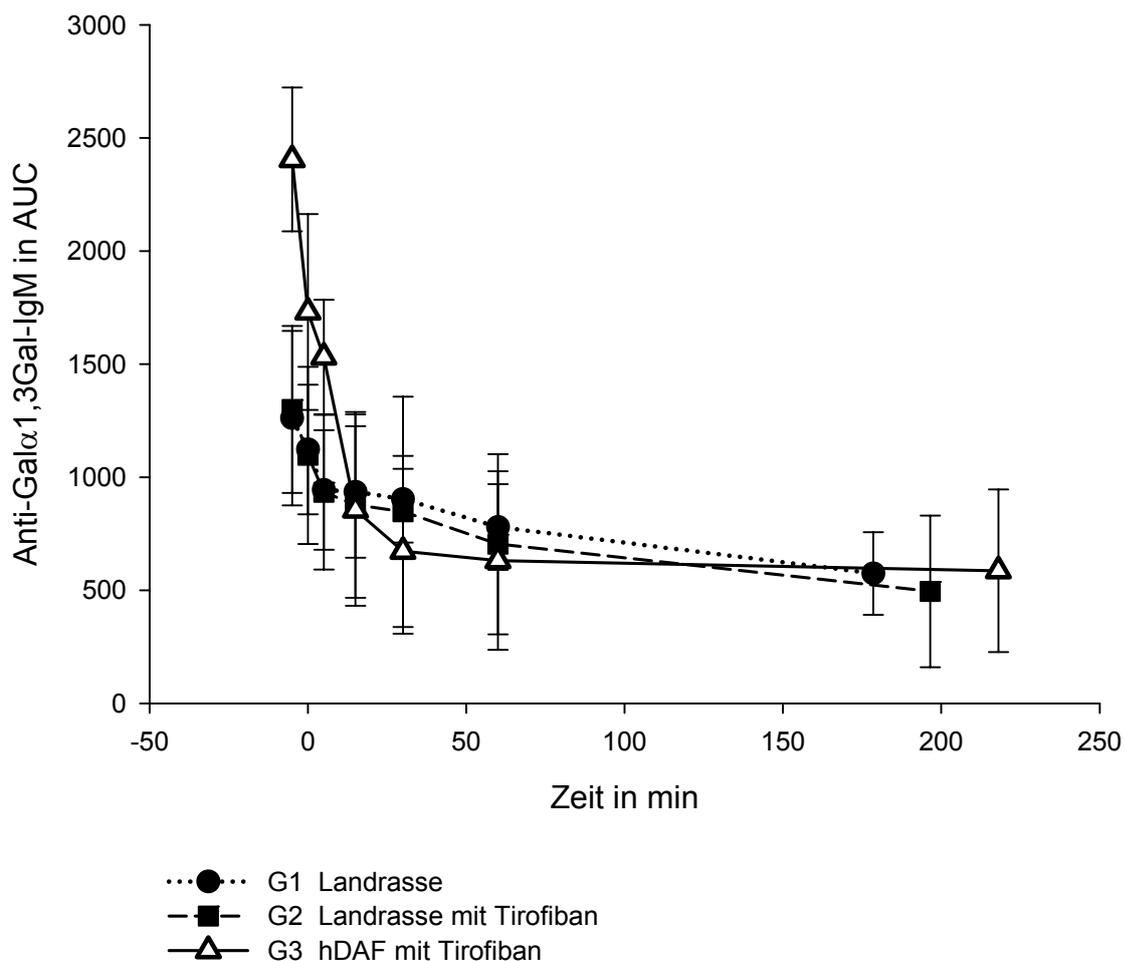


Abb. 25: Serumkonzentration der Anti-Gal α 1,3Gal-IgM

Anti-Gal α 1,3Gal-Immunglobulin G

Der Konzentrationsabfall der Anti-Gal α 1,3Gal-IgG war initial ebenfalls in der Gruppe G3 deutlicher ausgeprägt als in den Gruppen G1 und G2.

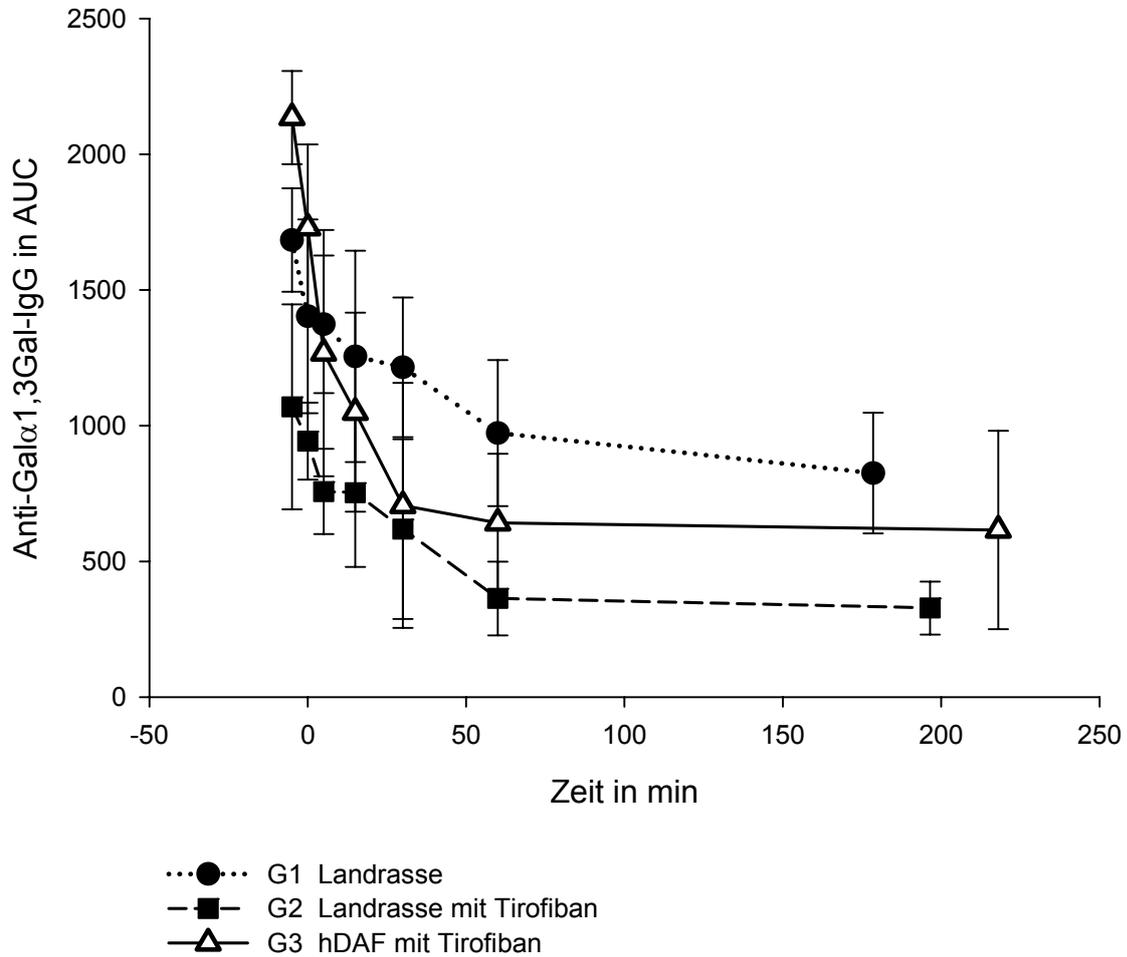


Abb. 26: Serumkonzentration der Anti-Gal α 1,3Gal-IgG

5.4. Leukozytenoberflächenantigene

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von Leukozytenantigenen mittels FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorter) ergab einen anfangs steilen Anstieg der CD11b positiven Zellen im Perfusat. Im Verlauf der Perfusion kam es jedoch in allen drei Gruppen zu einem Abnahme dieser Zellen. Beim statistischen Gesamtvergleich aller drei Gruppen bestand für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban und für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban ein signifikanter Unterschied.

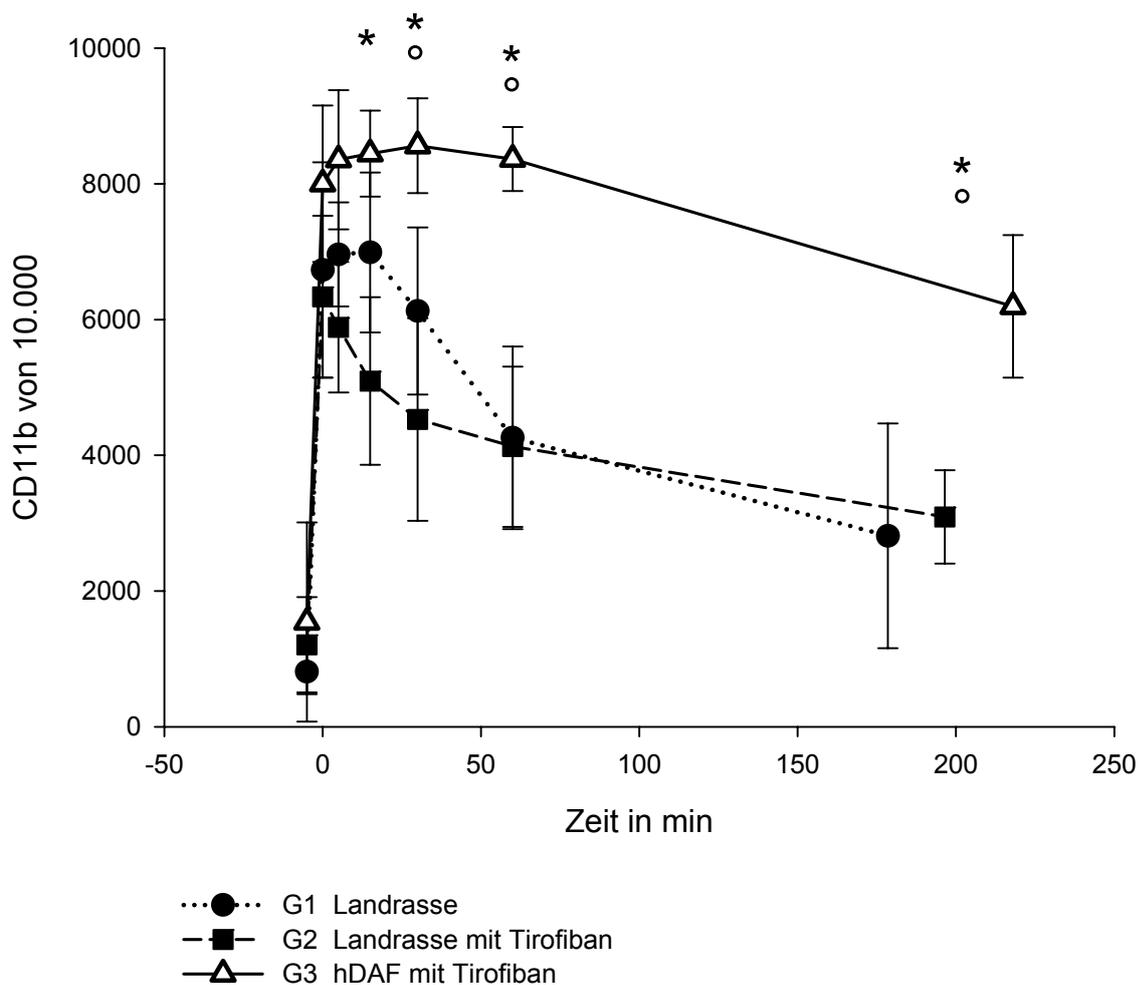


Abb. 27: CD11b positive Zellen

° = P < 0,05 für Landrasse vs. hDAF mit Tirofiban

* = P < 0,05 für Landrasse mit Tirofiban vs. hDAF mit Tirofiban

Die Messungen von CD3, CD4, CD8, CD62L und HLA-DR positiven Zellen im Perfusat ermöglichten keine aussagekräftige Beurteilung.

6. Histo- und Immunhistopathologie

6.1. Makroskopischer Aspekt

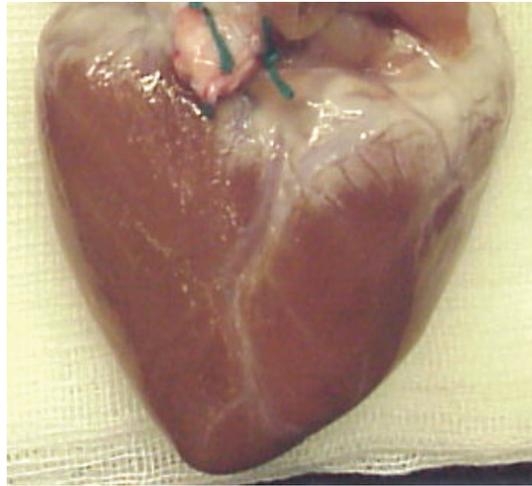


Abb. 28: Makroskopische Aufnahme eines explantiertes Schweineherzens vor ex vivo-Xenoperfusion

Äußerlich zeigten die Organen am Ende der Perfusion als Zeichen der hyperakuten Abstoßungsreaktion eine livide Verfärbung sowie Hämorrhagien vor allem entlang der Koronarien.

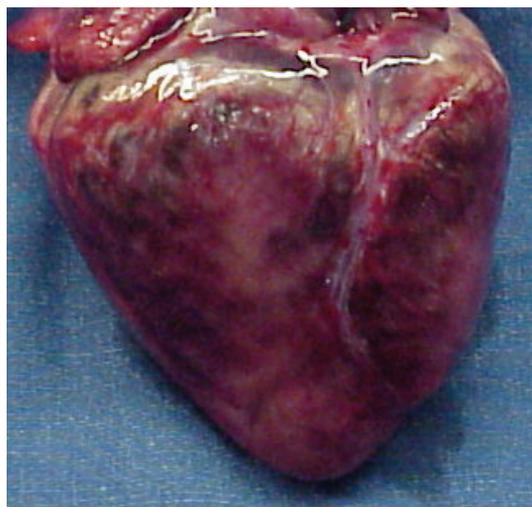


Abb. 29: Makroskopische Aufnahme eines Schweineherzens nach Xenoperfusion mit humanem Blut

6.2. Histologische Bewertung

6.2.1. Landrassegruppe ohne Tirofiban

Bei der histopathologischen Untersuchung der Herzen fanden sich in der Gruppe G1 im Vergleich zu den beiden Gruppen mit Tirofiban (Aggrastat®) mehr myokardiale Ödeme, Hämorrhagien und Nekrosen, sowie auffallend mehr Thromben in den Kapillaren des Myokards. Fibrinablagerungen konnten in den intravasalen Thromben, vor allem aber in den interstitiellen Hämorrhagiearealen festgestellt werden.

Ablagerungen des MAC (C5b9) wurden in geringem Ausmaße mit Schwerpunkt in den hämorrhagischen Bereichen gefunden.

Darüber hinaus konnte eine Schädigung des Endothels und vereinzelt die Adhäsion von Leukozyten (MPO-positiven Granulozyten) beobachtet werden.

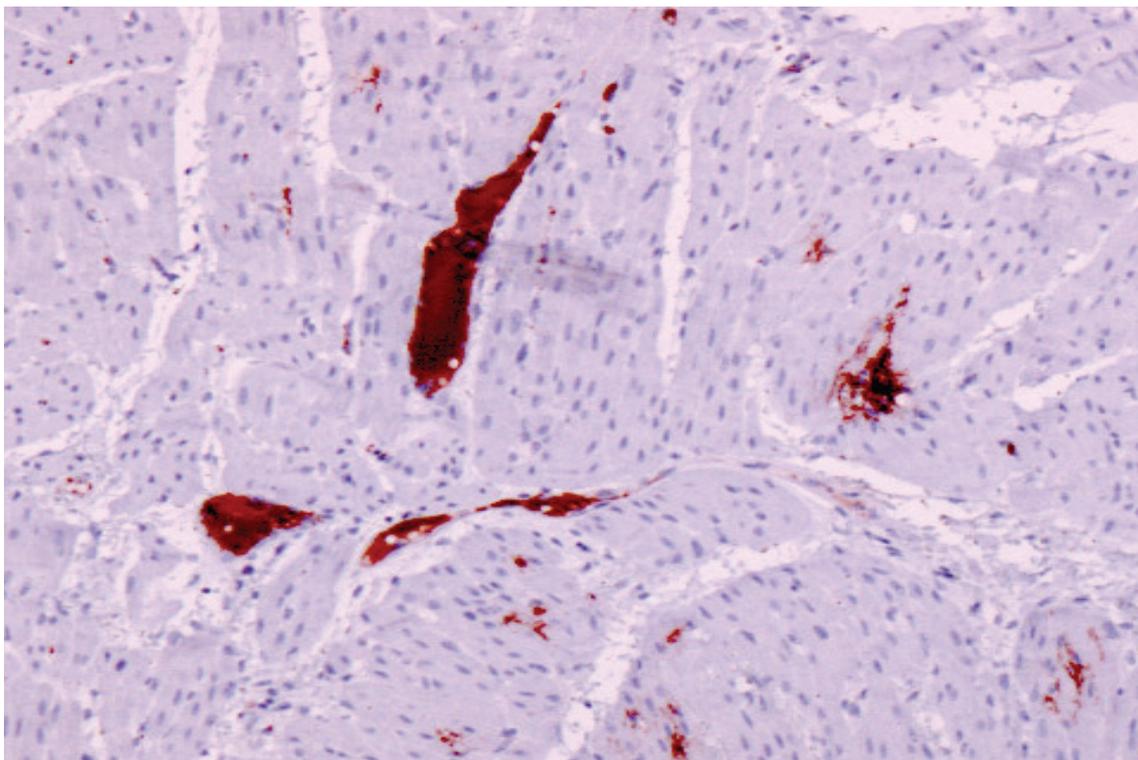


Abb. 30: Landrasse ohne Tirofiban. Fibrin [10x]

6.2.2. Landrassegruppe mit Tirofiban

In der Gruppe G2 kam es in geringerem Umfang zu myokardialen Ödemen, Hämorrhagien und Nekrosen als bei der Gruppe G1.

Die Fibrinablagerungen waren weniger zahlreich als in der Gruppe G1 und vor allem in hämorrhagischen oder nekrotischen Arealen zu finden.

Der MAC (C5b9) konnte in einem mit der Gruppe G1 vergleichbaren Ausmaß gefunden werden.

Vereinzelte Endothelschädigungen konnten nachgewiesen werden, jedoch nahezu keine Adhäsion von Leukozyten (MPO-positiven Granulozyten).

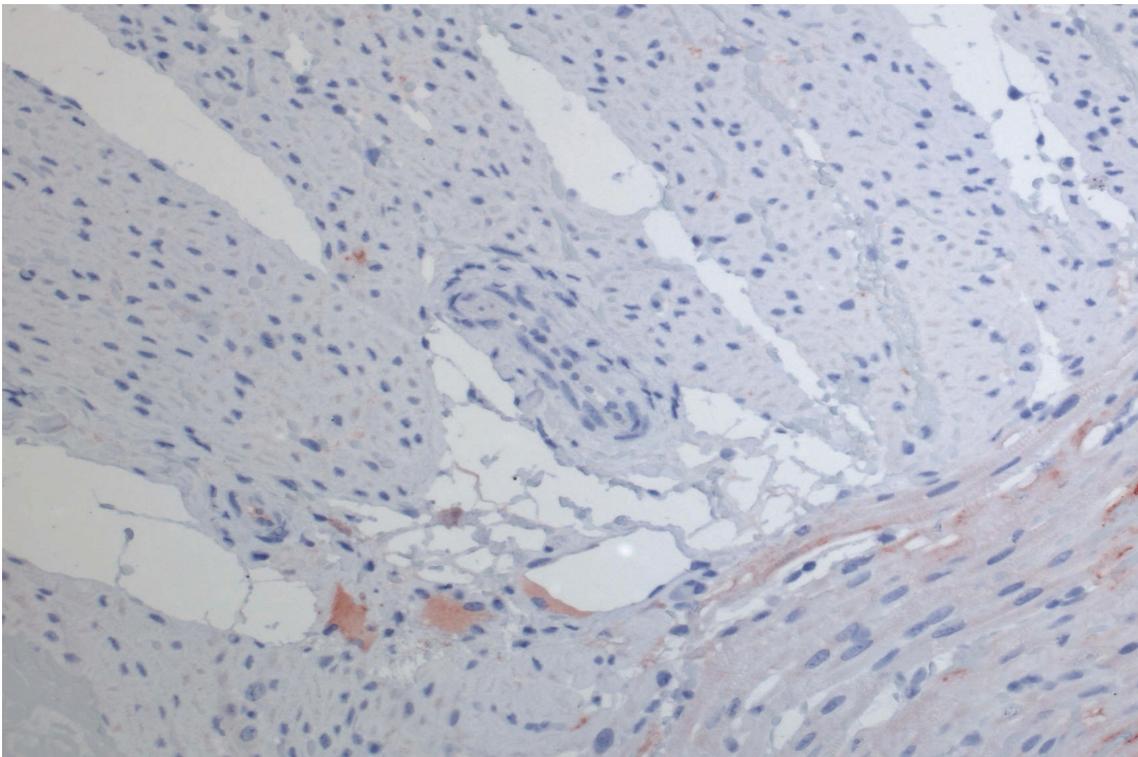


Abb. 31: Landrasse mit Tirofiban. Fibrin [10x]

6.2.3. hDAF-transgene Gruppe mit Tirofiban

Verglichen mit den Gruppen G1 und G2 waren in der Gruppe G3 in weit geringerem Umfang myokardiale Ödeme, Hämorrhagien und Nekrosen histopathologisch nachweisbar.

Es wurden nahezu keine Fibrinthromben gefunden.

Ablagerungen des MAC (C5b9) konnten nicht nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnte weder eine Schädigung des Endothels, noch eine Adhäsion von Leukozyten (MPO-positiven Granulozyten) histologisch festgestellt werden.

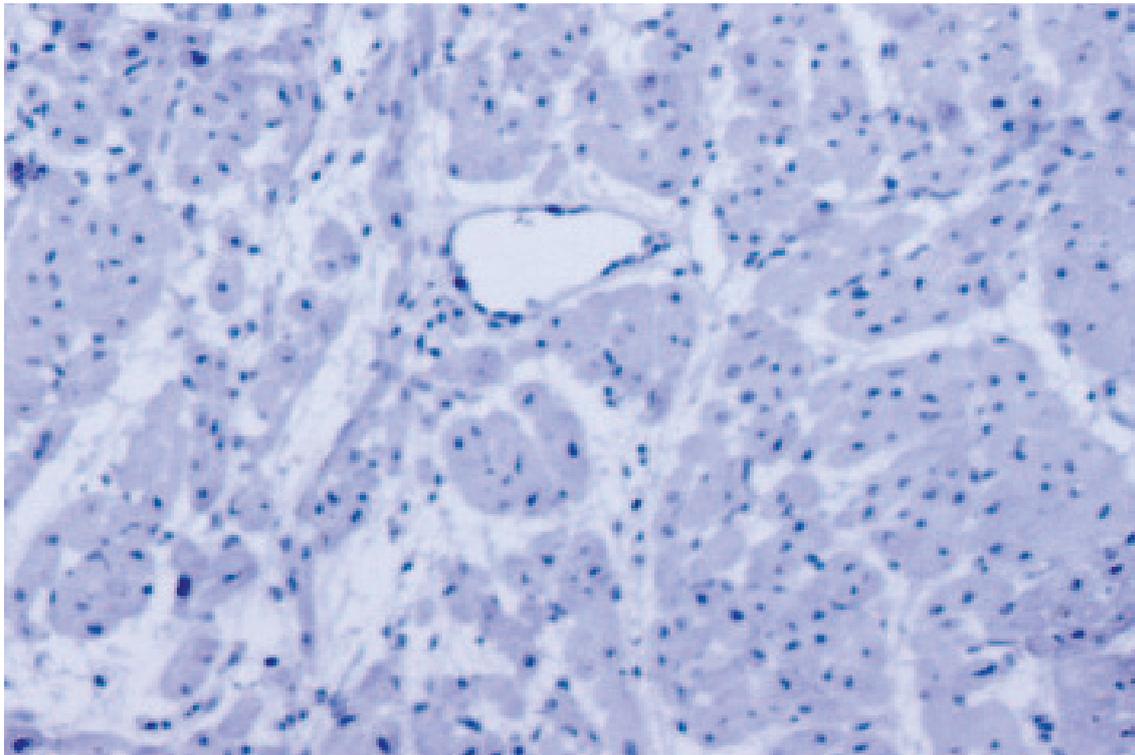


Abb. 32: hDAF mit Tirofiban. Fibrin [10x]

D. DISKUSSION

1. Einführung

Die Organtransplantation ist die Therapie der Wahl bei der Behandlung vieler Formen von Organversagen im Endstadium. Ein großes Problem bei der Allotransplantation stellt jedoch der Mangel an Spenderorganen dar. Die Xenotransplantation gilt als ein möglicher Ausweg aus der herrschenden Organknappheit.

Bei der Suche geeigneter Organspender aus dem Tierreich gibt es mehrere Spezies, die als Spender für humane Empfänger diskutiert werden. Humane und nicht-humane Primaten, wie zum Beispiel Paviane, Schimpansen oder Gorillas sind mit dem Menschen am nächsten verwandt, scheiden jedoch aus verschiedenen Gründen als Organspender aus. Dazu zählen vor allem ethische Bedenken im Sinne des Artenschutzes, aber auch die teilweise zu geringe Organgröße für erwachsene Empfänger, der geringe Zuchterfolg in Gefangenschaft, die hohen Kosten für Zucht und Haltung sowie die Gefahr der Übertragung von Krankheiten [54, 80, 130].

Obwohl es bei der diskordanten Spender-Empfänger-Konstellation Schwein-Mensch zu hyperakut verlaufenden Abstoßungsreaktionen kommt, gelten Schweine als die geeignetste Spenderspezies [87, 138, 163, 165]. Hierbei spielen Faktoren wie die bereits in der Landwirtschaft etablierten Zuchtmöglichkeiten, die Empfänglichkeit für genetische Manipulationen, das scheinbar geringe Risiko von auf den Menschen übertragbaren Krankheiten, die ethische Akzeptanz als Spendertiere und die Organgröße sowie die funktionelle Leistungsfähigkeit des Organs eine entscheidende Rolle.

Cozzi et al. sowie anderen Forschungsgruppen gelang es ab Mitte der neunziger Jahre, Schweine zu züchten, welche für humane Komplementregulatoren wie hDAF (CD55) transgen sind und diese auch in den verschiedensten Körpergeweben und -organen exprimieren [43]. Die Expression und die damit verbundene Xenogenität bewirkt bei den Tieren keinerlei schädigende Auswirkung im Hinblick auf ihr Wohlbefinden, ihr Wachstum und ihre Reproduktionsfähigkeit [43].

Eine mögliche Virusübertragung vor allem auf immunsupprimierte Xenotransplantatempfänger wird kontrovers diskutiert. Besonderes Augenmerk gilt

dabei den porzinen endogenen Retroviren (PERV). Bei in vitro-Versuchen kam es zur Infektion menschlicher Zellen durch PERV. Bisher konnte allerdings keine in vivo-Übertragung auf Menschen oder Primaten, die ein porzines Xenotransplantat erhalten hatten, nachgewiesen werden [55, 123, 127, 154]. Eine Erkrankung des Xenotransplantatempfängers durch bereits bekannte oder noch unbekanntes Xenozytosen und damit die mögliche Ansteckung und Gefährdung der Gesundheit vieler Menschen kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden [61, 74, 88, 168], zumal das Risiko der Übertragung von Xenozytosen oder der Aktivierung latenter Infektionen durch die Immunsuppression der humanen Empfänger erhöht wird.

Ethische Bedenken gegenüber einer klinischen Anwendung der Xenotransplantation beziehen sich in erster Linie auf die genetische Manipulation der Tiere, die Einmischung in die Gesetze der Natur und die Verantwortung des Menschen, alle Lebewesen zu schützen [42, 74, 121, 154, 168]. Jedes Jahr werden jedoch Millionen von Schweinen als Nahrungsquelle sowie als Spender für Insulin oder Herzklappen getötet, eine Tatsache, welche die ethischen Bedenken gegenüber der Verwendung von Schweinen als Organspender vermindert [42, 55, 74, 130, 165]. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Meinungsumfragen gezeigt werden, dass viele Menschen eine Xenotransplantation generell akzeptieren würden, wenn ihr eigenes Leben davon abhinge [165]. Sollte es jedoch zu physischen oder psychischen Problemen des Patienten nach erfolgter Xenotransplantation kommen und akut kein humanes Spenderorgan für diesen Patienten zur Verfügung stehen, wäre ein Ausstieg des Patienten aus einem kardialen Xenotransplantationsprojekt nicht möglich, da dies den unmittelbaren Tod des Patienten nach sich ziehen würde [41]. Somit stellt vor allem die kardiale Xenotransplantation eine ethische Ausnahmesituation dar.

Die porzine Anatomie und Physiologie weisen viele Ähnlichkeiten zur humanen Anatomie und Physiologie auf [43, 46, 165, 173]. Obwohl das Schweineherz auf eine horizontale Pumpfunktion ausgerichtet ist, erreicht es ein mit dem Herzen des Menschen vergleichbares Herzminutenvolumen [42, 80, 88, 173]. In verschiedenen orthotopen Xenotransplantationsversuchen waren die porzinen Herzen in der Lage, trotz der veränderten Position gegenüber der Schwerkraft eine adäquate Blutzirkulation im Körperkreislauf des Empfängerpavians über einen Monat lang aufrecht zu erhalten [21, 54, 156, 177].

Inwieweit sich die porcine Lebenserwartung von etwa 15 Jahre auf ein langfristiges Organüberleben im Empfänger auswirkt, kann momentan noch nicht vorhergesagt werden [28, 178]. Die endgültigen Auswirkungen werden somit erst bei einem Langzeitüberleben der Empfänger deutlich werden.

Die physiologischen Inkompatibilitäten aufgrund speziesspezifischer Unterschiede könnten ebenfalls zu einer inadäquaten Funktion der Xenotransplantate im Empfänger führen [79]. Obwohl dies für die Xenotransplantation von Organen wie Nieren und pankreatischen Inselzellen als wesentlich relevanter angenommen wird, soll an dieser Stelle erwähnt sein, dass auch im Rahmen der kardialen Xenotransplantation Inkompatibilitäten bezüglich enzymatischer und hormoneller Wirkmechanismen auftreten könnten [54, 55, 79, 163, 173]. Die porcine Körpertemperatur liegt mit 39°C höher als die des Menschen [54, 173], so dass dies die Kompatibilität von Botenstoffen und temperaturabhängigen Enzymen entscheidend beeinträchtigen könnte. Obwohl das Herz über eine nur geringe endokrinologische Aktivität verfügt, ist es auch für die kardiale Xenotransplantation von Bedeutung, dass Hormone und viele Botenstoffe das in der Leber synthetisierte Albumin als Transportmedium im Blut benötigen. Die immunologische Distanz für Albumin, welche aufgrund von Unterschieden im speziesspezifischen molekularen Aufbau ermittelt wird, beträgt innerhalb der humanen Spezies 1. Das humane Albumin unterscheidet sich jedoch um mehr als den Faktor 35 vom porcinen Molekül [42, 79], wodurch der Transport von porcinen Botenstoffen über humanes Albumin erschwert werden könnte.

Die porcine Serumkonzentration von Cholesterol liegt mit 45 mg/dl wesentlich niedriger als die humane mit 120 – 200 mg/dl, so dass ein porcines Xenotransplantat im humanen Empfänger vor allem im Hinblick auf die Endothelschädigung im Rahmen der Transplantatabstoßung empfänglicher für atherosklerotische Veränderungen sein könnte [42].

Von Relevanz für die kardiale Xenotransplantation ist auch die Interaktion von humanem Wachstumshormon (GH) mit den porcinen Rezeptoren sowie die möglicherweise speziesspezifische Regulation des GH, was zu unkontrollierten Größenveränderungen der Xenotransplantate im Empfänger führen könnte [42, 54, 55, 79, 163]. Dies wird noch bedeutsamer im Zusammenhang mit der Größe ausgewachsener Schweine, welche ein Körpergewicht von 450 kg und mehr erreichen können und damit weit größere Organe besitzen, als dies bei erwachsenen

Menschen der Fall ist [28, 42, 163]. Um dennoch eine adäquate Transplantatgröße gewährleisten zu können, kommen als Spendertiere Miniatschweine mit einem Körperendgewicht von unter 135 kg in Frage [42, 61].

Angesichts dieser aufgeführten Vorteile und Risiken ergibt sich bei der Xenotransplantation in den Menschen stets eine Gratwanderung zwischen den in Kauf zu nehmenden Risiken und dem Nutzen für den Empfänger.

2. Versuchskonzept

2.1. Perfusionsmodell

Bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden Versuche zur Organperfusion unternommen. Damals gelang es Langendorff, mittels der von ihm entwickelten retrograden Perfusionstechnik das Überleben funktionsfähiger Organe außerhalb des Körpers für einen gewissen Zeitraum zu ermöglichen [63]. Nachteil dieses Perfusionsverfahrens ist, dass die Koronararterien zwar antegrad mit Blut gefüllt werden, die Füllung der Herzkammern jedoch retrograd erfolgt und eine normale Schlagarbeit des Herzens somit nicht möglich ist. In den hier beschriebenen Versuchen wurde das Perfusionsmodell nach Langendorff deshalb nur initial zur Reperfusion der Koronarien verwendet.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Working-Heart-Modell wurde erstmals 1993 von Forty et al. beschrieben [63]. Dieses Perfusionsprinzip ermöglicht neben der Manipulation des Perfusates vor allem die physiologische Perfusion des linken Herzens und der Koronararterien. Kommt es zur abstoßungsbedingten Beeinträchtigung der koronaren Durchblutung des Herzens, korreliert dies mit der hämodynamischen Funktionsfähigkeit und dem makroskopischen Erscheinungsbild des Organs [63]. Forty et al. konnten zeigen, dass durch diese Versuchsanordnung ein myokardialer Schaden bereits in frühen Stadien messbar wird [63, 64]. Weitere Vorteile der ex vivo-Xenoperfusion sind die Reproduzierbarkeit der Versuchskonditionen und die Möglichkeit, die Versuchsp Parameter zu variieren [140].

Ein Nachteil dieses Perfusionssystems ist, dass es sich um ein ex vivo isoliert perfundiertes Herz handelt und somit keine weiteren Organe in das Perfusionssystem integriert sind. Dies erfordert im Falle der nicht vorhandenen Nieren unter anderem eine engmaschige Kontrolle der Elektrolytkonzentrationen und des Säure-Basen-Gleichgewichtes im Perfusat. Auch das Fehlen der Lunge muss in Bezug auf das Säure-Basen-Gleichgewicht mitberücksichtigt werden. Für die bisher erzielten Überlebenszeiten von ex vivo-perfundierten Herzen war es jedoch möglich, dies durch engmaschige Überwachung des Perfusates auszugleichen. Die fehlende hepatische Entgiftung stellt hingegen einen limitierenden Faktor für das Explantatüberleben im Rahmen der ex vivo-Xenoperfusionen dar.

Im Rahmen des vorliegenden Perfusionsmodells sowie im Rahmen von kardialen Xeno- und Allotransplantationen ergeben sich verschiedene Probleme durch die

Verwendung von extrakorporalen Perfusionssystemen. Gasbläschen verschiedenster Größe können in den Perfusionssystemen bereits durch fehlerhafte Entlüftung des Systems, aber auch durch Turbulenzen im Blutfluß an Verbindungs- und Kreuzungsstellen des Schlauchsystems sowie durch Temperaturdifferenzen des Blutes in den Wärmebädern entstehen [14]. Der Körper reagiert auf die Gasbläschen als Fremdkörper mit der Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems. Thrombozyten lagern sich an die Bläschenoberfläche an und die dadurch entstehenden Thromben können zusätzlich zu den Gasbläschen per se zu einer Mikroembolisation des Transplantates führen [14].

Auch nach dem Kontakt des Perfusates mit den nicht-endothelialen Oberflächen des Perfusionssystems ist die Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems im Perfusat und damit eine Beeinflussung der Komplement- und Gerinnungsaktivierung im Myokard möglich. Janvier et al. beschrieben in Bezug auf die bei Operationen am Herzen verwendeten extrakorporalen Zirkulationssysteme, dass es nach dem Kontakt des Blutes mit der nicht-endothelialen Oberfläche zur Aktivierung der Gerinnungskaskade über den intrinsischen Weg sowie zur Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg kommt [94].

Verschiedene korpuskuläre Blutbestandteile sind ebenfalls an diesen Vorgängen beteiligt. So fördert das im Rahmen der Komplementkaskade gebildete Anaphylatoxin C5a die Leukozytenadhäsion, vor allem von neutrophilen Granulozyten an die Wände des Schlauchsystems. Durch den Kontakt mit Luft kann es in den extrakorporalen Zirkulationssystemen möglicherweise zu einer Thrombozytenaktivierung kommen [94]. Die in das Perfusionssystem integrierten Rollerpumpen führen in einem geringen Maße zur Zerstörung der korpuskulären Blutbestandteile [122]. Im Rahmen der kardialen Allotransplantation tritt jedoch sowohl eine Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems durch das extrakorporale Zirkulationssystem, als auch die Zerstörung von korpuskulären Blutbestandteilen durch die Rollerpumpen der Herz-Lungen-Maschine auf, ohne dass das Operationsergebnis dadurch maßgeblich beeinflusst werden würde.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Leerperfusionen mit heparinisiertem Humanblut ergab sich keine wesentliche Aktivierung des Gerinnungssystems oder der Komplementkaskade durch den Kontakt des Perfusates mit der nicht-endothelialen Oberfläche des Perfusionssystems, so dass die Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems durch den Kontakt mit der

nicht-endothelialen Oberfläche des Perfusionssystems in der weiteren Diskussion der Komplement- und Gerinnungsparameter vernachlässigt werden kann.

2.2. Wahl des Thrombozytenaggregationshemmers

In die Phospholipiddoppelmembran der Thrombozyten sind verschiedene Glykoproteine – GPI bis GPIX – eingebettet, die als Rezeptoren für Aktivierungsvorgänge fungieren und der Interaktion mit dem Endothel und anderen Zellen dienen [2, 18, 158]. Der GPIb-Rezeptor vermittelt die Plättchenadhäsion an das subendotheliale Kollagen der Gefäßwand über den von Willebrand Faktor (vWF) [10, 18, 103, 158]. Außerdem bewirkt das GPIb nach Bindung an vWF im Komplex mit GPV und GPIX die Aktivierung des Integrins GPIIb/IIIa auf Thrombozyten, was die Bindung von Fibrinogen als Hauptliganden an den aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptor ermöglicht [65, 67, 149, 158, 166, 179].

Eine Vielzahl von weiteren Substanzen, die bei einer Gefäßverletzung freigesetzt werden (darunter Thrombin, Kollagen, Fibrinogen, vWF und ADP), können Signalprozesse in Gang setzen, welche die Aktivierung des GPIIb/IIIa durch Konformationsänderungen in der GPIIb/IIIa-Rezeptorstruktur induzieren und dessen Funktionsspektrum erweitern [38, 39, 67, 153, 159, 166]. Abhängig vom Aktivierungszustand der Thrombozyten befinden sich etwa 40.000 bis 100.000 Kopien des GPIIb/IIIa auf der Oberfläche jedes Thrombozyten [103, 153, 158, 159, 161, 166]. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor ist nicht nur durch die spezifische Bindung an Fibrinogen, sondern auch durch die Interaktion mit anderen Liganden wie dem vWF von entscheidender Bedeutung für die Plättchenaggregation und verstärkt die Thrombozytenadhäsion an die subendotheliale Matrix [18, 29, 67, 103, 124, 159]. Die bivalente Struktur von Fibrinogen sowie die multivalente Struktur des vWF ermöglichen die gleichzeitige Bindung an das GPIIb/IIIa auf mehreren Thrombozyten und damit die Bildung eines Pfropfes [38, 39, 158, 161].

Über den GPIIb/IIIa-Rezeptor kann es außerdem zu Adhäsionsvorgängen zwischen Leukozyten und Thrombozyten kommen, da Fibrinogen sowohl an das GPIIb/IIIa auf Thrombozyten, als auch an das aktivierte MAC-1-Integrin (CD11b/CD18) auf Leukozyten bindet [174].

Die gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaggregation wird unabhängig vom auslösenden Agonisten stets über den GPIIb/IIIa-Rezeptor vermittelt, so dass die medikamentöse Hemmung des GPIIb/IIIa-Rezeptor einen bedeutenden Einfluss auf die Thrombenbildung hat [30, 50, 65, 161]. Da die GPIIb/IIIa-Antagonisten in der Regel unabhängig von dessen Aktivierungszustand an den GP IIb/IIIa-Rezeptor

binden, werden sowohl die Funktionen des GPIIb/IIIa auf ruhenden Thrombozyten, als auch die Funktionen des GPIIb/IIIa auf aktivierten Thrombozyten gehemmt [156]. Coller et al. gelang es zu zeigen, dass ein monoklonaler Antikörper gegen den GPIIb/IIIa-Rezeptor (7E3) die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten und somit die Thrombozytenaggregation hemmen konnte [36, 38]. Aus dem Fab-Teil dieses Antikörpers (c7E3 Fab) wurde 1994 der erste GPIIb/IIIa-Antagonist Abciximab (ReoPro[®]) entwickelt [38]. Mittlerweile stehen als Antagonisten des GPIIb/IIIa-Rezeptors neben dem monoklonalen Antikörper Abciximab auch peptidische (Eptifibatid, Integrilin[®]) und nicht peptidische Substanzen (Tirofiban, Aggrastat[®]) zur Verfügung [30, 153, 159, 179].

Für die Anwendung im ex vivo-Perfusionsmodell kam ausschließlich ein parenteral verfügbarer Thrombozytenaggregationshemmer in Frage, welcher darüber hinaus auch noch eine möglichst umfassende Aggregationshemmung bewirken sollte. Die Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel (Plavix[®]) und Ticlopidin (Tiklyd[®]), welche eine Hemmung der ADP-abhängigen Thrombozytenaktivierung bewirken, sind national und international nicht in flüssiger Arzneiform verfügbar [159]. Acetylsalicylsäure (Aspirin[®]) hemmt irreversibel die Cyclooxygenase der Thrombozyten und verhindert damit die Bildung des an der Thrombozytenaktivierung beteiligten Thromboxan A₂ [8]. Acetylsalicylsäure hemmt jedoch nur die Thromboxan A₂-vermittelte Thrombozytenaggregation und nicht die Thromboxan A₂-unabhängigen Aktivatoren wie Kollagen, Thrombin und ADP [103, 161]. Das Ziel des vorliegenden Modells war jedoch eine möglichst umfassende Thrombozytenaggregationshemmung, so dass Acetylsalicylsäure als alleiniger Aggregationsinhibitor nicht in Frage kam.

Die GPIIb/IIIa-Antagonisten inhibieren die gemeinsame Endstrecke der Plättchenaggregation unabhängig vom auslösenden Stimulus und gewährleisten eine effektive Aggregationshemmung [29, 30, 60, 65, 153]. Orale GPIIb/IIIa-Antagonisten wie zum Beispiel Xemilofiban (SC-54684) und Roxifiban (DMP754), welche die Langzeitantikoagulation chronisch erkrankter Patienten ermöglichen könnten, sind in der Entwicklung und Prüfung (bis Phase III) [30, 31, 153, 179]. Den bisherigen Ergebnissen zufolge scheinen die oralen GPIIb/IIIa-Antagonisten keine Alternative zur Verwendung von parenteralen GPIIb/IIIa-Antagonisten oder anderen oralen Thrombozytenaggregationsinhibitoren zu sein [31, 179].

Die GPIIb/IIIa-Antagonisten Abciximab und Eptifibatid sind zwar mittlerweile parenteral verfügbar. Eine effektive Thrombozytenaggregationshemmung kann mit Eptifibatid jedoch erst eine Stunde, mit Abciximab sogar erst zwei Stunden nach dem Beginn der intravenösen Applikation erzielt werden. Im Gegensatz dazu erfolgt der Wirkungseintritt von Tirofiban nach wenigen Minuten. Bereits eine halbe Stunde nach dem Beginn der intravenösen Gabe von Tirofiban wird eine optimale Thrombozytenaggregation erreicht [58, 90]. Dies wurde auch in den vorliegenden Versuchen berücksichtigt, indem die Tirofibangabe 30 min vor der Xenoperfusion begonnen wurde (siehe Abb. 4).

Das in dieser Arbeit verwendete Tirofiban (Aggrastat[®]) ist somit derzeit der einzige für dieses Versuchsmodell geeignete Thrombozytenaggregationshemmer. Tirofiban ist ein hochspezifisches Medikament mit dosisabhängiger Wirkung, das eine kompetitive Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors bewirkt [159, 171]. Die Resultate der PRISM-PLUS-Studie sprechen für die Kombination von Tirofiban, Heparin und Aspirin, wie sie auch in den vorliegenden Versuchen verwendet wurde [137]. Die Applikation von Tirofiban erfolgte gemäß der Herstellerempfehlung parenteral zusammen mit Heparin und DL-Lysinmono(acetylsalicylat) (Aspisol[®]), welches die Thromboxan A₂-induzierte Plättchenaggregation inhibiert. Bei der Verabreichung in Kombination mit Heparin, welches hemmend auf die Thrombin-vermittelte Plättchenaggregation wirkt, kann durch den Heparineffekt ein verbesserter Schutz gegen eine weiterbestehende Plättchenaktivierung im Rahmen der Aggregationshemmung mit GPIIb/IIIa-Antagonisten erzielt werden [4, 50].

Verschiedene Forschungsgruppen beschreiben eine optimale Thrombozytenaggregation durch GPIIb/IIIa-Antagonisten mit minimalsten Blutungskomplikationen bei einer Rezeptorblockade von ca. 80% bis maximal 90% [6, 30, 38, 159]. Eine Rezeptorblockade von über 90% erhöht das Risiko für das Auftreten von Blutungen [159]. Abgesehen von Blutungskomplikationen, wie sie in verschiedenen klinischen Studien mit GPIIb/IIIa-Antagonisten beschrieben werden, kann es als Nebenwirkung auch zu Thrombozytopenien kommen [6, 29, 60, 137, 139, 153, 159, 171].

Somit muss auch bei der Applikation von Tirofiban das bestehende Blutungsrisiko berücksichtigt werden. Dies stellt im Rahmen der vorliegenden Versuche kein Problem dar, da es sich um ex vivo-Perfusionen handelt. Von Relevanz sind die potentiellen intra- und postoperativen Blutungskomplikationen allerdings im Hinblick

auf eine klinisch angewandte Xenotransplantation. Die Thrombozytenaggregationshemmung durch den GPIIb/IIIa-Rezeptorinhibitor kann jedoch durch die Gabe von Fibrinogen-haltigem fresh frozen plasma und gegebenenfalls zusätzlich von Thrombozytenkonzentraten antagonisiert werden [60, 159]. Abhängig vom Ausmaß der Blutungskomplikationen kann es auch ausreichend sein, lediglich die Tirofiban-Gabe zu beenden und die renale Clearance des Medikaments innerhalb von 2 bis 4 Stunden abzuwarten [171].

Ein weiterer Nachteil der Therapie mit GPIIb/IIIa-Antagonisten ist, dass zwar die Aggregation der einzelnen Thrombozyten untereinander, nicht aber die Thrombozytenaktivierung oder die Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliale Strukturen über den Glykoprotein Ib-Rezeptor verhindert werden. Eine Schicht aus Thrombozyten kann sich somit dennoch am Endothel bilden und zu einer lokalen Thrombose führen oder weiter distal eine Mikroembolie bewirken [161].

Andererseits ermöglicht die Applikation von GPIIb/IIIa-Antagonisten die Auflösung eines thrombozytenreichen Thrombus in vitro. Dafür sind jedoch relativ hohe Medikamentenkonzentrationen am Wirkungsort notwendig, so dass dieser Effekt in vivo wahrscheinlich nur durch lokale Applikation mittels Katheter erzielt werden kann [65]. Diese Fähigkeit von GPIIb/IIIa-Antagonisten, auch bereits vorhandene Thromben aufzulösen oder zumindest in ihrem Ausmaß zu vermindern, kann durch die Auflösung der Fibrinogen-Thrombozyten-Bindungen über den GPIIb/IIIa-Rezeptor erklärt werden. Wird beispielsweise Tirofiban als kompetitiver Antagonist verabreicht, kann es bei einer entsprechend hohen Medikamentenkonzentration am Thrombus zu einer Auflösung der Fibrinogen-GPIIb/IIIa-Verbindungen zugunsten von Tirofiban-GPIIb/IIIa-Verbindungen kommen [4, 161]. Die Effektivität von GPIIb/IIIa-Antagonisten kann somit auch im Sinne einer Verbesserung der Mikrozirkulation interpretiert werden [86, 118, 137].

Durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation mit GPIIb/IIIa-Antagonisten konnte in verschiedenen diskordanten Xenotransplantationsmodellen ein verlängertes Transplantatüberleben erzielt werden [29, 105, 143]. Eine effektive Thrombozytenaggregationshemmung kann somit den Verlauf der Abstoßungsreaktion günstig beeinflussen, zumal es im Rahmen von Organtransplantationen oft schon vor der eigentlichen Endothelschädigung zu Gerinnungsvorgängen mit Thrombozytenaggregation kommt [25].

3. Xenotransplantatabstoßung

3.1. Hyperakute Xenotransplantatabstoßung

Die hyperakute Transplantatabstoßung als schwere und rapide verlaufende immunologische Antwort auf eine Xenotransplantation ist gekennzeichnet durch interstitielle Ödeme, Hämorrhagien und Thrombosen mit ischämischer Gewebsschädigung sowie durch Ablagerungen von Fibrin, Komplement und Immunglobulin [10, 33, 87, 126, 133]. Das Ausmaß der Transplantatschädigung und der Abstoßungsreaktion scheint maßgeblich für den Zeitpunkt des Transplantatversagens und damit für die Überlebenszeit des Organs zu sein. In den vorliegenden Untersuchungen weisen die Herzen der Landrasse-Gruppe mit durchschnittlich $178,5 \pm 78,0$ min die kürzeste Überlebensdauer aller drei Gruppen auf, was durch den fehlenden Schutz der Landrasse-Gruppe gegenüber der hyperakuten Xenotransplantatabstoßung (HXR) erklärt werden kann.

Das Auftreten der HXR ist vor allem eine Folge der Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg durch die Bindung von xenoreaktiven natürlichen Antikörpern (XNA) der Klasse IgM an das endotheliale Gal α 1,3Gal-Epitop [1, 9, 71, 72, 125, 133]. Diese präformierten Antikörper spielen bei der HXR ebenso wie bei der ABO-inkompatiblen Transplantation eine zentrale Rolle, da ihre Entfernung eine Komplementaktivierung verhindern und eine HXR unterdrücken kann [1, 26, 87, 141]. Auch die XNA der Klasse IgG spielen bei der Abstoßung von Xenotransplantaten eine nicht zu unterschätzende Rolle. In diesem Zusammenhang beschrieben Cooke et al., dass diese Antikörper wahrscheinlich nicht unmittelbar an der Auslösung der HXR beteiligt sind, aber dennoch eine immense Endothel- und Transplantatschädigung verursachen können [40].

Im Verlauf der vorliegenden Versuche wurden die myokardiale Schädigung und die damit verbundene eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Xenotransplantate hämodynamisch und serologisch deutlich. Sowohl im Hinblick auf den mittleren arteriellen Druck (MAP), als auch im Hinblick auf das Herzminutenvolumen (HMV) und den Schlagarbeitsindex (SAI) zeigte sich die allmähliche Progredienz der Transplantatschädigung. Nach einem initialen Anstieg und der guten Auswurfleistung der porzinen Herzen kam es zu einer deutlichen Reduktion des MAP und vor allem des HMV und des SAI. Auffällig ist im Hinblick auf den MAP und das HMV, dass der Verlauf der Werte zwar in allen drei Gruppen relativ ähnlich war, die hDAF-transgene

Gruppe mit Tirofiban-Applikation jedoch stets höhere Werte erzielen konnte als die beiden anderen Gruppen. Verschiedene Forschungsgruppen, darunter Schmoeckel et al. [155, 156, 157], Cozzi et al. [44] und McGregor et al. [112] konnten zeigen, dass kardiale Xenotransplantate, welche die humanen Komplementregulatoren hDAF (CD55), membrane cofactor protein (MCP, CD46) oder Protectin (CD59) exprimierten, bei der Xenoperfusion mit humanem Blut und bei der Xenotransplantation in Paviane deutlich weniger Gewebsschädigung aufwiesen [13, 62, 112, 177]. Die von Brandl et al. durchgeführten Xenoperfusionen mit hDAF-transgenen Schweineherzen ohne Tirofiban-Applikation ergaben jedoch ein niedrigeres HMV im Vergleich zu der hDAF-transgenen Gruppe mit Tirofiban-Applikation und ein besseres HMV gegenüber den beiden Landrasse-Gruppen. Dies spricht für einen verstärkten Schutz des Transplantates durch die hDAF-Transgenität, vor allem in Kombination mit der Thrombozytenaggregationshemmung durch Tirofiban. Dennoch wurden auch diese hDAF-transgenen Herzen letztlich so massiv geschädigt, dass es ebenso wie in den beiden nicht-transgenen Gruppen zum Versagen der Organe kam, was sich in der deutlichen Abnahme des SAI in allen Gruppen zum Perfusionsende hin widerspiegelt. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass nicht alle Prozesse, die im Rahmen der HXR zur Transplantatschädigung und zum Versagen der Organe führen können, durch die hier unternommenen Maßnahmen zu verhindern sind. Bei den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten porzinen Xenotransplantationsversuchen in Paviane konnte das HMV zwar suffizient aufrecht erhalten und sogar gesteigert werden, allerdings nur unter Zuhilfenahme von inotropen Substanzen [17].

Die Enzyme Lactatdehydrogenase (LDH) und Aspartataminotransferase (ASAT) sowie Kreatinkinase (CK) und vor allem deren Isoenzym MB kommen in Myokardzellen vor und werden bei der Zerstörung dieser Zellen freigesetzt. Der Anstieg der Serumkonzentrationen dieser Enzyme bei den vorliegenden Versuchen ist folglich ein direkter serologischer Hinweis auf den Untergang von Myokardgewebe, welcher auf den Abstoßungsprozess und die damit verbundene Gewebsschädigung zurückgeführt werden kann. Wie zu erwarten war, kam es in der nicht-transgenen Gruppe ohne Tirofiban-Applikation zum stärksten Anstieg der enzymatischen Marker eines Myokardschadens im Perfusat, da diese Herzen der HXR ungeschützt ausgeliefert waren. Weder in den vorliegenden Untersuchungen

von Landrasse-Herzen mit Tirofiban-Applikation noch in den von Brandl et al. durchgeführten Xenoperfusionen mit hDAF-transgenen Schweineherzen ohne Tirofiban-Applikation konnte eine so geringe Zunahme der Enzymkonzentrationen erzielt werden wie in der hDAF-transgenen Gruppe mit Tirofiban-Gabe. Dies weist auf den verbesserten Schutz und die dadurch reduzierte Schädigung des Transplantatgewebes durch die Kombination von hDAF-Transgenität und einer Gerinnungshemmung durch die Applikation von Tirofiban hin. Wie wirkungsvoll die Thrombozytenaggregationshemmung durch Tirofiban war, wurde besonders gegen Ende der Perfusionen deutlich, wo sich signifikante Unterschiede in den Serumkonzentrationen der Enzyme zwischen der Landrasse-Gruppe ohne Thrombozytenaggregationshemmung und den beiden Gruppen mit Tirofiban-Applikation zeigten.

In Bezug auf das Transplantatüberleben konnte ein Vorteil durch die hDAF-Transgenität bestätigt werden. Die durchschnittliche Überlebenszeit der hDAF-transgenen Gruppe mit Tirofiban-Applikation ist mit $218 \pm 115,0$ min länger als die der beiden nicht transgenen Landrasse-Gruppen mit $178, \pm 78,0$ min beziehungsweise $196,5 \pm 115,9$ min. Das durchschnittlich längere Transplantatüberleben in der Landrasse-Gruppe mit Tirofiban-Applikation gegenüber der Landrasse-Gruppe ohne Thrombozytenaggregationsinhibitor weist auf eine verminderte Thrombozytenaggregation durch Tirofiban und eine damit verbundene verzögerte Transplantatschädigung hin. Ein weiterer Vorteil bezüglich des Transplantatüberlebens durch die Kombination von hDAF und Tirofiban konnte anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht bestätigt werden, da in den von Brandl et al. durchgeführten Xenoperfusionen mit hDAF-transgenen Schweineherzen ohne Tirofiban-Applikation das durchschnittliche Transplantatüberleben $223 \pm 30,0$ min betrug.

Auch wenn durch eine hDAF-Transgenität ein verlängertes Xenotransplantatüberleben ermöglicht wird bedeutet dies nicht, dass alle an der Transplantatabstoßung beteiligten Faktoren eliminiert sind [11]. In diesem Zusammenhang beschrieben unter anderem Bach et al., dass es auch in komplementdefizienten Xenotransplantatempfängern sowie in Abwesenheit von XNA zu einer Endothelzellaktivierung mit konsekutiver Gerinnungsaktivierung und Schädigung des Transplantates kommen kann [11, 92, 95]. Möglicher Auslöser

dieser Endothelaktivierung sind Monozyten und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), welche direkt an das porcine Endothel binden und dieses auch in Abwesenheit von XNA oder Komplement aktivieren und schädigen können [10, 11]. Im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens unterliegen die Endothelzellen darüber hinaus deutlichen funktionellen und strukturellen Veränderungen, welche sich in Störungen der Mikrozirkulation nach Reperfusion äußern und zur Entwicklung von inflammatorischen Prozessen beitragen [141, 151, 172].

In den vorliegenden Versuchen wurde eine kurze kalte Ischämiezeit angestrebt, um das Risiko einer möglichen Beeinflussung der endothelialen Struktur und Funktionsfähigkeit zu minimieren. Die kalte Ischämiezeit lag durchschnittlich bei $59 \pm 13,5$ min. Budrikis et al. stellten fest, dass eine kalte Ischämiezeit von 2 Stunden im Gegensatz zu einer länger andauernden kalten Ischämie die endotheliale Funktion nicht beeinträchtigte [23]. Bach et al. sowie Hancock beschrieben hingegen, dass die Ischämie alleine, aber auch der Reperfusionsschaden prokoagulatorisch wirken können, indem es zu einer erhöhten Endothelpermeabilität sowie zu einer Lückenbildung zwischen den einzelnen Endothelzellen kommt, was die Exposition der subendothelialen Matrix einschließlich vWF und Kollagen bedingt [11, 81]. Dies kann über eine Plättchenaktivierung den Weg für weitere Gerinnungsprozesse auch während späterer Abstoßungsvorgänge ebnen und ein Langzeitüberleben des Transplantats negativ beeinflussen [11, 25, 151].

3.2. Verzögerte Xenotransplantatabstoßung

Wird die HXR weitestgehend umgangen, kommt es innerhalb von Stunden bis Tagen nach Reperfusion zu einer verzögerten Xenotransplantatabstoßung, im Rahmen derer es nach wenigen Tagen bis Wochen zum Organversagen kommt [9, 11, 81, 126].

Bach et al. und Candinas et al. beschrieben ebenso wie zahlreiche andere Arbeitsgruppen, dass während des gesamten Abstoßungsprozesses eine Endothelzellaktivierung, die damit verbundenen inflammatorischen und prokoagulatorischen Veränderungen, verschiedene Gerinnungsvorgänge einschließlich Thrombozytenaktivierung und ausgedehnter Thrombenbildung mit daraus resultierender Ischämie und fokalen Nekrosen sowie eine Gewebsinfiltration durch NK-Zellen und Monozyten nachgewiesen werden konnten [9, 11, 19, 33, 82, 87, 106]. Diese komplexen Vorgänge charakterisieren die verzögerte Xenotransplantatabstoßung (DXR), welche auch als akute vaskuläre Abstoßung oder akute humorale Abstoßung bezeichnet wird und derzeit als das immunologische Haupthindernis auf dem Weg zur klinischen Xenotransplantation gilt [11, 33, 121, 160].

Bach et al. [9, 10] sowie Robson et al. [141] beschrieben, dass Xenotransplantate in der Phase der DXR viele Hinweise auf die Endothelzellaktivierung vom Typ II mit Genaktivierung und de novo-Proteinsynthese sowie eine verstärkte prokoagulatorische Situation im Transplantat aufweisen. Die de novo-Synthese von diversen Moleküle, zu denen Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, E-Selektin und ICAM-1 und Zytokine wie IL-1, IFN- γ , TNF- α und MCP-1 gehören, ermöglicht die Anlagerung von Monozyten und NK-Zellen, aber auch von Granulozyten an das aktivierte Endothel, was die Transmigration dieser Entzündungszellen in das Transplantatgewebe begünstigt [10, 11, 19, 78, 141, 144]. Aufgrund dieser persistierenden Endothelaktivierung resultiert auch dann eine allmähliche Transplantatabstoßung, wenn die Wirkung der XNA und die Komplementaktivierung abgeschwächt oder verhindert wird [9, 11, 81, 91, 106].

Die Ergebnisse von Studien von Candinas et al. betonen den Einfluss von lokalen Plättchenaggregaten und Mikrothromben in den späteren Phasen der Xenotransplantatabstoßung sowie die Bedeutung und Effektivität der Gerinnungshemmung durch GPIIb/IIIa-Antagonisten für das Xenotransplantatüberleben im Rahmen der DXR [29].

Auch wenn das in der vorliegenden Arbeit verwendete ex vivo-Xenoperfusionsmodell aufgrund der begrenzten Transplantatüberlebenszeiten für die präzise Untersuchung der DXR nicht geeignet ist, so kann durch dieses Forschungsmodell dennoch versucht werden, frühzeitig eine möglichst umfassende Prävention der Transplantatschädigung zu erzielen, was sich im weiteren Verlauf auch auf das Ausmaß der DXR auswirken kann.

3.3. Chronische Xenotransplantatabstoßung

Auf Grund der Schwierigkeiten, vor allem im Rahmen der Xenotransplantation ein Transplantatüberleben über die Phase der DXR hinaus zu ermöglichen, ist es nur begrenzt möglich, Aussagen über die chronische Xenotransplantatabstoßung zu treffen.

Ebenso wie nach einer Allotransplantation [100] werden im Rahmen der chronischen Xenotransplantatabstoßung eine Schädigung der Gefäßwände durch Entzündungsreaktionen, Ischämie und Vaskulopathien sowie eine fortschreitende Infarzierung des Myokards mit bindegewebigem Ersatz der normalen Organstrukturen vermutet [1, 21, 76]. In diesem Zusammenhang beschrieben Marsh und Ryan, dass die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie platelet derived growth factor und basic fibroblast growth factor aus den geschädigten Endothelzellen zu proliferativen Veränderungen der Gefäßwand des Xenotransplantates führen kann, welche vergleichbar mit den Veränderungen während der chronischen Allotransplantatabstoßung sind [110].

Da die während der HXR und DXR entstandenen prokoagulatorischen Störungen der Gerinnungsregulation auch im Rahmen der chronischen Xenotransplantatabstoßung andauern können, kann die thrombogene Infarzierung des Myokards mit konsekutivem Versagen der Transplantatfunktion auch in dieser späten Abstoßungsphase fortschreiten. Labarrere et al. beobachteten dies im Rahmen der kardialen Allotransplantation und betonten die Bedeutung einer effektiven Verminderung der thrombogenen Situation für das Transplantatüberleben [100]. Die Annahme von intravasalen Gerinnungsprozessen als Merkmal von allen Formen der Xenotransplantatabstoßung [143] macht eine möglichst effektive Hemmung der prokoagulatorischen Situation und der Thrombenbildung, wie dies in der vorliegenden Arbeit versucht wurde, erforderlich.

4. Pathologie der Gerinnung bei der Xenotransplantation

Bei einer Übertragung der Untersuchungsergebnisse von Tierstudien auf den Menschen müssen stets die abweichenden physiologischen und vor allem koagulatorischen Gegebenheiten berücksichtigt werden.

Hämatologische Differenzen zwischen den porcinen und den humanen Parametern bestehen bezüglich des niedrigeren Hämoglobingehaltes des porcinen Blutes, des geringeren porcinen Hämatokrits, der niedrigeren porcinen Blutviskosität sowie des geringeren porcinen Erythrozytendurchmessers. Dobson et al. postulierten, dass diese Unterschiede eine gestörte Hämoperfusion und damit eine Stase des Blutflusses mit Begünstigung thrombotischer Ereignisse sowie eine inadäquaten Organfunktion bewirken könnten [54].

Im Rahmen der Xenotransplantation wurden von Robson et al. und Bach et al. sowie von zahlreichen anderen Arbeitsgruppen molekulare Inkompatibilitäten in Bezug auf die an der Gerinnungsregulation beteiligten Faktoren beschrieben [10, 11, 81, 141, 142]. Diese Inkompatibilitäten können in einigen Fällen von Vorteil für das Xenotransplantatüberleben sein. Beispiele hierfür sind Interferon- γ und Interleukin- 1β , zwei humane Zytokine, die während der Abstoßungsreaktion von eingewanderten Monozyten gebildet werden und gegenüber den porcinen Endothelzellen wirkungslos sind, so dass es zu keiner direkten Endothelzellschädigung durch diese Zytokine kommen kann [10, 11].

In der überwiegenden Zahl der Fälle tragen die molekularen Inkompatibilitäten jedoch zu der massiven Schädigung des Xenotransplantates bei. Einige der an der Gerinnung beteiligten Faktoren sind speziesspezifisch und somit nicht kompatibel für die Gerinnungsregulation im Rahmen der Xenotransplantation. Dazu gehören unter anderem der von Willebrand-Faktor (vWF), Thrombomodulin (TM) und tissue factor pathway inhibitor (TFPI) [54, 81, 117, 142].

Der porcine vWF weist eine besonders starke Bindungskapazität für den GPIIb-Rezeptor der humanen Thrombozyten auf, so dass es auch ohne die sonst notwendige Einwirkung von Scherkräften oder eine vorhandene Endothelschädigung zur spontanen Thrombozytenadhäsion an das Endothel kommt [5, 9, 54, 124], was zur Aktivierung des GPIIb/IIIa-Komplexes der humanen Thrombozyten mit nachfolgender Fibrinogenbindung und Thrombozytenaggregation führt [54, 124].

Der transmembrane Thrombinrezeptor TM auf Endothelzellen und Thrombozyten aktiviert nach Bindung von Thrombin den Gerinnungsregulator Protein C. Aktiviertes Protein C führt zusammen mit dem Cofaktor Protein S zur proteolytischen Spaltung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa und wirkt somit antikoagulatorisch [10, 84, 102, 141]. Porzines TM besitzt jedoch lediglich 1% der Aktivität von humanem TM [102] und ist somit nicht in der Lage, effektiv mit humanem Protein C zu reagieren [54, 102, 117, 142]. Sowohl in den drei vorliegenden Versuchsgruppen als auch in weiteren Xenoperfusionsversuchen von Brandl et al. mit hDAF-transgenen Schweineherzen ohne Zugabe von Tirofiban ergaben sich im Versuchsverlauf sehr ähnliche Konzentrationsabnahmen von Protein C im humanen Plasma. Die Ineffektivität des porzinen TM scheint somit weder durch die Applikation von Tirofiban noch durch die hDAF-Transgenität der Xenotransplantate positiv beeinflusst zu werden.

Das von aktivierten Endothelzellen und Monozyten freigesetzte und nach Endothelzellretraktion auf der subendothelialen Matrix freigelegte Gewebsthromboplastin (TF) fördert in hohem Maße die Gerinnung und initiiert prokoagulatorische Prozesse [97], wodurch es unter anderem zu Aktivierung von Faktor X kommt [113]. Physiologischer Weise werden diese Vorgänge durch TFPI und den Komplex aus Antithrombin III (ATIII) und Heparansulfat-Proteoglykanen inhibiert [113]. Der porzine TFPI ist zwar in der Lage humane Komplexe aus TF und Faktor VIIa zu hemmen, erwies sich in den Untersuchungen von Kopp et al. jedoch als ineffektiv bei der Inaktivierung von humanem Faktor Xa [10, 11, 54, 91, 97, 142], was die Entstehung von Thrombosen begünstigt. AT III bewirkt physiologischer Weise eine irreversible Hemmung von Gerinnungsfaktoren wie Thrombin oder Faktor Xa und wird dabei in seiner antikoagulatorischen Wirkung von endothelialen Heparansulfat-Proteoglykanen sowie von Heparin unterstützt [84, 91, 113]. Der bereits einleitend erwähnte Verlust der endothelialen Heparansulfat-Proteoglykane führt jedoch nicht nur zu einer verminderten Wirkungsfähigkeit von ATIII, sondern auch zu einem verminderten Schutz des Endothels gegenüber Blutzellen und Plasmabestandteilen [9, 132]. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verlief der Konzentrationsabfall des humanen ATIII im Perfusat in allen drei Gruppen relativ ähnlich und kann mit dem Verbrauch von ATIII durch Komplexbildung mit Thrombin begründet werden. Die initial signifikant stärkere und insgesamt etwas deutlichere Abnahme von ATIII in der hDAF-transgenen Gruppe mit Gerinnungshemmung durch

Tirofiban kann durch die Komplementregulation und die dadurch bedingte geringere Endothelschädigung erklärt werden, da ansonsten die Komplementkomponente C5a zusammen mit XNA den Verlust der endothelialen Heparansulfat-Proteoglykane bewirkt und somit die verminderte Wirkungsfähigkeit von ATIII begünstigt [49]. In diesem Zusammenhang bietet die hDAF-Transgenität der Organe und nicht die Thrombozytenaggregationshemmung einen wirkungsvollen Schutz.

Die im Zuge der Xenotransplantation auftretenden molekularen Inkompatibilitäten können Reaktionen hervorrufen, die in dieser Form weder physiologisch sind noch bei Alлотransplantationen vorkommen würden [11]. Auch wenn im Rahmen von kardialen Xenoperfusionen keine weiteren Organe beteiligt sind, spielen die Gerinnungsvorgänge in anderen Organen eine bedeutende Rolle für eine klinische Xenotransplantation. Durch systemische Gerinnungsvorgänge oder auch Gerinnungsprozesse in anderen Organen können Mediatoren angeschwemmt werden, welche eine ischämische Transplantatschädigung durch Thrombenbildung bewirken. Das Xenotransplantat selbst ist somit in die systemischen Gerinnungsveränderungen involviert [160]. Verschiedene Forschungsgruppen, darunter Ierino et al. und Robson et al., beschrieben in diesem Zusammenhang, dass die bereits bei der HXR auftretenden Gerinnungsprozesse während der Phase der DXR weiter bestehen, was die Ursache für die schweren lokalen und systemischen Störungen des Gerinnungsgleichgewichts bis hin zur Verbrauchskoagulopathie (DIC) darstellen kann [16, 92, 143]. Die Entwicklung einer DIC wurde mehrfach im Rahmen der Abstoßung von porzinen Organen nach Xenotransplantation in Paviane beschrieben [4, 24, 92, 138]. In diesem Zusammenhang beobachteten Alwayn et al. das Auftreten einer disseminierten intravasalen Gerinnung bereits lange bevor die Abstoßungsreaktion histopathologisch nachgewiesen wurde [4]. Dies spricht für eine frühzeitige Gerinnungsaktivierung im Rahmen der Xenotransplantation und macht eine effektive Gerinnungshemmung besonders dringlich, um die Schädigung des xenogenen Organs zu minimieren. Gaca et al. wiesen auf die rasche Entwicklung der DIC als ein charakteristisches Merkmal der hyperakuten pulmonalen Xenotransplantatabstoßung hin [68]. Auch im Zuge der renalen Xenotransplantatdysfunktion, seltener der kardialen, wurde das Auftreten einer DIC beobachtet [4, 24, 92, 96, 98].

Im Rahmen der Xenotransplantation kommt es somit aufgrund von molekularen Inkompatibilitäten zu einer gestörten Gerinnungsregulation, welche in der Hyperkoagulabilität des Blutes resultiert. Die Hyperkoagulabilität des Blutes zählt zusammen mit der Schädigung des Endothels und der Stase des Blutflusses zu den von Virchow definierten Auslösern für die Bildung einer Thrombose. Von diesen Komponenten der Virchow-Trias scheinen die prokoagulatorisch wirkenden Endothelschädigung und Endothelaktivierung die größte Auswirkung in Bezug auf die HXR zu haben [76]. Darüber hinaus kommt es zu einer Beeinträchtigung des Blutflusses durch Thrombozytenadhäsion und –aggregation. Die Thrombozytenadhäsion und –aggregation wird im Verbrauch von Thrombozyten und Fibrinogen und damit der Abnahme der Thrombozyten- und Fibrinogenkonzentration im Blut wiedergespiegelt. Die Abnahme der Fibrinogenplasmakonzentration verlief in allen vorliegenden Versuchsgruppen sehr ähnlich, obwohl in den beiden Gruppen mit Blockade des GPIIb/IIIa und daraus resultierender Hemmung der Fibrinogen-Bindung an diesen Rezeptor vergleichsweise höhere Fibrinogenkonzentrationen zu erwarten gewesen wären. Eine mögliche Erklärung könnte eine suboptimale Aggregationshemmung mit Blockade von weniger als den empfohlenen 80 – 90% aller GPIIb/IIIa-Rezeptoren aufgrund einer nicht ausreichenden Tirofibandosierung sein. Dies erscheint unwahrscheinlich, da die Dosierung der Herstellerempfehlung entsprach. Eine höhere Dosierung würde in der klinischen Anwendung ein größeres Risiko für Blutungen bedeuten [159], was jedoch im Rahmen von Xenoperfusionsversuchen nicht adäquat überprüft werden kann.

Der signifikant deutlichere Abfall der Thrombozytenkonzentration in der nicht-transgenen Landrasse-Gruppe ohne Tirofiban-Gabe gegenüber den beiden Gruppen mit Applikation des GPIIb/IIIa-Antagonisten weist auf die Bedeutung und Effektivität der Thrombozytenaggregationshemmung durch Blockade des GPIIb/IIIa in den vorliegenden Versuchen hin. Dass trotz der Tirofiban-Applikation ein gewisser Thrombozytenverbrauch resultiert, kann dadurch erklärt werden, dass es aufgrund von Gefäßverletzungen und Endothelschäden unabhängig von der Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors zur Interaktion zwischen dem vWF der subendothelialen Matrix und dem GPIb/IX/V-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche und damit zur Thrombozytenadhäsion an das Endothel kommt [149].

Die Adhäsion von Thrombozyten an das Kollagen der Gefäßwand sowie die Gegenwart von Thrombin gehören zu den potentesten Stimulatoren der

Thrombozytenaktivierung [103, 150]. Die Freisetzung von ADP, Serotonin und Thromboxan A₂ aus den aktivierten Thrombozyten führt zur Rekrutierung und Aktivierung von weiteren, in der Nähe befindlichen Thrombozyten [103]. Thromboxan A₂ und Serotonin sind darüber hinaus in der Lage, eine Myokardischämie zu verschlimmern, indem sie die Plättchenaggregation und damit die lokale mechanische Gefäßobstruktion sowie die Bildung von Mikrothromben fördern und durch ihre vasokonstriktorische Wirkung zusätzlich verstärken [56]. Resultat dieser Prozesse ist eine regionale Stase des Blutflusses durch vermehrte Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie die ischämische Schädigung des Gewebes, was die Funktionsabnahme des Transplantats mit sich bringt [82]. Somit treten alle Komponenten der Virchow-Trias (Endothelschaden, Hyperkoagulabilität, Stase) im Rahmen der Xenotransplantation auf.

Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen eine Abnahme des Koronarflusses als unmittelbare Folge der mechanischen Obstruktion des Gefäßbettes feststellen konnten [14, 84, 85, 86], wurde bei den hier durchgeführten Versuchen eine Zunahme des Koronarflusses über die Dauer der ex vivo-Xenoperfusion beobachtet. Dieser Vorgang wurde von anderen Gruppen ebenfalls beschrieben und als anfängliche Vasokonstriktion interpretiert, die im Laufe der Perfusion nachließ [140, 155]. In diesem Zusammenhang kann der in den vorliegenden Versuchen initial ansteigende, dann jedoch zum Ende der Perfusionen hin abfallende Verlauf des Koronarwiderstand erklärt werden. Diese Beobachtung stellt jedoch einen Widerspruch zu den Ergebnissen von Budrikis et al. dar, welche eine direkte Korrelation zwischen der endothelialen Schädigung und dem Koronarwiderstand beschrieben [23]. Die hier vorliegende Abnahme des Koronarwiderstandes und die korrelierende Zunahme des Koronarflusses trotz der fortschreitenden Embolisation von Koronargefäßen kann auf die Adenosin-vermittelte Vasodilatation der nicht betroffenen Gefäße zurückgeführt werden [51, 56, 85, 86, 89]. Auch andere vasoaktive Substanzen wie Kaliumionen oder Laktat, welche im Rahmen der ischämischen Myokardschädigung freigesetzt werden, können zu der hyperämischen Zunahme des Koronarflusses beitragen [89]. Schmoeckel et al. beobachteten in einem mit dem vorliegenden vergleichbaren ex vivo-Perfusionsmodell ebenfalls eine anfängliche Zunahme des Koronarwiderstandes nach Beginn des Working-Heart-Modus mit einem Maximum nach 30 min Perfusion [155]. Die anfängliche Zunahme und anschließende Abnahme des Koronarwiderstandes führten Schmoeckel et al.

auf die entsprechend vermehrte beziehungsweise verminderte endotheliale Freisetzung des stark vasokonstriktorisch wirksamen Endothelin-1 zurück [155]. Eine weitere Erklärung für die Abnahme des Koronarwiderstandes und die Zunahme des Koronarflusses wurde von Merkus et al. beschrieben. Der Blutfluss entlang der Endotheloberfläche von Koronargefäßen erzeugt Scherkräfte am Endothel. Merkus et al. beobachteten, dass eine Zunahme dieser Scherkräfte durch Zunahme des Koronarflusses zur Freisetzung von NO führt, wodurch es als Regulationsmechanismus zu einer Vasodilatation mit Abnahme des Koronarwiderstandes und damit der Scherkräfte am Endothel kommt [114].

Die in den vorliegenden Versuchen initial erhöhte arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ($avDO_2$) zwischen dem arteriellen und dem venösen Blut kann als Kompensationsmechanismus des anfänglich eingeschränkten Koronarfluss erklärt werden [140, 167]. Mit der Zunahme des Koronarflusses im Verlauf der Perfusionen kam es dementsprechend zu einer Abnahme der $avDO_2$, wobei dies auch durch die verminderte Sauerstoffverwertung des zunehmend nekrotisch geschädigten Myokards bedingt sein kann.

Trotz der Zunahme des Koronarflusses kam es in den vorliegenden Versuchen durch die progrediente koronare Mikroembolisation zu einer Myokardischämie, deren funktionelles Korrelat die verminderte regional Kontraktilität mit der bereits beschriebenen Abnahme des SAI darstellt [85]. Coller beschrieb, dass aus der Embolisation kleiner Blutgefäßen eine ischämische Schädigung im Versorgungsgebiet des Gefäßes bis hin zur elektrischen Instabilität des Herzens resultieren kann [39]. Typische Folgen dieser kardialen Mikroembolisation und konsekutiven Myokardischämie sind Arrhythmien, kontraktile Dysfunktion und die Entwicklung eines Herzversagens [85], wie sie auch in den vorliegenden Versuchen beobachtet wurden.

Die dargestellten Inkompatibilitäten zwischen humanen und porcinen Komponenten des Gerinnungssystems und die damit einhergehenden Störungen des Gerinnungsgleichgewichtes erfordern eine möglichst effektive Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Um die erfolgreiche Durchführung einer klinischen Xenotransplantation zu ermöglichen, ist es somit von größter Bedeutung, die Gerinnungsvorgänge kontrollieren zu können und vor allem die daraus resultierende Thrombenbildung zu verhindern, wie es in der vorliegenden Arbeit versucht wurde.

5. Komplementregulation

Ein Charakteristikum des Komplementsystems ist die Fähigkeit zur Differenzierung zwischen körpereigenem und körperfremdem Gewebe [116]. Gewurz et al. wiesen in diesem Zusammenhang bereits 1967 auf die bedeutende Rolle des Komplementsystems für die Xenotransplantatabstoßung hin [75].

Nach der Anlagerung von xenoreaktiven natürlichen Antikörper (XNA) an die endothelständigen Gal α 1-3Gal-Epitope und der Bindung von C1q an diese Immunkomplexe wird die Komplementkaskade über den klassischen Weg aktiviert [59, 135, 151]. Verstärkt wird dieser Vorgang durch die fehlende Komplementregulation, da die physiologischen Schutzmechanismen gegenüber dem homologen Komplement wie decay accelerating factor (DAF, CD55), membrane cofactor protein (MCP, CD46), Protectin (CD59) oder Faktor H als Komplementregulator des alternativen Weges, als speziesspezifisch gelten [33, 49, 76, 115, 135]. Van den Berg et al. lieferten Hinweise auf das Vorhandensein speziessübergreifender Komplementregulationsmechanismen, dennoch muss davon ausgegangen werden, dass die porzinen Inhibitionsmechanismen in natura gegenüber den humanen Komplementfaktoren nahezu unwirksam sind [10, 11, 126, 134, 135].

Abgesehen von der Antigen-Antikörper-vermittelten Komplementaktivierung über den klassischen Weg kann es im Zuge der Xenotransplantatabstoßung auch zu einer Aktivierung über den alternativen Komplementweg kommen [63, 95, 115, 145]. Als mögliche Ursachen werden dabei der Ischämie-Reperfusionsschaden des Transplantatgewebes, die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren oder die sekundäre Aktivierung durch den nach der Aktivierung des klassischen Weges entstandenen Gewebeschaden diskutiert [22, 108]. Auch aufgrund der mangelhaften Fähigkeit von Faktor H im Empfängerserum, eine Kontrolle über die porzine Komplementaktivität auszuüben, sowie mittels direkter Aktivierung durch das xenogene Endothel kann es in geringem Maße zu einer direkten Komplementaktivierung über den alternativen Weg kommen [12, 49, 72, 134, 147]. Diese Komplementaktivierung über den alternativen Aktivierungsweg scheint für die Auslösung der HXR ausreichend zu sein [95, 106]. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, weshalb in den vorliegenden Versuchen auch bei den hDAF-transgenen Schweineherzen eine abstoßungsbedingte Funktionseinschränkung zu beobachten

war. Darüber hinaus scheint das Vorhandensein von kompatiblen Komplementregulatoren eine hyperakute Abstoßungsreaktion nicht vollständig verhindern zu können, da es auch bei der Allotransplantation in sensibilisierten Patienten zu einer milden hyperakuten Abstoßungsreaktion kommen kann [135].

1994 gelang es Langford, Cozzi, White et al., transgene Schweine zu züchten, die das humane Komplementregulatorprotein hDAF unter der Kontrolle des DAF Promotors exprimierten [101, 148]. Mittlerweile können hDAF-transgene Schweine gezüchtet werden, welche sogar größere Mengen an hDAF-Molekülen exprimieren, als es in humanen Geweben der Fall ist [45]. Bei in vitro-Versuchen schützte die Expression von humanem DAF auf den xenogenen Endothelzellen diese Zellen gegenüber XNA und komplementvermittelter Zelllyse, ohne dabei die antigen-präsentierende Funktion der Endothelzellen zu verändern oder die Leukozytenadhäsion an das Endothel zu begünstigen [20]. Van den Berg et al. postulierten, dass diese erhöhte Anzahl an endothelial exprimierten Komplementregulatorproteinen einen wesentlichen Beitrag zum Schutz vor komplementvermittelter Zelllyse bewirkt [175].

Die Verwendung hDAF-transgener Tiere hat darüber hinaus den Vorteil, dass über die Inhibition der C3-Konvertase sowohl die klassische, als auch die alternative Komplementkaskade gehemmt werden (siehe Abb. 33) [1, 44, 66].

Klassischer Aktivierungsweg

Antigen-Antikörper-Komplex + C1q

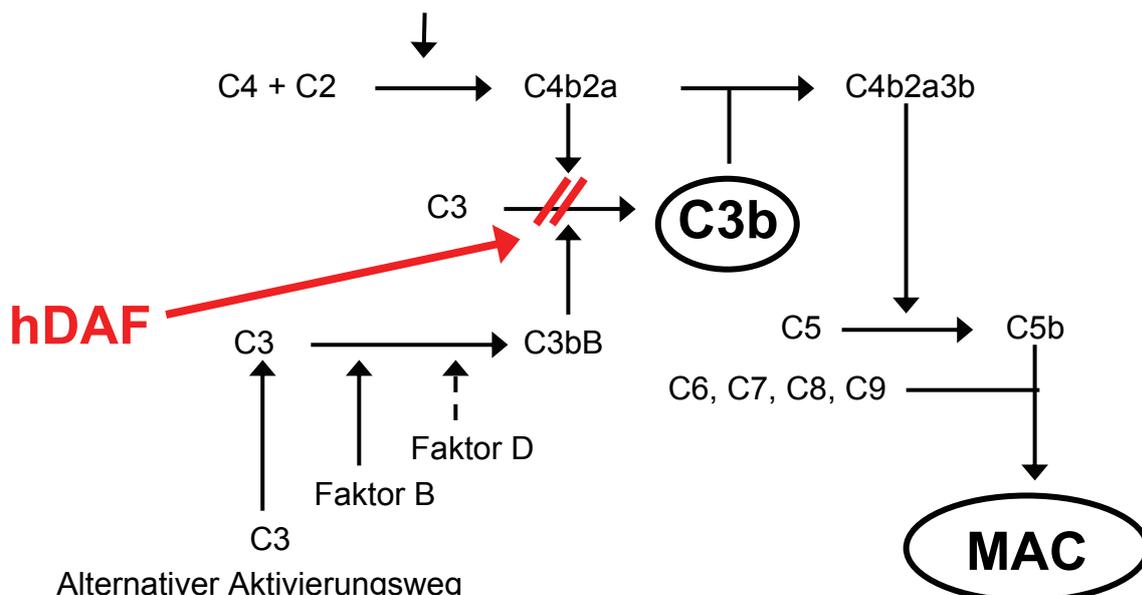


Abb. 33: Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen und den alternativen Weg mit Hemmung der C3-Konvertase durch hDAF [49, 66, 87].

Pino-Chavez et al. konnten in den Herzen von hDAF-transgenen Schweinen anhand der abgelagerten Komplementkomponenten keine Komplementaktivierung über die C4-Stufe hinaus oder eine Aktivierung über den alternativen Weg erkennen [131]. Die Expression von hDAF auf porzinen Endothelzellen scheint diese Zellen gegenüber der Bildung des humanen MAC zu schützen [59]. Die Ergebnisse von Schmoeckel et al. zeigen, dass für humanes DAF transgene Schweineherzen nach Transplantation in Paviane nicht hyperakut abgestoßen werden und die Bildung des MAC in den transgenen Herzen erfolgreich verhindert werden kann [155, 158]. Die vorliegenden Perfusionsergebnisse demonstrieren im Hinblick auf die Schädigung und Funktionseinschränkung der Xenotransplantate ebenfalls den Schutz der porzinen Herzen durch die hDAF-Transgenität. Somit wird durch die Verwendung von hDAF-transgenen Tieren nicht nur ein verlängertes Transplantatüberleben ermöglicht, wie es unter anderem in den vorliegenden Versuchen demonstriert werden konnte, sondern auch die Problematik der HXR weitestgehend überwunden [134, 155].

Da nicht nur der MAC als das Endprodukt der Komplementkaskade, sondern nahe zu alle Komplementkomponenten die Entstehung einer prokoagulatorischen Situation im Transplantat und unter Umständen im gesamten Empfängerorganismus fördern, spielt die Inhibition des Komplementsystems auch im Hinblick auf die Bildung von Thromben eine große Rolle.

Zusätzlich zu seiner Bedeutung bei der Komplementaktivierung über den klassischen Weg ist C1q ebenso wie andere Komplementkomponenten in der Lage, die Thrombozytenaggregation zu beeinflussen. Dabei können C1q-Aggregate durch Kollagen-ähnliche Wirkung eine Thrombozytenaggregation induzieren [147, 162]. Die Bindung von C1q an den C1q-Rezeptor auf Thrombozyten induziert eine Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration und dadurch die Aktivierung des GPIIb/IIIa [12, 29, 129]. Durch die C1q-induzierte Plättchenstimulation kommt es zur Expression von P-Selektin sowie zur Cyclooxygenase-vermittelten Bildung von Thromboxan A₂, was die Freisetzung von prokoagulatorischen Komponenten aus den Speichergranula fördert [12, 29, 129]. Die Komplementkomponente C1q bewirkt somit eine gesteigerte prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten [12, 29].

Im Verlauf der Komplementkaskade werden weitere gerinnungsfördernde oder ischämieverstärkende Prozesse initiiert. Das Komplementspaltprodukt C2b induziert

erhöhte Gefäßpermeabilität und Kontraktion der glatten Muskulatur [12], wodurch eine ischämische Xenotransplantatschädigung verstärkt werden kann.

Der Komplementfaktor C5a bewirkt eine Vasokonstriktion und aktiviert darüber hinaus die Endothelzellen, was die Ablösung von Heparansulfat-Proteoglykanen und des daran gebundenen ATIII von der Endothelzelloberfläche, die Synthese von TF, die Freisetzung von vWF und die Expression von P-Selektin zur Folge hat [12, 49, 59, 132, 172]. C3a und C5a fördern als potente proinflammatorische Komplementkomponenten die Leukozytenadhäsion und die Spaltung von Arachidonsäure und können eine Mastzelldegranulation mit Freisetzung von Histamin und daraus resultierender vaskulärer Permeabilitätserhöhung bewirken [12, 49, 59, 82, 110, 141]. Außerdem sind C3a und C5a in der Lage, Granulozyten, NK-Zellen und Monozyten anzulocken, zu aktivieren und zusammen mit iC3b deren Adhäsion zu vermitteln [12, 110, 176].

Die Serumkonzentrationen der Komplementfaktoren C3 und C4 können wichtige Hinweise auf das Ausmaß der Komplementaktivierung geben. Im nicht-transgenen Xenotransplantationsmodell führt die Aktivierung des Komplementsystems rasch zu ausgedehnten Ablagerungen von C3 und C4 auf den autologen und xenogenen Zellen [44, 130, 131, 134, 145].

Sowohl in den vorliegenden Versuchen als auch in den ebenfalls von Brandl et al. durchgeführten Xenoperfusionen mit hDAF-transgenen Schweineherzen ohne Tirofiban-Applikation war die Abnahme der Serumkonzentrationen von C3 und C4 in den hDAF-transgenen Gruppen erwartungsgemäß am geringsten. Dies spricht für eine effektive Hemmung der C3-Konvertase aufgrund der hDAF-Expression. Der deutlichere Konzentrationsabfall von C3 in der Landrasse-Gruppe mit Tirofiban-Gabe im Vergleich zu der Landrasse-Gruppe ohne Thrombozytenaggregationshemmung kann möglicherweise durch eine Komplementaktivierung im Rahmen der GPIIb/IIIa-Blockade erklärt werden. Die Anlagerung von antithrombozytären Antikörpern an Glykoproteine der Thrombozytenmembran wie GPIIb/IIIa oder GPIb/IX kann eine Komplementaktivierung auf der Thrombozytenoberfläche induzieren [164]. Durch die Gabe von Tirofiban werden die GPIIb/IIIa in hohem Maße blockiert und somit die Antikörperbindung an GPIIb/IIIa inhibiert. Allerdings ist es denkbar, dass es zu einer Anlagerung von Antikörpern an Tirofiban auf der Thrombozytenoberfläche kommt und dadurch eine Komplementaktivierung über den klassischen Weg initiiert wird, was wiederum den Verbrauch von Komplementfaktoren wie C3 erklären kann.

Der Verbrauch von C4 war in den beiden nicht-transgenen Gruppen nur wenig größer als in der hDAF-transgenen Gruppe mit Tirofiban-Gabe. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von C4b2a in allen drei Gruppen in ähnlich hohem Maße stattgefunden hat, bevor der weitere Ablauf der Komplementkaskade auf der Höhe der C3-Konvertase durch hDAF gehemmt wurde.

Die rasche Ansammlung von C5b67 und MAC auf der Endothelzelloberfläche bewirkt bei den Endothelzellen eine Veränderung der Zellform und eine Zellretraktion. Dies zieht sowohl die Bildung von interzellulären Lücken und den Verlust der endothelialen Integrität, als auch die Freilegung der prokoagulatorisch wirksamen subendothelialen Matrix nach sich [9, 33, 141, 150, 162, 172]. Nach der Einlagerung in die Zellmembran wirkt der MAC nicht notwendigerweise zytotoxisch [172]. Wenn sich der MAC nur in geringer Anzahl auf der Oberfläche einer metabolisch aktiven Zelle anlagert, kann die Lyse der Zielzelle durch Exo- oder Endozytose der betroffenen Membranabschnitte verhindert werden [12, 162]. In sublytischen Konzentrationen induziert die vorübergehende Einlagerung des MAC in die Endothelzellmembran unter anderem eine gesteigerte Expression von P-Selektin sowie die Freisetzung von TF, PAF und vWF, was die Anlagerung von Thrombozyten an die Gefäßwand begünstigt [12, 59, 162, 172].

Aus der meist nicht-lytischen Interaktion zwischen dem MAC und den Thrombozyten resultiert die Freisetzung von Fibrinogen und anderen prokoagulatorischen Faktoren wie ADP, Serotonin und Thromboxan A₂. Das Resultat ist die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten und damit eine gesteigerte prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten [110, 141, 162].

6. Immunologie

Innerhalb von Minuten nach Revaskularisierung kommt es unter anderem durch Thrombin, Histamin oder den MAC zur Endothelzellaktivierung. Al-Mohanna et al. konnten zeigen, dass es auch durch humane Leukozyten zu einer unmittelbaren Endothelzellaktivierung kommen kann, da Leukozyten, vor allem neutrophile Granulozyten, unabhängig von XNA und Komplementfaktoren in der Lage sind, xenogenes Endothel direkt zu erkennen und zu aktivieren [3]. Die aktivierten humanen Endothelzellen weisen auf ihrer Zelloberfläche vermehrt P-Selektin sowie eine erhöhte Expression von PAF auf [47], was entweder direkt oder über die Freisetzung von Histamin eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und Endothelzellkontraktion zur Folge hat [9, 47, 51, 141]. Das P-Selektin-Molekül vermittelt die Adhäsion von Leukozyten sowohl an Thrombozyten, als auch an Endothelzellen [87]. An das Endothel angelagerte Thrombozyten können somit über die Expression von P-Selektin auf ihrer Oberfläche die Leukozytenadhäsion begünstigen [120, 174]. Humane Leukozyten, vor allem neutrophile Granulozyten, besitzen darüber hinaus eine größere Affinität zu porzinem als zu humanem Endothel und können sich folglich in erhöhtem Maße an Endothel xenogener Organe anlagern und dieses durchwandern [32]. Alle diese Vorgänge begünstigen die Adhäsion und anschließende Transmigration von Leukozyten, welche zur Endothelzellschädigung beitragen können [78, 82, 144].

In den vorliegenden Versuchen kam es zu einer in allen Gruppen ähnlich ausgeprägten Abnahme der Leukozytenkonzentration im Serum über die gesamte Dauer der Perfusion. Dies kann vor allem auf die Adhäsionsvorgänge zurückgeführt werden. Das MAC-1-Integrin (CD11b/CD18) auf Leukozyten bindet unter anderem an Fibrinogen [110]. Über die Bindung von Fibrinogen an das GPIIb/IIIa auf Thrombozyten und an das MAC-1 auf Leukozyten kann es somit zur Interaktion und Aggregation dieser Zellen miteinander kommen [9, 99, 174]. Dies führt zu einer Beteiligung von Leukozyten an der Thrombenbildung sowie zur Adhäsion von Leukozyten an endotheliale oder subendotheliale Komponenten und damit zu einem Verlust der Leukozyten aus dem Serum.

Die FACS-Analyse im Rahmen der vorliegenden Versuche ergab einen initialen Anstieg der CD11b positiven Leukozyten im Perfusat in allen drei Versuchsgruppen, was auf die immunologischen Aktivierungsprozesse zurückgeführt werden kann. Die

Tirofiban-Gabe wirkte sich in Bezug auf die CD11b positiven Zellen nicht in jedem Fall wie erwartet aus. Die Leukozyten können über das MAC-1 (CD11b/CD18) an Fibrinogen binden, welches wiederum an das GPIIb/IIIa auf Thrombozyten gebunden sein kann. Dies führt zur Adhäsion und Einlagerung von Leukozyten in Thromben. Aufgrund der Blockade des GPIIb/IIIa durch Tirofiban wäre in den beiden Gruppen mit Tirofiban-Applikation eine hohe Konzentration an CD11b positiven Zellen im Perfusat zu erwarten gewesen. Diese Erwartung wurde jedoch nur in der hDAF-transgenen Gruppe durch einen signifikant deutlicheren Anstieg der CD11b positiven Zellen bestätigt. Dies kann mit der verminderten Endothelschädigung im Rahmen der hDAF-Transgenität erklärt werden. Die geringere Schädigung kann zu einer weniger ausgeprägten Endothelaktivierung beitragen, was wiederum die Adhäsionsmöglichkeiten für Leukozyten zum Beispiel über das MAC-1 (CD11b/CD18) verschlechtert. Somit ergeben sich höhere Konzentrationen von CD11b positiven Leukozyten im Perfusat.

Die Tirofiban-Applikation in der Landrassegruppe bewirkte im Vergleich zur Landrassegruppe ohne Thrombozytenaggregationshemmung nicht wie zu erwarten gewesen wäre höhere Konzentrationen von CD11b positiven Zellen. Eine mögliche Erklärung ist die massive immunologische Antwort und Abstoßungsreaktion gegenüber den Landrasseherzen, was eine ausgeprägtere Aktivierung von Leukozyten begünstigen kann.

Abgesehen vom MAC-1 (CD11b/CD18) wird die Adhäsion von Leukozyten auch durch die Komplementkomponenten C1q, C3a und C5a sowie durch iC3b begünstigt [12, 49]. C1q ist außerdem in der Lage, über eine Bindung an den C1q-Rezeptor auf Zellen wie Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten eine Zellaktivierung und -adhäsion zu fördern [12, 129].

Humane Leukozyten, vor allem T-Lymphozyten, können schwere Schäden am Xenotransplantat bewirken. Der massiven zellulären Immunreaktion auf Xenotransplantate liegen vermutlich folgende Mechanismen zugrunde: zum einen die direkte Erkennung von körperfremden MHC-Molekülen und die gesteigerte indirekte Reaktion auf Peptidfragmente, die über körpereigene MHC präsentiert werden, zum anderen der verstärkende Effekt von humoraler Immunreaktion und Entzündung auf die zelluläre Immunantwort sowie die begrenzten immunregulatorischen Möglichkeiten über die Speziesgrenzen hinweg [33].

Im Rahmen der HXR kommt es vor allem durch XNA vom Typ IgM zu einer Komplement- und Endothelzellaktivierung [77, 133]. Obwohl die Ablagerung von xenoreaktiven IgM das Bild der Xenotransplantatabstoßung prägt [71, 133], weiß man mittlerweile, dass es in geringem Maße auch zur Ablagerung von IgG-Antikörpern kommt [82]. Diese Antikörper sind wahrscheinlich nicht unmittelbar an der Auslösung der HXR beteiligt, können aber dennoch eine immense Endothel- und Transplantatschädigung verursachen [40].

In den vorliegenden Untersuchungen kam es in allen drei Versuchsgruppen zu einem Verbrauch von xenoreaktiven Anti-Gal α 1,3Gal-IgM und -IgG, welcher durch die Anlagerung an die endothelialen Gal α 1,3Gal-Epitope erklärt werden kann. Diese Komplexbildung wurde weder durch die Thrombozytenaggregationshemmung, noch durch die hDAF-Transgenität beeinträchtigt. Die Expression des humanen Komplementregulators hDAF bewirkte erst auf Höhe der C3-Konvertase, also nach der Komplexbildung zwischen den endothelialen Gal α 1,3Gal-Epitopen und den xenoreaktiven Anti-Gal α 1,3Gal-Antikörpern und der daraus resultierenden Komplementaktivierung, eine Hemmung der Komplementkaskade. Neben den präformierten xenoreaktiven Anti-Gal α 1,3Gal-IgM und -IgG spielen bei der Xenotransplantatabstoßung auch Anti-Pig-Antikörper (APA) eine bedeutende Rolle. APA werden nach Sensibilisierung gegenüber porzinem Gewebe gebildet und sind gegen diverse Proteine und Kohlenhydratmoleküle auf porzinem Gewebe gerichtet [21, 77]. Brandl et al. beobachteten nach kardialen Xenotransplantation in Pavianen eine Zunahme von APA in Sinne einer vermehrten Antikörper-Produktion durch Exposition gegenüber porzinem Gewebe [21]. In den vorliegenden Xenoperfusionsversuchen kam es in allen drei Gruppen zu einer annähernd gleich starken Konzentrationsabnahme der APA, was durch die Adhäsion an das porcine Endothel erklärt werden kann. Da die Serumkonzentration und die Adhäsion der APA sowie deren Verbrauch im Rahmen dieser Arbeit nicht beeinflusst wurden, war mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen der drei Versuchsgruppen nicht zu rechnen.

7. Histologie und Immunhistologie

Das Kapillarendothel besteht lediglich aus einer einzigen Zellschicht. Somit ist es nachvollziehbar, dass die Zerstörung dieser endothelialen Zellschicht unmittelbar zu interstitiellen Hämorrhagien im Transplantat und zum Übertritt von intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium führt, noch bevor die vollständige Nekrose der Endothelzellen eingetreten ist [147]. Dieser Endothelschaden tritt als erstes in den kleinen postkapillären Venolen auf und führt zu venösen Thrombosen, von denen besonders die epikardialen und subepikardialen Venolen sowie die intramyokardialen Venen betroffen sind [76, 147]. Rose und Cooper beobachteten, dass die Thromben im Bereich der arteriellen Gefäße in der Regel erst zu einem Zeitpunkt der hyperakuten Abstoßungsphase auftraten, an dem eine ausgedehnte venöse und kapilläre Thrombosierung bereits stattgefunden hatte [147]. Somit bewerteten Rose und Cooper die Bildung von venösen Thromben als die früheste morphologische Veränderung im Rahmen der Antikörper-vermittelten Xenotransplantatabstoßung [147]. An sich wäre eine frühe Thrombosierung der arteriellen Gefäße viel wahrscheinlicher, da diese als erste mit dem Xenoperfusat in Kontakt kommen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Mögliche Erklärungen beruhen darauf, dass das venöse Endothel im Vergleich zum arteriellen mehr Rezeptoren für Entzündungsmediatoren besitzt und somit schneller und in größerem Umfang von den immunkompetenten Zellen des Perfusates attackiert werden kann. Darüber hinaus kommt es in den venösen Gefäßen aufgrund der langsameren Fließgeschwindigkeit des Blutes häufiger als in anderen Gefäßen zu einer Thrombosenbildung im Sinne der Virchow-Trias aus Stase des Blutflusses, Endothelschaden und Hyperkoagulabilität [147].

In den vorliegenden Versuchen verfärbte sich das Myokard der hyperakut abgestoßenen Xenotransplantate innerhalb weniger Minuten vor allem im Bereich der Koronararterien dunkellila bis blau. Dies entspricht den Beobachtungen von anderen Forschungsgruppen. Anhand der Forschungsergebnisse von Rose und Cooper kann das makroskopische Erscheinungsbild der xenoperfundierten Schweineherzen als venöser Myokardinfarkt interpretiert werden [146].

Leventhal et al. berichteten über Parallelen zwischen der HXR und der DXR, da in beiden Abstoßungsphasen histopathologisch eine Endothelzellschwellung, Ödeme, interstitielle Hämorrhagien, Fibrinablagerungen, intravasale Thromben und eine

Infiltration von Leukozyten zu finden waren [106]. Viele dieser histologischen Veränderungen ähneln darüber hinaus dem histopathologischen Erscheinungsbild bei der Abstoßung von ABO-inkompatiblen Allotransplantaten [130]. Im Rahmen der Xenotransplantatabstoßung kommt es durch den Verlust der endothelialen Barrierefunktion und die erhöhte Gefäßpermeabilität zu massiven interstitiellen Hämorrhagien und Ödemen des Myokards [14, 19]. Dies wird durch den Blutstau in den Kapillaren im Rahmen der venösen Embolisation und den dadurch ansteigenden hydrostatischen Druck im Gewebe aggraviert [14]. Diese Prozesse kommen in der prozentualen Gewichtszunahme der Schweineherzen während der Xenoperfusion zum Ausdruck. Die prozentual geringste Gewichtszunahme mit $7,4 \pm 3,2$ % ist in den hDAF-transgenen Herzen mit zu finden. In den von Brandl et al. durchgeführten Xenoperfusionen mit hDAF-transgenen Schweineherzen ohne Tirofiban-Applikation ergab sich eine prozentuale Gewichtszunahme von $13,1 \pm 2,9$ %. Dies kann auf den besseren Schutz vor einer Komplement-vermittelten Endothelschädigung aufgrund der endothelialen hDAF-Expression im Vergleich zu den beiden Landrassegruppen mit $18,3 \pm 5,5$ % ohne Tirofiban-Applikation beziehungsweise $14,2 \pm 3,2$ % mit Tirofiban-Gabe zurückgeführt werden. Die Tirofiban-Applikation ergab nur in Kombination mit der hDAF-Transgenität eine signifikant verminderte Gewichtszunahme der Schweineherzen.

Die charakteristischen morphologischen Merkmale der HXR, welche auch in den vorliegenden Präparaten vor allem der Landrasse-Gruppe ohne Gerinnungsinhibition zu finden waren, sind lichtmikroskopisch sichtbare interstitielle Hämorrhagien und intravasale Mikrothromben [47, 82, 146]. Im Gegensatz zu der Landrasse-Gruppe ohne Thrombozytenaggregationshemmung wurden in den beiden Gruppe mit Tirofiban-Applikation kaum Fibrinablagerungen im Bereich von Hämorrhagien oder Nekrosen gefunden, was auf die effektive Thrombozytenaggregationshemmung durch Tirofiban zurückgeführt werden kann. Die Beobachtung, dass sich die Infarkte in der Mikrozirkulation abspielen und die großen Gefäße von der HXR nicht betroffen sind, konnte in den vorliegenden Präparaten bestätigt werden [82]. Die Forschungsergebnisse von Chen et al. zeigen, dass das Gal α 1-3Gal-Epitop auf dem kardialen Kapillarendothel stärker exprimiert ist als auf dem Endothel größerer Koronargefäße. Dies könnte eine stärkere Initialisierung der HXR im Kapillarbett der Xenotransplantate bedingen und somit eine weitere Ursache der im Kapillarbett besonders ausgeprägten Thrombosierung sein [35].

Dass trotz der Thrombozytenaggregationshemmung in den beiden Perfusionsgruppen mit Tirofiban-Applikation vereinzelt Fibrinthromben zu finden waren, kann durch den Wirkmechanismus des GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban erklärt werden. Die GPIIb/IIIa-Antagonisten, verhindern zwar die Aggregation der einzelnen Thrombozyten untereinander, nicht aber die Thrombozytenaktivierung oder die Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliale Strukturen über den GPIb-Rezeptor. Eine Schicht aus Thrombozyten kann sich somit dennoch am Endothel bilden und zu einer lokalen Thrombose führen oder weiter distal eine Mikroembolie bewirken [149, 161]. In diesem Zusammenhang kann auch die vergleichsweise ausgeprägte Leukozytenadhäsion in der Landrassegruppe ohne GPIIb/IIIa-Antagonismus erklärt werden. Da Fibrinogen sowohl an das GPIIb/IIIa auf Thrombozyten, als auch an das aktivierte MAC-1-Integrin (CD11b/CD18) auf Leukozyten bindet [174], konnte es in der Landrasse-Gruppe ohne Tirofiban-Gabe zu einer deutlich stärkeren Leukozytenadhäsion kommen, als es in den beiden anderen Gruppen der Fall war.

Hancock beschreibt, dass immunhistologische Xenotransplantatanalysen typischerweise neben einer dichten Ablagerung von Immunglobulinen auch eine dichte Ablagerung von Komplementkomponenten entlang der Gefäßwände zeigen [82]. Dieser Befund wurde ebenfalls in den vorliegenden Präparaten beobachtet. Im Vergleich zu den beiden nicht-transgenen Gruppen, in denen Ablagerungen des MAC vor allem in den hämorrhagischen Arealen gefunden wurden, konnten in der hDAF-transgenen Gruppe nahezu keine MAC-Komplexe nachgewiesen werden. Dies kann als histopathologischer Nachweis der effektiven Komplementhemmung durch die endotheliale Expression der hDAF-Moleküle gewertet werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Inwieweit und wann die Xenotransplantation eine klinisch realisierbare Alternative zur Alлотransplantation werden wird, hängt unter anderem davon ab, wie schnell es gelingt, die Xenotransplantatabstoßung in einem für das Xenotransplantatüberleben beziehungsweise für das Überleben des Patienten relevanten Ausmaße zu umgehen oder wie schnell im Vergleich dazu weitere Möglichkeiten des Organersatzes entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der hDAF-Transgenität und der Thrombozytenaggregationshemmung auf die hyperakute Xenotransplantatabstoßung von porzinen Herzen in einem Xenoperfusionsmodell mit humanem Blut untersucht.

Das Auftreten der hyperakuten Xenotransplantatabstoßung ist vor allem eine Folge der Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg durch die Bindung von xenoreaktiven natürlichen Antikörpern an das endotheliale Gal α 1,3Gal-Epitop auf den porzinen Zellen. Das unter physiologischen Bedingungen antithrombotische und antikoagulatorische Endothel wird im Verlauf der Abstoßungsprozesse prokoagulatorisch. Dies spiegelt sich in der teilweise massiven Thromboembolisation und dem damit verbundenen Transplantatversagen wieder.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Versuchsgruppen miteinander verglichen: eine nicht-transgene Landrasse-Gruppe, eine weitere nicht-transgene Landrasse-Gruppe mit Thrombozytenaggregationshemmung und eine hDAF-transgene Gruppe ebenfalls mit Thrombozytenaggregationshemmung. Vor allem die Kombination der Thrombozytenaggregationshemmung mit dem GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban und die Komplementregulation über die Expression von hDAF auf dem porzinen Endothel konnten ein verbessertes Transplantatüberleben und eine verminderte Transplantatschädigung bewirken. Besonders deutlich zeigte sich dies in Bezug auf den signifikant niedrigeren Thrombozytenverbrauch und die Serumkonzentrationen von LDH, ASAT, CK und CK-MB in der hDAF-transgenen Gruppe mit Applikation von Tirofiban. In dieser Gruppe konnte unter anderem auch ein besseres Herzminutenvolumen über die Dauer der Perfusion und eine längere Überlebenszeit der xenoperfundierten Herzen erzielt werden.

Die hyperakute Transplantatabstoßung als schwere und rapide verlaufende immunologische Antwort auf eine Xenotransplantation ist histopathologisch gekennzeichnet durch interstitielle Ödeme, Hämorrhagien und Thrombosen mit

ischämischer Gewebeschädigung sowie durch Ablagerungen von Fibrin, Komplement und Immunglobulin. In den vorliegenden Untersuchungen konnte dies besonders deutlich in der nicht-transgenen Landrasse-Gruppe ohne Tirofiban-Applikation beobachtet werden, welche am wenigsten gegenüber der Abstoßungsreaktion geschützt war.

Die während der hyperakuten Xenotransplantatabstoßung entstandenen prokoagulatorischen Störungen der Gerinnungsregulation können auch im Rahmen der verzögerten und chronischen Xenotransplantatabstoßung andauern. Das Auftreten von intravasalen Gerinnungsprozessen ist somit ein Merkmal von allen Formen der Xenotransplantatabstoßung, was eine möglichst effektive Hemmung der prokoagulatorischen Situation und der Thrombenbildung, wie dies in der vorliegenden Arbeit mit Tirofiban untersucht wurde, erforderlich macht. In der hDAF-transgenen Gruppe mit Applikation von Tirofiban waren nahezu keine Fibrinthromben, Komplementablagerungen oder Endothelschäden nachweisbar.

Diese verminderte histopathologisch nachweisbare Organschädigung könnte sich positiv auf die Funktionsfähigkeit des Xenotransplantates im Verlauf späterer Abstoßungsprozesse auswirken.

Die vorliegenden Daten lassen somit den Schluss zu, dass die Kombination aus Thrombozytenaggregationshemmung und Komplementregulation eine sinnvolle Strategie zur Überwindung der HXR und Verminderung der Xenotransplantatschädigung ist.

F. ANHANG

1. Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
APA	Anti-Pig-Antikörper
ASAT	Aspartataminotransferase
ATIII	Antithrombin III
AUC	area under the curve
avDO ₂	arteriovenöse Sauerstoffdifferenz
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Isoenzym MB der Kreatinkinase
DAF	decay-accelerating factor
DIC	disseminated intravascular coagulation, Verbrauchskoagulopathie
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DXR	delayed xenograft rejection, verzögerte Xenotransplantatabstoßung
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GH	growth hormone, Wachstumshormon
GP	Glykoprotein
Hb	Hämoglobin
hDAF	humaner decay-accelerating factor
HF	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
HMV	Herzminutenvolumen
HXR	hyperacute xenograft rejection, hyperakute Xenotransplantatabstoßung
ICAM	intercellular adhesion molecule, interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kB	Kilobasen
KG	Körpergewicht
KW	Koronarwiderstand

LAP	left atrial pressure, linksatrialer Druck
LDH	Lactatdehydrogenase
MAC	membrane attack complex, Membran-Angriffs-Komplex
MAP	mean arterial pressure, mittlerer arterieller Druck
MCP	membrane cofactor protein, CD 46
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Peptid 1
min	Minuten
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NO	Stickstoffmonoxyd
Nr.	Nummer
NYHA	New York Heart Association
P	pressure, Druck
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PERV	porzine endogene Retroviren
PTCA	perkutane transluminale Koronar-Angioplastie
SAI	Schlagarbeitsindex
TF	tissue factor, Gewebsthromboplastin
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TM	Thrombomodulin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
v. Chr.	vor Christus
vs.	versus
vWF	von Willebrand-Faktor
XNA	xenoreaktive natürliche Antikörper

2. Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
1	Schematische Darstellung der Komplementaktivierung über den klassischen Aktivierungsweg mit Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (MAC)	14
2	Kalte Ischämiezeit	25
3	Schematische Darstellung des Working-Heart-Modells	26
4	Diagramm des Perfusionsablaufes	28
5	Mittlerer arterieller Druck während der Perfusion	39
6	Herzminutenvolumen während der Perfusion	40
7	Schlagarbeitsindex der Schweineherzen während der Perfusion	41
8	Koronarfluss während der Perfusion	42
9	Koronarwiderstand während der Perfusion	43
10	Arteriovenöse Sauerstoffdifferenz im Perfusat während der Perfusion	44
11	Überlebenszeit der Schweineherzen	45
12	Prozentuale Gewichtszunahme der Schweineherzen während der Perfusion	46
13	Prozentuale Plasmakonzentration von Antithrombin III	47
14	Prozentuale Plasmakonzentration von Protein C	48
15	Prozentuale Plasmakonzentration von Fibrinogen	49
16	Serumkonzentration der Kreatinkinase	50
17	Serumkonzentration des Kreatinkinase-Isoenzym CK-MB	51
18	Serumkonzentration der Aspartataminotransferase	52
19	Serumkonzentration der Lactatdehydrogenase	53
20	Prozentuale Thrombozytenkonzentration im Vollblut	54
21	Prozentuale Leukozytenkonzentration im Vollblut	55
22	Prozentuale Serumkonzentration von C3	56
23	Prozentuale Serumkonzentration von C4	57
24	Serumkonzentration der Anti-Pig-Antikörper	58
25	Serumkonzentration der Anti-Gal α 1-3Gal-Immunglobuline M	59
26	Serumkonzentration der Anti-Gal α 1-3Gal-Immunglobuline G	60
27	CD11b positive Zellen	61

28	Makroskopische Aufnahme eines explantierten Schweineherzens vor ex vivo-Perfusion	62
29	Makroskopische Aufnahme eines Schweineherzens nach Xenoperfusion mit humanem Blut	62
30	Landrasse ohne Tirofiban. Fibrin [10x]	63
31	Landrasse mit Tirofiban. Fibrin [10x]	64
32	hDAF mit Tirofiban. Fibrin [10x]	65
33	Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen und den alternativen Weg mit Hemmung der C3-Konvertase durch hDAF	91
Tabelle 1	Versuche mit humanen Transplantatempfängern	9

3. Literaturverzeichnis

- [1] Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS
Immunologie
Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle, 1996
- [2] Allgemeines Krankenhaus Wien
www.akh-wien.ac.at/biomed-research/htx/anatomy.htm
www.akh-wien.ac.at/biomed-research/htx/biochem.htm
- [3] Al-Mohanna F, Collinson K, Parhar R, Kwaasi A, Meyer B, Saleh S, Allen S, Al-Sedairy S, Stern D, Yacoub M
Activation of naive xenogeneic but not allogeneic endothelial cells by human naive neutrophils
Am J Pathol 1997, 151: 111 – 120
- [4] Alwayn IPJ, Appel JZ III, Geopfert C, Buhler L, Cooper DKC, Robson SC
Inhibition of platelet aggregation in baboons: Therapeutic implications for Xenotransplantation
Xenotransplantation 2000, 7: 247 – 257
- [5] d'Apice AJF
Is xenotransplantation of vascularized organs just too hard?
Xenotransplantation 2006, 13: 182 – 185
- [6] Armstrong PW
Unsticking platelets : The role of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade
Can Med Assoc J 1999, 161: 1423 – 1424
- [7] Atkinson JP, Oglesby TJ, White D, Adams EA, Liszewski MK
Separation of self from non-self in the complement system : a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor
Clin Exp Immunol 1991, 86: S27 – 30
- [8] Awtry EH, Loscalzo J
Aspirin
Circulation 2000, 101: 1206 – 1218
- [9] Bach FH, Robson SC, Ferran C, Winkler H, Millan MT, Stuhlmeier KM, Vanhove B, Blakely ML, van der Werf WJ, Hofer E, de Martin R, Hancock WW
Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection
Immunol Rev 1994, 141: 5 – 30

- [10] Bach FH, Robson SC, Winkler H, Ferran C, Stuhlmeier KM, Wrighton CJ, Hancock WW
Barriers to xenotransplantation
Nat Med 1995, 1: 869 – 873
- [11] Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC
Delayed xenograft rejection
Immunol Today 1996, 17: 379 – 384
- [12] Baldwin WM III., Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F
Complement in organ transplantation
Transplantation 1995, 59: 797 – 808
- [13] Banz Y, Rieben R
Endothelial cell protection in xenotransplantation: looking after a key player in rejection
Xenotransplantation 2006, 13: 19 – 30
- [14] Barak M, Katz Y
Microbubbles
Pathophysiology and clinical implications
Chest 2005, 128: 2918 – 2932
- [15] Barlage S, Wimmer A, Pfeiffer A, Rothe G, Schmitz G
MK-383 (Tirofiban) induces a GPIIb/IIIa receptor conformation which differs from the resting
and activated receptor
Platelets 2002, 13:133 – 140
- [16] Basker M, Buhler L, Alwayn IP, Appel JZ 3rd, Cooper DK
Pharmacotherapeutic agents in xenotransplantation
Expert Opin Pharmacother 2000, 1: 757 – 769
- [17] Bauer A, Baschnegger H, Abicht JM, Brandl U, Brenner P, Thein E, Hammer C, Reichart B,
Peter K, Schmoeckel M, Christ F
hDAF porcine cardiac xenograft maintains cardiac output after orthotopic transplantation into
baboon – a perioperative study
Xenotransplantation 2005, 12: 444 – 449
- [18] Becker RC
Thrombosis and the role of the platelet
Am J Cardiol 1999, 83: 3E – 6E

- [19] Blakely ML, van der Werf WJ, Berndt MC, Dalmasso AP, Bach FH, Hancock WW
Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection
Transplantation 1994, 58: 1059 – 1066
- [20] Boulday G, Hamann, Souillou J-P, Charreau B
CD97-decay-accelerating factor interaction is not involved in leukocyte adhesion to endothelial cells
Transplantation 2002, 73: 429 – 436
- [21] Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, Bittmann I, Rössle M, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B
Administration of GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model
Xenotransplantation 2005, 12: 134 – 141
- [22] Brenner P, Hinz M, Huber H, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Meiser B, Hammer C, Reichart B
Influence of ischemic time on hyperacute xenograft rejection of pig hearts in a working heart perfusion model with human blood
Transpl Int 2000, 13: S494 – S503
- [23] Budrikis A, Liao Q, Bolys R, Westerlaken B, Steen S
Effects of cardioplegic flushing, storage and reperfusion on coronary circulation in the pig
Ann Thorac Surg 1999, 67: 1345 – 1349
- [24] Bühler L, Basker M, Alwayn IPJ, Goepfert C, Kitamura H, Kawai T, Gojo S, Kozlowski T, Ierino FL, Awwad M, Sachs DH, Sackstein R, Robson SC, Cooper DKC
Coagulation and thrombotic disorders associated with pig organ and hematopoietic cell transplantation in nonhuman primates
Transplantation 2000, 70: 1323 – 1331
- [25] Bustos M, Saadi S, Platt JL
Platelet-mediated activation of endothelial cells: Implications for the pathogenesis of transplant rejection
Transplantation 2001, 72: 509 – 515
- [26] Cairns T, Lee J, Goldberg L, Cook T, Simpson P, Spackman D, Palmer A, Taube D
Inhibition of the pig to human xenograft rejection, using soluble Gal α 1-3Gal and Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc
Transplantation 1995, 60: 1202 – 1207

- [27] Calne RY
Organ transplantation between widely disparate species
Transplant Proc 1970, 2: 550 – 553
- [28] Calne RY Sir
Commentary
Xenografting – the future of transplantation, and always will be?
Xenotransplantation 2005, 12: 5 – 6
- [29] Candinas D, Lesnikoski BA, Hancock WW, Otsu I, Koyamada N, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH
Inhibition of platelet integrin GPIIb/IIIa prolongs survival of discordant cardiac xenografts
Transplantation 1996, 62: 1 – 5
- [30] Cannon CP
Oral platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors – part I
Clin Cardiol 2003, 26: 358 – 364
- [31] Cannon CP
Oral platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors – part II
Clin Cardiol 2003, 26: 401 – 406
- [32] Cardozo LAM, Rouw DB, Ambrose LR, Midulla M, Florey O, Haskard DO, Warrens AN
The neutrophil: the unnoticed threat in xenotransplantation?
Transplantation 2004, 78: 1721 – 1728
- [33] Cascalho M, Platt JL
The immunological barrier to xenotransplantation
Immunity 2001, 14: 437 – 446
- [34] Cascalho M, Platt JL
New technologies for organ replacement and augmentation
Mayo Clin Proc 2005, 80: 370 – 378
- [35] Chen RH, Kadner A, Mitchell RN, Santerre DH, Adams DH
 α -Gal and β -Gal are preferentially expressed on porcine cardiac microvasculature endothelium
Transplant Proc 2000, 32: 877 – 878

- [36] Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA
A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoprotein IIb and/or IIIa
J Clin Invest 1983, 72: 325 – 338
- [37] Collier BS
Platelets and thrombolytic therapy
N Engl J Med 1990, 322: 33 – 42
- [38] Collier BS
Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy
Circulation 1995, 92: 2373 – 2380
- [39] Collier BS
Platelet GPIIb/IIIa antagonists: The first anti-integrin receptor therapeutics
J Clin Invest 1997, 99: 1467 – 1471
- [40] Cooke SP, Hederer RA, Pearson JD, Savage COS
Characterization of human IgG-binding xenoantigens expressed by porcine aortic endothelial cells
Transplantation 1995, 60: 1274 – 1284
- [41] Cooke DT, Caffarelli AD, Robbins RC
The road to clinical Xenotransplantation: a worthwhile journey
Transplantation 2004, 78: 1108 – 1109
- [42] Cooper DKC, Keogh AM, Brink J, Corris PA, Klepetko W, Pierson RN, Schmoeckel M, Shirakura R, Warner Stevenson L
Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation: The present status of xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases
J Heart Lung Transplant 2000, 19: 1125 – 1165
- [43] Cozzi E, White DJG
The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans
Nat Med 1995, 1: 964 – 966

- [44] Cozzi E, Yannoutsos N, Langford GA, Pino-Chavez G, Wallwork J, White DJG
Effect of transgenic expression of human decay-accelerating factor on the inhibition of hyperacute rejection of pig organs, 665 – 682
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [45] Cozzi E, Tucker AW, Langford GA, Pino-Chavez G, Wright L, O`Connell MJ, Young VJ, Lancaster R, McLaughlin M, Hunt K, Bordin MC, White DJG
Characterization of pigs transgenic for human decay-accelerating factor
Transplantation 1997, 64: 1383 – 1392
- [46] Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH
Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure
J Anat 1998, 193: 105 – 119
- [47] Cruzado JM, Torras J, Riera M, Condom E, Lloberas N, Herrero I, Martorell J, Grinyo JM
Effect of human natural xenoantibody depletion and complement inactivation on early pig kidney function
Exp Nephrol 1999, 7: 217 – 228
- [48] Czaplicki J, Blońska B, Religa Z
The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human
J Heart Lung Transplant 1992, 11: 393 – 396
- [49] Dalmaso AP
Role of complement in xenograft rejection, 40 – 60
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [50] Day JR, Malik IS, Weerasinghe A, Poullis M, Nadra I, Haskard DO, Taylor KM, Landis RC
Distinct yet complementary mechanisms of heparin and glycoprotein IIb/IIIa inhibitors on platelet activation and aggregation: Implications for Restenosis during percutaneous coronary intervention
Heart 2004, 90: 794 – 799
- [51] DeFily DV
Control of microvascular resistance in physiological conditions and reperfusion
J Mol Cell Cardiol 1998, 30: 547 – 554

- [52] Deschamps J-Y, Roux FA, Saï P, Gouin E
History of Xenotransplantation
Xenotransplantation 2005, 12: 91 – 109
- [53] Deutsche Stiftung Organtransplantation
www.dso.de/transplantationsgesetz/einfuehrung/main_bottom.html
www.dso.de/grafiken/g44.html
www.dso.de/grafiken/g97.html
- [54] Dobson J, Dark J
The physiology of xenotransplantation
Document 28353
Department of Health Publications, London, 2002
- [55] Dooldeniya MD, Warrens AN
Xenotransplantation: where are we today?
J R Soc Med 2003, 96: 111 – 117
- [56] Duncker DJ, Bache RJ
Regulation of coronary vasomotor tone under normal conditions and during acute myocardial hypoperfusion
Pharmacol Ther 2000, 86: 87 – 110
- [57] Eurotransplant
www.eurotransplant.nl/files/statistics/snap2.gif
- [58] Fachinformation
www.wuv-gmbh.de
- [59] Fecke W, Long J, Richards A, Harrison R
Protection of hDAF-transgenic porcine endothelial cells against activation by human complement: Role of the membrane attack complex
Xenotransplantation 2002, 9: 97 – 105
- [60] Ferguson JJ, Kereiakes DJ, Adgey AAJ, Fox KAA, Hillegass WB Jr., Pfisterer M, Vassanelli C
Safe use of platelet GP IIb/IIIa inhibitors
Eur Heart J 1998, 19: D40 – D51

- [61] Fishman JA
Miniature swine as organ donors for man: Strategies for prevention of xenotransplant-associated infections
Xenotransplantation 1994, 1: 47 – 57
- [62] Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, Knight JW, Velander W, Squinto SP
Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection
Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91: 11153 – 11157
- [63] Forty J, White DGJ, Wallwork J
A technique for perfusion of an isolated working heart to investigate hyperacute discordant xenograft rejection
J Thorac Cardiovasc Surg 1993, 106: 308 – 316
- [64] Forty J, White DJG, Wallwork J
Activation of the alternative pathway of complement in hyperacute xenograft rejection of rabbit hearts by human blood
J Heart Lung Transplant 1993, 12: 283 – 287
- [65] Freedman JE
Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis
Circulation 2005, 112: 2725 – 2734
- [66] Fujita T, Inoue T, Ogawa K, Iida K, Tamura N
The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF)
J Exp Med 1987, 166: 1221 – 1228
- [67] Fullard JF
The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and hemostasis
Curr Pharm Des 2004, 10: 1567 – 1576
- [68] Gaca JG, Leshner A, Aksoy O, Ruggeri ZM, Parker W, Duane DR
The role of the porcine von Willebrand factor: Baboon platelet interactions in pulmonary xenotransplantation
Transplantation 2002, 74: 1596 – 1603
- [69] Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I
A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity
J Exp Med 1984, 160: 1519 – 1531

- [70] Galili U
The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy
Immunol Cell Biol 2005, 83: 674 – 686
- [71] Gambiez L, Salame E, Chereau C, Calmus Y, Cardoso J, Ayani E, Houssin D, Weill B
The role of natural IgM in the hyperacute rejection of discordant heart xenografts
Transplantation 1992, 54: 577 – 583
- [72] Gammie JS, Ildstad ST
Chimerism and tolerance as an approach to xenotransplantation, 519 – 529
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [73] Garry DJ, Goetsch SC, McGrath AJ, Mammen PAP
Alternative therapies for orthotopic heart transplantation
Am J Med Sci 2005, 330: 88 – 101
- [74] George JF
Xenotransplantation: an ethical dilemma
Curr Opin Cardiol 2006, 21: 138 – 141
- [75] Gewurz H, Clark DS, Cooper MD, Varco RI, Good RA
Effect of cobra venom-induced inhibition of complement activity on allograft and xenograft rejection reactions
Transplantation 1967, 5: 1296 – 1303
- [76] Goddard MJ, Dunning J, Horsley J, Atkinson C, Pino-Chavez G, Wallwork J
Histopathology of cardiac xenograft rejection in the pig-to-baboon model
J Heart Lung Transplant 2002, 21: 474 – 484
- [77] Gollackner B, Goh SK, Qawi I, Buhler L, Knosalla C, Daniel S, Kaczmarek E, Awwad M, Cooper DKC, Robson SC
Acute vascular rejection of xenografts: roles of natural and elicited xenoreactive antibodies in activation of vascular endothelial cells and induction of procoagulant activity
Transplantation 2004, 77: 1735 – 1741

- [78] Goodman DJ, Millan MT, Ferran C, Bach FH
Mechanisms of delayed xenograft rejection, 77 – 95
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [79] Hammer C
Evolution: Its complexity and impact on xenotransplantation, 716 – 735
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [80] Hammer C, Linke R, Wagner F, Diefenbeck M
Organs from animals for man
Int Arch Allergy Immunol 1998, 166: 5 – 21
- [81] Hancock WW
Delayed xenograft rejection
World J Surg 1997, 21: 917 – 923
- [82] Hancock WW
Immunopathology of discordant xenograft rejection, 303 – 313
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [83] Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ
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 1989, 264: 9053 – 9060
- [84] Hearse DJ, Maxwell L, Saldanha C, Gavin JB
The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection
J Mol Cell Cardiol 1993, 25: 759 – 800
- [85] Heusch G, Schulz R, Baumgart D, Haude M, Erbel M
Coronary microembolisation
Prog Cardiovasc Dis 2001, 44: 217 – 230

- [86] Heusch G, Schulz R, Haude M, Erbel M
Coronary microembolisation
J Mol Cell Cardiol 2004, 37: 23 – 31
- [87] Hoopes CW, Platt JL
Molecular strategies for clinical xenotransplantation in cardiothoracic surgery
Sem Thorac Cardiovasc Surg 1996, 8: 156 – 174
- [88] Hoppe JD, Sewing KF
Stellungnahme des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer zur
Xenotransplantation
Dtsch Arztebl 1999, 28 – 29: A-1920 – A-1926
- [89] Hori M, Inoue M, Kitakaze M, Koretsune Y, Iwai K, Tamai J, Ito H, Kitabatake A, Sato T,
Kamada T
Role of adenosine in hyperaemic response of coronary blood flow in microcirculation
Am J Physiol 1986, 250: H509 – H518
- [90] Huber K
Tirofiban (Aggrastat®) – ein Überblick über die derzeitige Publikations – und Studienlage
J Kardiol 2000, 7: 84 – 87
- [91] Hunt BJ, Jurd KM
Hemostasis in xenotransplantation, 126 – 139
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [92] Ierino FL, Kozlowski T, Siegel JB, Shimizu A, Colvin RB, Banerjee PT, Cooper DKC, Cosimi
AB Bach FH, Sachs DH, Robson SC
Disseminated intravascular coagulation in association with the delayed rejection of pig-to-
baboon renal xenograft
Transplantation 1998, 66: 1439 – 1450
- [93] International Society for Heart and Lung Transplantation
www.ishlt.org/downloadables/heart_adult.ppt
- [94] Janvier G, Baquey C, Roth C, Benillan N, Bélisle S, Hardy J-F
Extracorporeal circulation, hemocompatibility and biomaterials
Ann Thorac Surg 1996, 62: 1926 – 1934

- [95] Johnston PS, Wang MW, Lim SML, Wright LJ, White DJG
Discordant xenograft rejection in an antibody-free model
Transplantation 1992, 54: 573 – 576
- [96] Knosalla C, Gollackner B, Bühler L, Mueller NJ, Houser S, Mauiyyedi S, Sachs Dh, Robson SC, Fishman J, Schuurman H-J, Awwad M, Cooper DKC
Correlation of biochemical and haematological changes with graft failure following pig heart and kidney transplantation in baboons
Am J Transplant 2003, 3: 1510 – 1519
- [97] Kopp CW, Siegel JB, Hancock WW, Anrather J, Winkler H, Geczy CL, Kaczmarek E, Bach FH, Robson SC
Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors
Transplantation 1997, 63: 749 – 758
- [98] Kozlowski T, Shimizu A, Lambrechts D, Yamada K, Fuchimoto Y, Glaser R, Monroy R, Xu Y, Awwad M, Colvin RB, Cosimi AB, Robson SC, Fishman J, Spitzer TR, Cooper DKC, Sachs DH
Porcine kidney and heart transplantation in baboons undergoing a tolerance induction regime and antibody absorption
Transplantation 1999, 67: 18 – 30
- [99] Kupatt C, Habazettl H, Hanusch P, Wichels R, Hahnel D, Becker BF, Boekstegers P
c7E3Fab reduces postischemic leukocyte-thrombocyte interaction mediated by fibrinogen
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000, 20: 2226 – 2232
- [100] Labarrere CA, Nelson DR, Spear KL
Non-immunologic vascular failure of the transplanted heart
J Heart Lung Transplant 2003, 22: 236 – 240
- [101] Langford GA, Yannoutsos N, Cozzi E, Lancaster R, Elsome K, Chen P, Richards A, White DJG
Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor
Transplant Proc 1994, 26: 1400 – 1401
- [102] Lawson JH, Daniels LJ, Platt JL
The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation
Transplant Proc 1997, 29: 884 – 885

- [103] Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ
Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine
N Engl J Med 1995, 332: 1553 – 1559
- [104] Leor J, Battler A, Kloner RA, Etzion S
Reprogramming cells for transplantation
Heart Fail Rev 2003, 8: 285 – 292
- [105] Lesnikoski BA, Candinas D, Hancock WW, Otsu I, Siegel J, Bach FH, Robson SC
Inhibition of platelet GPIIb/IIIa prolongs survival of discordant cardiac xenografts
Transplant Proc 1996, 28: 703
- [106] Leventhal JR, Matas AJ, Sun LH, Reif S, Bolman RM III, Dalmaso AP, Platt JL
The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model
Transplantation 1993, 56: 1 – 8
- [107] Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, Diamond LE, Lawson JH, Hoopes CW, Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Harland RC, Davis RD, Bollinger RR, Logan JS, Platt JL
The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants
J Clin Invest 1998, 101: 1745 – 1756
- [108] Makowka L, Wu GD, Hoffman A, Podesta L, Sher L, Tuso PJ, Breda M, Chapman FA, Cosenza C, Yasunaga C, Cramer DV
Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig-to-human liver xenograft
Transplant Proc 1994, 26: 1074 – 1075
- [109] Marguerie GA, Plow EF, Edgington TS
Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen
J Biol Chem 1979, 254: 5357 – 5363
- [110] Marsh HC, Ryan US
Therapeutic effect of soluble complement receptor type 1 in xenotransplantation,
437 – 455
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [111] McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, Platt JL
Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury
Nat Med 1995, 1: 423 – 427

- [112] McGregor CGA, Davies WR, Oi K, Teotia SS, Schirmer JM, Risdahl JM, Tazelaar HD, Kremers WK, Walker RC, Byrne GW, Logan JS
Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival
J Thorac Cardiovasc Surg 2005, 130: 844 – 851
- [113] McVey JH
Tissue factor pathway
Baillieres Clin Haematol 1994, 7: 469 – 484
- [114] Merkus D, Chilian WM, Stepp DW
Functional characteristics of the coronary microcirculation
Herz 1999, 24: 496 – 508
- [115] Miyagawa S, Hirose H, Shirakura R, Naka Y, Nakata S, Kawashima Y, Seya T, Matsumoto M, Uenaka A, Kitamura H
The mechanism of discordant xenograft rejection
Transplantation 1988, 46: 825 – 830
- [116] Mollnes TE, Fiene AE
Perspectives on complement in xenotransplantation
Mol Immunol 2003, 40 : 135 – 143
- [117] Nagayasu T, Saadi S, Holzknrecht RA, Plummer TB, Platt JL
Expression of tissue factor mRNA in cardiac xenografts: Clues to the pathogenesis of acute vascular rejection
Transplantation 2000, 69: 475 – 482
- [118] Neumann F-J, Blasini R, Schmitt C, Alt E, Dirschinger J, Gawaz M, Kastrati A, Schömig A
Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on recovery of coronary flow and left ventricular function after placement of coronary-artery stents in acute myocardial infarction
Circulation 1998, 98: 2695 – 2701
- [119] Niemann H, Meinecke B
Embryonentransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren
Enke, Stuttgart, 1993
- [120] Nishijima K, Kiryu J, Tsujikawa A, Miyamoto K, Honjo M, Tanihara H, Nonaka A, Yamashiro K, Katsuta H, Miyahara S, Honda Y, Ogura Y
Platelets adhering to the vascular wall mediate postischemic leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation
Invest Ophthalmol Vis Sci 2004, 45: 977 – 984

- [121] Ogata K, Platt JL
Potential applications and prospects for cardiac xenotransplantation
J Heart Lung Transplant 2004, 23: 515 – 526
- [122] Otte, KE, Steinbrüchel D, Kain H, Kemp E
Xenoperfusion experiments are suitable for xenotransplantation research
Transplant Proc 1992, 24: 449 – 450
- [123] Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, The XEN 111 Study Group, Otto E
Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue
Science 1999, 285: 1236 – 1241
- [124] Pareti FI, Mazzucato M, Bottini E, Mannucci M
Interaction of porcine von Willebrand factor with the platelet glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex
Brit J Haematol 1992, 82: 81 – 86
- [125] Parker W, Bruno D, Holzknrecht ZE, Platt JL
Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies
J Immunol 1994, 153: 3791 – 3803
- [126] Parker W, Saadi S, Lin SS, Holzknrecht E, Bustos M, Platt JL
Transplantation of discordant xenografts: a challenge revisited
Immunol Today 1996, 17: 373 – 378
- [127] Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA
Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs
Nat Med 1997, 3: 282 – 286
- [128] Peerschke EIB
The platelet fibrinogen receptor
Semin Hematol 1985, 22: 241 – 259
- [129] Peerschke EIB, Reid KBM, Ghebrehiwet B
Platelet activation by C1q results in the induction of α_{IIb}/β_3 integrins (GPIIb-IIIa) and the expression of P-selectin and procoagulant activity
J Exp Med 1993, 178: 579 – 587

- [130] Pham MX, Hunt SA, Johnson FL
Cardiac xenotransplantation
Coron Artery Dis 2004, 15: 99 – 105
- [131] Pino-Chavez G, Cary N, Young V, Cozzi E, Horsley J, Langford G, White DJG
The effect of h-DAF expression on endothelial cell activation of porcine xenografts
Transplant Proc 1996, 28: 590 – 591
- [132] Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, Oegema TR Jr., Bach FH, Dalmaso AP
Release of heparan sulfate from endothelial cells
J Exp Med 1990, 171: 1363 – 1368
- [133] Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH
Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model
Transplantation 1991, 52: 214 – 220
- [134] Platt JL
Hyperacute Xenograft Rejection, 8 – 17
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [135] Platt JL, Logan JS
Use of transgenic animals as xenotransplant donors, 650 – 658
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [136] Pober JS, Cotran RS
The role of endothelial cells in inflammation
Transplantation 1990, 50: 537 – 544
- [137] PRISM-PLUS
The platelet receptor inhibition in ischemic syndrome management in patients limited by
unstable signs and symptoms study investigators
Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with Tirofiban in unstable angina and
non-Q-wave myocardial infarction
N Engl J Med 1998, 338: 1488 – 1497

- [138] Ramirez P, Chavez R, Majado M, Munitiz V, Munoz A, Hernandez Q, Palenciano C, Pino-Cavez G, Loba M, Minguela A, Yelamos J, Gago MR, Vizcaino AS, Asensi H, Cayuela MG, Segura B, Marin F, Rubio A, Fuente T, Robles R, Bueno FS, Sansano T, Acosta F, Rodriguez JM, Navarro F, Cabezuelo J, Cozzi E, White DJG, Calne RY, Parrilla P
Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days
Transplantation 2000, 70: 989 – 998
- [139] RESTORE
The randomized efficacy study of Tirofiban for outcomes and restenosis investigators
Effects of platelet Glycoprotein IIb/IIIa blockade with Tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty
Circulation 1997, 96: 1445 – 1453
- [140] Robbins RC, Mitchell ME, Sachs DH, Clark RE
Human plasma causes rapid dysfunction in ex vivo pig hearts
J Heart Lung Transplant 1994, 13: 877 – 881
- [141] Robson SC, Candinas D, Hancock WW, Wrighton C, Winkler H, Bach FH
Role of endothelial cells in transplantation
Int Arch Allergy Immunol 1995, 106: 305 – 322
- [142] Robson SC, Schulte am Esch J 2nd, Bach FH
Factors in xenograft rejection
Ann N Y Acad Sci 1999, 875: 261 – 276
- [143] Robson SC, Cooper DKC, d'Apice AJF
Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation
Xenotransplantation 2000, 7: 166 – 176
- [144] Rollins SA, Matis LA
Cellular interactions in discordant xenotransplantation, 190 – 198
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [145] Romanella M, Aminian A, Adam WR, Pearse MJ, d'Apice AJF
Involvement of both the classical and alternative pathways of complement in an ex vivo model of xenograft rejection
Transplantation 1997, 63: 1021 – 1025

- [146] Rose AG
Histopathology of cardiac xenograft rejection, 255 – 272
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [147] Rose AG, Cooper DKC
Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection
Xenotransplantation 2000, 7: 31 – 41
- [148] Rosengard AM, Cary NRB, Langford GA, Tucker A, Wallwork J, White DJG
Tissue expression of human complement inhibitor, decay accelerating factor, in transgenic pigs
Transplantation 1995, 59: 1325 – 1333
- [149] Ruggeri ZM
Mechanisms initiating platelet thrombus formation
Thromb Haemost 1997, 78: 611 – 616
- [150] Saadi S, Platt JL
Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement
J Exp Med 1995, 181: 21 – 31
- [151] Saadi S, Takahashi T, Holzknacht RA, Platt JL
Pathways to acute humoral rejection
Am J Pathol 2004, 164: 1073 – 1080
- [152] Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IFC
Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(α 1-3)Gal epitopes
Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 11391 – 11395
- [153] Scarborough RM, Kleiman NS, Phillips DR
Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists
What are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use?
Circulation 1999, 100: 437 – 444
- [154] Schmidt W
www.aerzte-gegen-tierversuche.tierrechte.de/textversion/content/de/spezielles/xenotransplantation.php4

- [155] Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Young VK, Chavez G, Kasper-König W, White DJG, Müller-Höcker J, Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Hammer C, Reichart B
Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts
Transplantation 1996, 62: 729 – 734
- [156] Schmoeckel M, Bhatti FNK, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MJ, Goddard M, Warner RG, Langford GA, Dunning JJ, Wallwork J, White DJG
Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model
Transplantation 1998, 65: 1570 – 1577
- [157] Schmoeckel JM
Xenotransplantation hDAF-transgener Schweineherzen: Untersuchungen ex vivo und im Primatenmodell
Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Riga, Rom, Wien, Zagreb, 2000
- [158] Schmugge M, Rand ML, Freedman J
Platelets and von Willebrand factor
Transfus Apher Sci 2003, 28: 269 – 277
- [159] Schrör K, Weber A-A
Comparative pharmacology of GPIIb/IIIa antagonists
J Thromb Thrombolysis 2003, 15: 71 – 80
- [160] Schuurman H-J, Cheng J, Lam T
Pathology of xenograft rejection: a commentary
Xenotransplantation 2003, 10: 293 – 299
- [161] Shlansky-Goldberg R
Platelet aggregation inhibitors for use in peripheral vascular interventions: What can we learn from the experience in the coronary arteries?
J Vasc Interv Radiol 2002, 13: 229 – 246
- [162] Sims PJ, Wiedmer T
The response of human platelets to activated components of the complement system
Immunol Today 1991, 12: 338 – 342
- [163] Soin B, Friend PJ
Physiological aspects of xenotransplantation
Transplant Rev 2001, 15: 200 – 209

- [164] Spycher MO, Nydegger UE
Participation of the blood platelet in immune reactions due to platelet-complement interaction
Infusionsther Transfusionsmed 1995, 22: 36 – 43
- [165] Squinto SP, Fodor WL
Engineering of xenografts to provide organs for human transplantation, 659 – 664
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.)
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [166] Stouffer GA, Smyth SS
Effects of thrombin on interactions between β_3 -integrins and extracellular matrix in platelets
and vascular cells
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003, 23: 1971 – 1978
- [167] Suckfüll MM, Pieske O, Müdsam M, Babic R, Hammer C
The contribution of endothelial cells to hyperacute rejection in xenogeneic perfused working
hearts
Transplantation 1994, 57: 262 – 267
- [168] Sykes M, d'Apice A, Sandrin M
THE ETHICS OF XENOTRANSPLANTATION
Position Paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association
Xenotransplantation 2003, 10: 194 – 203
- [169] Taniguchi S, Cooper DKC
Clinical xenotransplantation – A brief review of the world experience
in: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG (Eds.), 776 – 784
Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [170] Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Deng MC, Keck BM, Hertz MI
Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-second official
adult heart transplant report – 2005
J Heart Lung Transplant 2005, 24: 945 – 955
- [171] Tchong JE
Clinical challenges of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor therapy: Bleeding,
reversal, thrombocytopenia, and retreatment
Am Heart J 2000, 139: S38 – S45

- [172] Tedesco F, Fischetti F, Pausa M, Dobrina A, Sim RB, Daha MR
Complement-endothelial cell interactions: Pathophysiological implications
Mol Immunol 1999 36: 261 – 268
- [173] Thein E, Hammer C
Physiologic barriers to xenotransplantation
Curr Opin Organ Transplant 2004, 9: 186 – 189
- [174] Vallés J, Santos MT, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Pinòn M, Broekman MJ, Marcus AJ
Platelet-erythrocyte interactions enhance $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment by aspirin ex vivo
Blood 2002, 99: 3978 – 3984
- [175] Van den Berg CW, Morgan BP
Understanding the immune protection afforded by endogenous complement regulatory molecules
Graft 2001, 4: 63 – 65
- [176] Vercellotti, GM, Platt JL, Bach FH, Dalmaso AP
Neutrophil adhesion to xenogeneic endothelium via iC3b
J Immunol 1991, 146: 730 – 734
- [177] Vial CM, Ostlie MD, Bhatti FRCS, Cozzi E, Goddard M, Pino-Chavez G, Wallwork J, White DJG, Dunning JJ
Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon
J Heart Lung Transplant 2000, 19 : 224 – 229
- [178] Vodička P, Smetana K Jr, Dvořánková B, Emerick T, Xu Y, Ourednik J, Ourednik V, Motlík J
The miniature pig as an animal model in biomedical research
Ann N Y Acad Sci 2005, 1049: 161 – 171
- [179] Vorchheimer DA, Becker R
Platelets in atherothrombosis
Mayo Clin Proc 2006, 81: 59 – 68

4. Publikationen

- Publikationen
- Brandl U, Michel S, Erhardt M, **Joeckle H**, Brenner P, Burdorf L, Bauer A, Baschnegger H, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Hammer C, Thein E, Reichart B, Schmoeckel M
Prolonged survival after preclinical orthotopic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation using a moderate immunosuppression
Xenotransplantation: submitted
- Brandl U, **Joeckle H**, Erhardt M, Michel S, Burdorf L, Brenner P, Bittmann I, Roessle M, Moedstein V, Hammer C, Thein E, Reichart B, Schmoeckel M
Reduced fibrin deposition and intravascular thrombosis in hDAF transgenic pig hearts perfused with tirofiban
Transplantation: accepted
- Brandl U, Erhardt M, Michel S, **Joeckle H**, Burdorf L, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Brenner P, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M
Soluble Gal α (1,3)Gal conjugate combined with hDAF preserves morphology and improves function of cardiac xenografts
Xenotransplantation 2007, 14: 323 – 332
- Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, Burdorf L, **Joeckle H**, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M
Transgenic animals in experimental xenotransplantation models: orthotopic heart transplantation in the pig-to-baboon model
Transplant Proc 2007, 39: 577 – 578

Brandl U, Erhardt M, **Joeckle H**, Michel S, Thein E, Bittmann I, Brenner P, Burdorf L, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B
Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in hyperacutely rejected nontransgenic and hDAF pig hearts
Transplant Proc 2006, 38: 733 – 734

Brandl U, Erhardt M, **Joeckle H**, Michel S, Brenner P, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Hammer C, Schmeockel M, Reichart B
Combining the hDAF transgene with the GP IIb/IIIa inhibitor Tirofiban improves heart performance and reduces myocardial damage following hyperacute rejection in an ex vivo perfusion model
Transplant Proc 2005, 37: 491 – 492

Abstracts

Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, Burdorf L, **Joeckle H**, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Thein E, Reichart B, Schmoeckel M
Cardiac Xenotransplantation in the Orthotopic Pig-to-Baboon Model.
Thorac and Cardiovasc Surg: submitted

Brandl U, Erhardt M, Michel S, Thein E, **Joeckle H**, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B
Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in non-transgenic and hDAF pig hearts perfused with human blood and GAS914 or tirofiban
Xenotransplantation 2005; 12: 416

Brandl U, Erhardt M, Michel S, Thein E, Bittmann I, Roessle M, **Joeckle H**, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B
Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in hyperacutely rejected non-transgenic and hDAF pig hearts
TxMed 2005 (Suppl II)

Brandl U, Erhardt M, Michel S, Thein E, **Joeckle H**, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B

Assessment of changes of regional blood flow in hyperacutely rejected hDAF transgenic and non-transgenic pig hearts by means of fluorescent microspheres

Thorac and Cardiovasc Surg 2005; 53 (Suppl 1)

Brandl U, Erhardt M, Michel S, **Joeckle H**, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart R

Effective and persistent depletion of both anti-Gal α (1,3)Gal IgM and IgG antibodies by GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model

Thorac and Cardiovasc Surg 2005; 53 (Suppl 1)

Brandl U, Erhardt M, **Joeckle H**, Michel S, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B

Effects of GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban in combination with the hDAF transgene on transplant survival in an ex-vivo pig heart perfusion model

2. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI), Berlin, 26.-27. März 2004, Charité-Universitätsmedizin Berlin: book of abstracts

Brandl U, Erhardt M, **Joeckle H**, Michel S, Brenner P, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B

Combining the hDAF transgene with the GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban improves heart performance and reduces myocardial damage following hyperacute rejection in an ex-vivo perfusion model

Transplantation 2004; 78 (Suppl 1): 573 – 574

Poster

Brandl U, Erhardt M, Michel S, Thein E, Bittmann I, Roessle M, **Joeckle H**, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B
Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in hyperacutely rejected non-transgenic and hDAF pig hearts
14. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG), Rostock, 22.-24. September 2005

Brandl U, Erhardt M, Michel S, Thein E, **Joeckle H**, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B
Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in non-transgenic and hDAF pig hearts perfused with human blood and GAS914 or tirofiban
Eighth International Association Xenotransplantation Congress, Göteborg, 10.-14. September 2005

Brandl U, Erhardt M, Michel S, Thein E, **Joeckle H**, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B
Assessment of changes of regional blood flow in hyperacutely rejected hDAF transgenic and non-transgenic pig hearts by means of fluorescent microspheres
34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Hamburg, 13.-16. Februar 2005

Brandl U, Erhardt M, Michel S, **Joeckle H**, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart R
Effective and persistent depletion of both anti-Gal α (13)Gal IgM and IgG by GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model
34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Hamburg, 13.-16. Februar 2005

Brandl U, Erhardt M, **Joeckle H**, Michel S, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B
Effects of GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban in combination with the hDAF transgene on transplant survival in an ex-vivo pig heart

perfusion model

2. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI), Berlin, 26.-27. März 2004, Charité-Universitätsmedizin Berlin

Brandl U, Erhardt M, **Joeckle H**, Michel S, Brenner P, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Hammer C, Schmeockel M, Reichart B

Combining the hDAF transgene with the GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban improves heart performance and reduces myocardial damage following hyperacute rejection in an ex-vivo perfusion model

XX. International Congress Of The Transplantation Society, Wien, 5.-10. September 2004

Zeitschriftenbeitrag Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, Burdorf L, **Joeckle H**, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Thein E, Schmoeckel M, Reichart B
XENOTRANSPLANTATION: Stand der Forschung am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München. MedReport zur 16. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Mainz, 11.-13. Oktober 2007

Vortrag Vortrag am Institut für chirurgische Forschung (ICF), Klinikum Großhadern, als Montagskolloquium am 19.01.2004

6. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei

- meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Bruno Reichart, Direktor der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München, für die Vergabe dieses Dissertationsthemas.
- meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Ulrike Brandl-Selvåg, Herzchirurgische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München, für die hervorragende Betreuung sowie für ihr enormes Engagement und ihre ausnahmslose Unterstützung, Anleitung und Präsenz.
- Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl und Herrn Prof. Dr. med. Alexander Baethmann für die freundliche Aufnahme als Doktorandin in das Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München.
- Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Claus Hammer vom Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München für seine humorvolle Unterstützung und Beratung, die von seiner langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der Xenotransplantation geprägt waren.
- Frau PD Dr. med. Iris Bittmann, Chefärztin des Institutes für Pathologie am Diakoniekrankenhauses Rothenburg (Wümmme), und ihren Mitarbeitern aus dem Institut für Pathologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München für die histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen und die kompetente Beratung.
- Herrn Dr. med. Peter Göhring aus dem Institut für Klinische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München für die klinisch-chemische Auswertung.
- Herrn Prof. Dr. med. Michael Schmoeckel, leitender Oberarzt der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum

Großhadern, München, für die Vermittlung der Doktorarbeit und seine Beratung während der Versuchsphase.

- Herrn Dr. med. vet. Eckart Thein, Frau Silvia Münzing, Herrn Dipl.-Phys. Dr. rer. nat. biol. Jürgen Peters und den vielen anderen Mitarbeitern des Institutes für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.
- Frau Antje Uhlig, Herzchirurgische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München, für die Bestimmung der Antikörper.
- und natürlich bei meinen Mitdoktoranden Matthias Erhardt und Sebastian Michel für die engagierte und tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen.