

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

**Abstoßungsdiagnostik bei heterotoper und orthotoper
Xenotransplantation von hDAF-transgenen Schweineherzen im
Primatenmodell mit perioperativer Immunadsorption**

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

Vorgelegt von
Cosmas Damian Wimmer
aus
Griesbach im Rottal
2008

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Fischereder
Prof. Dr. med. Alexander L. Gerbes

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

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Einleitung	6
1.1. Geschichte und Beweggründe für die Xenotransplantation.....	7
1.2. Xenogene Abstoßung im diskordanten Modell.....	10
1.2.1. Hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR).....	11
1.2.2. Verzögerte, vaskuläre Abstoßung (AVR).....	14
1.2.3. Akkomodation und zelluläre Abstoßung.....	16
1.3. Fragestellung	17
2. Material und Methodik.....	18
2.1. Xenogene Herztransplantation	18
2.1.1. Gruppen.....	18
2.1.2. Spendertiere.....	18
2.1.3. Empfängertiere	19
2.1.4. Präoperative Diagnostik	19
2.2. Heterotope xenogene Herztransplantation (hXHTx)	20
2.2.1. Spenderoperation.....	20
2.2.2. Transplantation am Empfänger	21
2.2.3. postoperatives Management.....	23
2.3. orthotop xenogene Herztransplantation (oXHTx).....	23
2.3.1. Spenderoperation.....	23
2.3.2. Empfängeroperation	23
2.3.3. Postoperatives Management und Untersuchungen	24
2.3.3.1. Anti-pig-Antikörperspiegel (a-p XNA) mittels Hämagglutinationstest.....	25
2.4. Therapie der Abstoßung	28
2.4.1. Medikamentös	28
2.4.2. Immunadsorption	29
2.5. Endpunkte der Studie	30
2.6. Obduktion.....	31
2.7. Histologie	32
2.7.1. Lichtmikroskopie	32
2.7.2. Elektronenmikroskopie	32
2.8. Statistik.....	33

3. Ergebnisse	33
3.1. Validierung der Abstoßungsreaktion im Schwein-Primaten- Modell.....	33
3.2. Heterotope Xenotransplantation von Landrasseschweineherzen auf Paviane mit peri- und postoperativer Immunadsorption (LR-h)	35
3.2.1. Überleben und Todesursache	35
3.2.2. Serumchemie	36
3.2.3. Histologie/ Immunhistochemie	37
3.3. Orthotope Xenotransplantation von Landrasseschweineherzen auf Paviane mit peri- und postoperativer Immunadsorption (LR-o)	39
3.3.1. Überleben und Todesursache	39
3.3.2. Serumchemie	40
3.3.3. Histologie/ Immunhistochemie	42
3.4. Heterotope Xenotransplantation von hDAF transgenen Schweinen auf Paviane mit peri- und postoperativer Immunadsorption (DAF-h)	45
3.4.1. Überleben und Todesursache	45
3.4.2. Serumchemie	45
3.4.3. Histologie/ Immunhistochemie	47
3.5. Orthotope Xenotransplantation von hDAF transgenen Schweinen auf Paviane ohne Immunadsorption (DAF-o)	51
3.5.1. Überleben und Todesursache	51
3.5.2. Serumchemie	53
3.5.3. Histologie/ Immunhistochemie	54
4. Diskussion	57
4.1. Evaluierung des Abstoßungsmodells	57
4.2. Therapieformen der xenogenen Abstoßung	59
4.2.1. Elimination präformierter Antikörper (XNA).....	59
4.2.2. Regulierung des Komplementsystems (C).....	60
4.3. Abstoßungsgeschehen nach xHTx im Landrasse-Modell.....	61
4.3.1. Abstoßung im heterotopen Landrasse Modell (LR-h) mit IA.....	61
4.3.2. Abstoßung im orthotopen Landrasse Modell (LR-o) mit IA	61
4.4. Aussagekraft des heterotopen und orthotopen Modell zum Abstoßungsgeschehen.....	62
4.5. Abstoßungsgeschehen von hDAF-transgenen Schweineherzen nach xHTx	65
4.5.1. Abstoßung im heterotopen hDAF-Modell (DAF-h)	66
4.5.2. Abstoßung im orthotopen hDAF-Modell (DAF-o).....	69

5. Schlussfolgerung	70
6. Literaturverzeichnis.....	73
7. Anhang	86
7.1. Abkürzungen	86
7.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	88
7.3. Publikationen.....	90
7.4. Dank	92
7.5. Lebenslauf	93

1. Einleitung

Die medizinischen Fortschritte des 20. Jahrhunderts ermöglichen der heutigen Medizin, Patienten mit terminalem Organversagen eine Heilung in Form einer Organtransplantation anzubieten. Alexis Carrel (Carrel 1902) legte hierfür mit der Entwicklung suffizienter Anastomosen von Gefäßen mittels Seidenfäden den ersten bedeutenden Grundstein. Die rasche Entwicklung aseptischer Operationsmethoden, das zunehmende Erkennen pathophysiologischer Abläufe (Gibson 1943, Billingham 1953) im Sinne chirurgischer Grundlagen und im Weiteren die Einführung immunsuppressiver Medikamente ließen die Organtransplantation heute zu einem festen Bestandteil der medizinischen Behandlung werden. Das Interesse an der Organverpflanzung beinhaltete, neben der Allotransplantation, also der Organverpflanzung innerhalb der gleichen Art, seit jeher auch Versuche der Xenotransplantation, mit der sich diese Arbeit hauptsächlich beschäftigt.

Dieser Begriff leitet sich aus dem griechischen Wort ξένος (fremd) und dem lateinischen *transplantare* (umsetzen) ab und beschreibt die Verpflanzung artfremden Gewebes in ein Individuum einer anderer Spezies. Im Falle, dass der Mensch der Empfänger ist, stammt das Organ also von einem Tier. Die von Calne (1970) geprägten Begriffe der konkordanten und diskordanten Xenotransplantation beschreiben, vereinfacht gesagt, die Verpflanzung zwischen phylogenetisch eng verwandten (z.B. Pavian-Mensch) und weit auseinanderstehenden Spezies (z.B. Schwein-Mensch).

Die frühen klinischen Erfolge der Organverpflanzung, beginnend mit der ersten erfolgreichen allogenen Nierentransplantation am Menschen 1954 durch Josef Murray am 23.12.1954 zwischen eineiigen Zwillingen (Murray 1955), führten jedoch rasch dazu, dass der Bedarf an Spendeorganen das mögliche Spenderpotential bei weitem überstieg. Zudem in einer Zeit, in welcher der Hirntod und damit die Grenzen der Leichenspende noch nicht definiert und festgelegt waren. Heute versterben in Deutschland jährlich rund 30% der Menschen, die ein lebenserhaltendes Organ wie Herz oder Lunge benötigen, auf der Warteliste. Nicht eingerechnet sind die Personen, die aufgrund der Verschlechterung Ihres Allgemeinzustandes und der daraus resultierenden Inoperabilität wieder von der Liste genommen wurden. Die Knappheit an Spenderorganen für diese Patienten verhindert auch, dass der Rahmen der Indikationsstellung erheblich erweitert werden könnte.

Dies führt auch weiterhin zu dem verstärkten Interesse an einer alten Wunschvorstellung des Menschen: sich (art-)fremder Eigenschaften zu bedienen.

1.1. Geschichte und Beweggründe für die Xenotransplantation

Schon seit jeher und quer durch alle Kulturen ist die mythische Verbindung von Mensch und Tier bekannt. Aus der griechischen Antike etwa sind uns Wesen wie der Centaur oder die Sphinx überliefert, die hinduistische Kultur verbindet Mensch und Elephant im Gott Ganesh. Eine der ersten schriftlichen Überlieferungen berichtet von der Versorgung einer Schädelverletzung eines russischen Adligen mit dem Kalottenfragment eines Hundes Ende des 17. Jahrhunderts. Gut 100 Jahre später berichtet die Britische Armee über die erfolgreiche Versorgung von Brandwunden mit Froschhaut. Meist wurden jedoch Misserfolge dokumentiert: Die Transfusion von Schafsblut in einen Hund endete den Berichten von Samuel Pepys 1666 zufolge in einem akuten Schockzustand, „das Herz war gefüllt mit geronnenem Blut, der Magen schwarz und blutig und alle Venen zum Platzen gefüllt“.

Nach zahlreichen weiteren Versuchen war die Übertragung vaskularisierter Organe jedoch erst Anfang des 20. Jahrhunderts mit der Entwicklung entsprechender chirurgischer Techniken möglich. Die allogene Transplantation von Hundenieren mittels Röhren und Ligaturen durch den Österreicher H. Ullman legte 1902 den Grundstein der experimentellen Organverpflanzung. Zusammen mit seinem Lehrer Mathieu Jaboulay entwickelte Alexis Carrel diese Technik weiter (Carrel 1902, Jaboulay 1906), indem er mit einer direkten Gefäßnaht eine dauerhafte und klinisch praktikable Anastomosierung schuf, er erhielt hierfür 1912 den Nobelpreis.

Erste klinische Erfolge in der Xenotransplantation erzielte ab 1963 Reemtsma et al. (Reemtsma 1964), der 12 Schimpansennieren in Menschen mit terminaler Niereninsuffizienz implantierte. Das am längsten überlebende Transplantat leistete über 9 Monate eine suffiziente Nierenfunktion, bis der Patient an den Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie verstarb. Auch Starzl et al. berichteten von 6 durchgeführten Nieren-Transplantationen vom Pavian auf den Menschen mit einer Organüberlebenszeit von 19 - 98 Tage (Starzl 1964). Ein weiterer klinischer Einsatz tierischer Organe bestand in der Durchführung einer heterologen ex vivo Leberperfusion, die zur Überbrückung eines akuten Leberversagens in knapp 50 Fällen erfolgreich eingesetzt wurde. (Eiseman 1965; Hume 1969). Obwohl die medikamentöse Therapie der Abstoßung mit Steroiden, 6-Mercaptopurin (Schwarz 1959) oder dem Prodrug Azathioprin (1961) zu dieser Zeit noch in den Kinderschuhen steckte, deuteten diese Erfolge auf das mögliche Potential der Xenotransplantation hin, wenngleich auch bei keinem Organ ein 1-Jahres-Überlebensfall erreicht werden konnte.

Das Interesse der Forschung an xenogenen Spendernieren nahm mit der zunehmenden Verfügbarkeit von Hämodialyse und der Akzeptanz des Hirntod-Modells jedoch in den folgenden Jahren ab.

Für das Herz hingegen hatte man keine derartigen Ersatzstrategien. Schon bald nach der Etablierung der Herztransplantation (HTx) überstieg der Bedarf an allogenen Spenderorganen das mögliche Angebot. So blieb die Notwendigkeit und das Interesse an der xenogenen Herztransplantation über die Jahre bestehen, wobei man die verschiedensten Tiere als Spender heranzog.

Vier Jahre vor der ersten erfolgreichen allogenen Herztransplantation durch Barnard (Barnard 1967), führte im Januar 1964 Hardy et al. die erste xenogene HTx eines Schimpansenherzens durch (Hardy 1964). Denton Cooley berichtete 1968 von einer orthotopen Implantation eines Schafherzens in einen 48-jährigen Mann mit terminaler Kardiomyopathie (Cooley 1968), Ross versuchte die unterstützende heterotope Implantation eines Schweineherzens, Marion versuchte nach erfolglosem Mitralklappenersatz bei einer jungen Frau eine Xenotransplantation eines Schimpansenherz (Marion 1969), beide Transplantate wurden jedoch innerhalb weniger Minuten nach Reperfusionbeginn abgestoßen.

Zur Kompensation des linksventrikulären Herzversagens bei einem Patienten nach Aortenklappenersatz pflanzte Barnard additiv ein Schimpansen- und ein Pavianherz in heterotoper Position ein. Beim Tode des Patienten durch Herzversagen nach 4 Tagen zeigte das unterstützende Organ histologisch Zeichen einer schweren Abstoßungsreaktion (Barnard 1977). Weltweites Aufsehen erregte die Transplantation eines ABO-inkompatiblen Pavianherzens in das "Baby Fae", das mit hypoplastischem Linksherzsyndrom zur Welt kam (Bailey 1985). Bei suffizienter Kreislauffunktion hielt es das Neugeborenen über 20 Tage am Leben. Bei der Sektion wies das xenogene Herz schwere Zeichen einer progressiven humoralen Abstoßung auf, die jedoch auf die ABO-Inkompatibilität zurückgeführt wurde.

Die bisher gewonnenen Forschungsergebnisse nutzend, perfundierte Czaplicki et al. extrakorporal ein unmodifiziertes Schweineherz mit dem Blut eines Marfan-Patienten, dem im Anschluß ein weiteres Schweineherz transplantiert wurde (Czaplicki 1992). Zusätzlich unterzog man den Patienten und das Spenderherz einer Therapie mit foetalem und embryonalem Kalbsthymus, gelöst in frühfetalem Kalbsserum. Jedoch auch dieses Herz schlug für nur 24 h, es soll keine Zeichen einer Abstoßungsreaktion gezeigt haben. Die zur Sicherung dieser Aussage notwendigen immunhistochemischen Untersuchungen wurden jedoch nicht ausgeführt.

In jüngster Zeit erwecken zum Beispiel die erfolgreiche Transplantationen von enkapsulierten Inselzellen in Patienten mit Diabetes mellitus neue Hoffnungen.

Doch neben all diesen klinischen Versuchen wurde in dem vergangenen Vierteljahrhundert intensiv an der experimentellen Erforschung der xenogenen Abstoßung geforscht, um mögliche Ursachen und Mechanismen zu erkunden.

Wenngleich auch die Väter der Xenotransplantation auf phylogenetisch dem Menschen eng verwandte Primaten wie Schimpanse oder Pavian als Spender zurückgriffen, also das concordante Modell favorisierten, wurden bald folgende Hindernisse klar: Trotz der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit der nicht-humanen Primaten erreichen deren Organe nicht die ausreichende Größe, um ihre Funktion in einem erwachsenen Menschen zu übernehmen. Die schwierige Zucht in Gefangenschaft, die lange Tragzeit und die Geburt meist nur eines Jungen schränken die Verfügbarkeit dieser Tiere erheblich ein, sofern sie nicht schon vom Aussterben bedroht sind und unter Artenschutz stehen. Die genetische Ähnlichkeit zwischen Mensch und den restlichen Primaten birgt zudem die nicht zu verachtende Gefahr der Übertragung nicht beherrschbarer Krankheiten über die Speziesgrenze hinaus (Kalter 1991, Chapman 1995, Allan 1996), wie an der Ausbreitung des HI-Virus deutlich wurde. Und zu guter Letzt natürlich sind es die erheblichen ethischen Skrupel, die durch das „Benutzen“ derart hochentwickelter Wesen entstehen und sowohl in der breiten Öffentlichkeit als auch in Wissenschaftskreisen die Verwendung von nicht-humanen Primaten als mögliche Organspender verbieten (Kennedy 1997).

Das bestehende Interesse an der Xenotransplantation lenkte also die Forschung in Richtung des diskordanten Xenomodells. Hier entwickelte sich zunehmend das Hausschwein zum favorisierten Organspender (Cooper 1991): Es ist in ausreichender Zahl verfügbar, besitzt eine dem Menschen ähnliche Organanatomie sowie -physiologie und stellt aufgrund unterschiedlicher Rassen (vom Mini-pig bis hin zum Landrasse-Schwein) eine ausreichende Bandbreite an Organgrößen zur Verfügung. Durch die frühe Geschlechtsreife und kurze Tragzeit kann es verhältnismäßig kostengünstig produziert, unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) gehalten und im Vergleich zu anderen Großtieren relativ einfach genetisch manipuliert werden. Ferner beherbergt das Schwein nur verhältnismäßig wenige Zoonosen und das Risiko der interspeziellen Krankheitsausbreitung, von diesem alten Nutztier des Menschen ausgehend, ist als gering einzuschätzen. Jedoch verdient hierbei die Ausbreitung endogener Retroviren (PERV) das Haupt-Augenmerk; die mangelnde Erfahrung in diesem Gebiet stellt derzeit sicher ein vorrangiges Ausschlusskriterium für eine klinische Erprobung dar.

1.2. Xenogene Abstoßung im diskordanten Modell

Schon in den 1960er Jahren etablierte sich die Vorstellung, dass ein primär vaskularisiertes Organ, in eine phylogenetisch weit entfernte Spezies transplantiert, in einer sofortigen bis raschen Reaktion zerstört wird, meist ohne dass das Organ nach Beginn der Reperfusion eine adäquate Funktion aufnehmen konnte. Kissmeyer-Nielsen et al. (Kissmeyer-Nielsen 1966) beschrieb diese Zerstörung als hyperakute Abstoßung (HAR: hyperacute rejection) und begrenzte den Zeitrahmen dafür auf 24 h. Die HAR beginnt mit der Interaktion von präformierten natürlichen Antikörpern (XNA, xenoreactive natural antibodies) mit Oberflächenantigenen der Endothelzellen (EC) des Transplantates und führt über eine Aktivierung der klassischen Komplementkaskade, Endothelzellaktivierung und Schaffung eines prokoagulatorischen Milieus (Miyagawa 1988) zu Gefäßschäden, interstitieller Blutung, Ödemen, intravaskulärer Thrombose und letztlich zu ischämischen Nekrosen.

Im diskordanten Schwein/ Primaten- Modell handelt es sich hierbei vorwiegend um XNA der Klasse IgM (Lawson 1996), die über den klassischen Weg das Komplementsystem (C) aktivieren können (Platt 1990), xenoreaktive IgG hingegen bewirken dies nur in deutlich geringerem Maße (Magee 1995).

Nach dem heutigen Stand der Forschung ist im Schwein/ Primaten-Modell der Großteil dieser XNA gegen ein Galactose- α (1,3) Galactose-Epitop (α Gal), das Eckhardt et al. (1982) zuerst beschrieben hat, der porcinen Endotheloberfläche gerichtet (Good 1992), und werden daher auch als Anti-Schwein- oder Anti-pig-Antikörper bezeichnet (a-pXNA). Jedoch spielen auch non-Gal-Antigene bei der xenogenen Abstoßung eine Rolle (Zhu 2000). Dieses Epitop wird in allen niedrigen Säugern und den Neuweltaffen durch eine α -Galactosyltransferase katalysiert, ein Enzym, das Altwelt-Affen (Pavian, Rhesus-, Cynomolgusaffen), Menschenaffen (Schimpanse, Orang-Utan, Gorilla) und der Mensch evolutionsgeschichtlich vor 20- 30 Mio. Jahren verloren haben (Galili 1988), und deshalb Antikörper (Ak) dagegen bilden. Sie besitzen nur noch ein Pseudogen (Galili 1987).

Wahrscheinlich dienen, vergleichbar der Entwicklung des ABO- System, α Gal-Epitope in der äußeren Membran von Mikroorganismen der normalen Darmflora als dauerhafte Quelle einer Antigenstimulation (Galili 1988). Da unter sterilen Bedingungen aufgezogene Tiere weder xenoreaktive IgM noch IgG aufweisen (Hammer 1992), müssen sich diese Antikörper, die der selben Familie wie anti-A oder anti-B- Antikörper angehören (Parker 1996, 1997), erst im Laufe der ersten Lebenswochen entwickeln. Gelegentliche Funde von anti- α Gal IgG im Neugeborenen sind vermutlich auf eine Übertragung durch die Mutter zurückzuführen

(Minanov 1997). Die Tatsache, dass ein Schweineherz in einem neugeborenen Pavian nicht hyperakut abgestoßen wird (Kaplon, 1995; Xu 1995), legt nahe, dass neben IgG vor allem präformierte IgM fehlen, die ja eine HAR initiieren.

1.2.1. Hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR)

1.2.1.1. Pathophysiologie der HAR

Bei der Verpflanzung eines Schweineorgans in einen Primaten binden primär XNA an α Gal-Endothelzelloberflächenantigen und exponieren auf diese Weise ihr Fc-Fragment, was zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade führt (Platt 1991). Durch die Antigen-Antikörperbindung (XNA-IgM und α Gal Epitop) initiiert, bindet ein C1q-Molekül. Die Anlagerung der Serinesterase C1rs aktiviert die Komponenten C4 und C2, welche nach Abspaltung von C4b und C2b die C3-Konvertase bilden (C4b2a). Diese spaltet C3 in den Entzündungsmediator C3a und C3b, der an C4b2a angelagert die C5-Konvertase formiert (C4b2a3b). Nach Abspaltung des Anaphylatoxins C5a assoziieren C5b und die Faktoren C6, C7, C8 und C9, die Membranangriffskomplex (MAC) bilden.

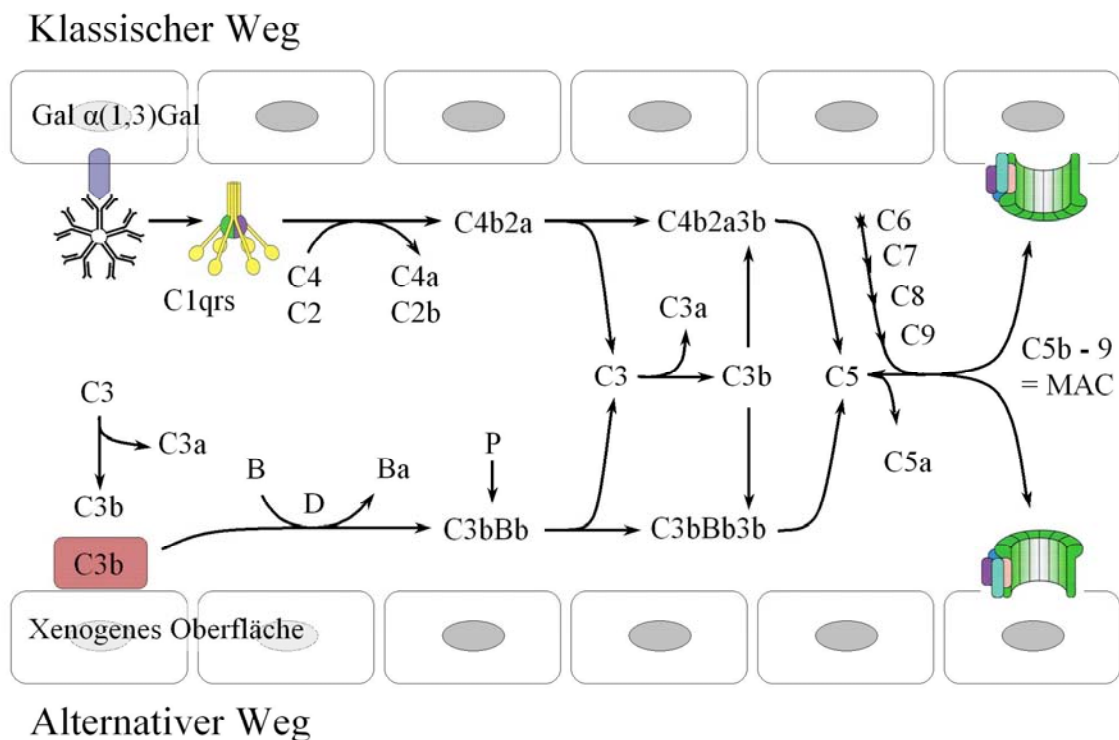


Abb. 1.1: Aktivierung der Komplementkaskade am Schweineendothel auf dem klassischen Weg über eine Antigen-Antikörper-Bindung (XNA-IgM und α Gal Epitop). Der alternative Weg wird über die Bindung von C3b an eine heterogene (xenogene) Oberfläche aktiviert.

C7 und C8. Lagert sich dieser Komplex an eine Membran an, wird er zum Kondensationspunkt für 6 bis 12 C9-Moleküle, die den Membran-Angriffskomplex (MAC, C5b-9) vervollständigen (s. Abb.: 1.1). Dieser Hohlzylinder führt durch Zerstörung der selektiven Permeabilität der Endothelzellmembran die Integrität der Zelle. Die normale Funktion der EC wird durch eine Zellretraktion kompromittiert, über Lücken dringen Serumbestandteile ins Interstitium. Weibel-Pallade Körperchen werden an der Zelloberfläche exprimiert und setzen den von Willebrand-Faktor (fördert die Blutgerinnung) und P-Selektin frei. Dieses bindet Leukozyten, die durch das ebenso freigesetzte Il-8 angelockt werden. Hierdurch werden ebenso Thrombozyten angelockt, die zusammen mit der endothelialen Expression von Thromboplastin die intravasale Ausbildung von Thromben fördern. Verstärkt wird dieser Vorgang durch den Verlust von Gerinnungshemmern wie ATIII und den Tissue-factor-pathway Inhibitor. Die intravasale Stase sowie Entzündungsmediatoren führen zur interstitiellen Ödembildung, Extravasation und letztendlich zum Zelltunergang (s. Abb.1.2). Wenngleich auch im diskordanten Modell die Aktivierung über den klassischen Weg vorherrscht, so zeigen die Ergebnisse im konkordanten Xenomodelle (z.B. Meerschweinchen/Ratte oder Hase/ Schwein (Johnston, 1992) die Ak-unabhängige Aktivierung über den

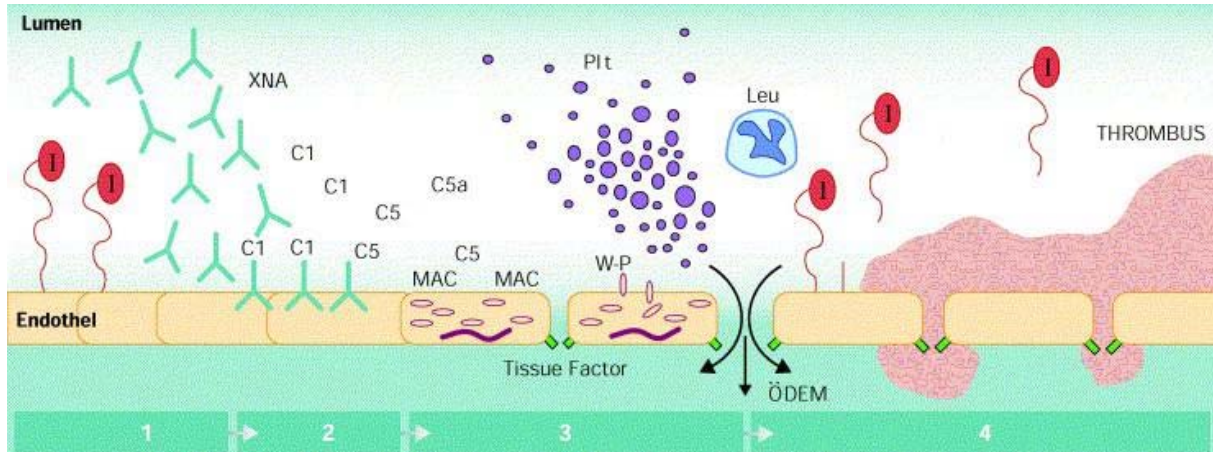


Abb. 1.2: Normales Endothel verfügt durch Expression von Koagulationsinhibitoren (I) wie ATIII oder Thrombomodulin über ein antikoagulatorisches Potential. Durch die Bindung präformierter Antikörper (XNA) wird über die klassische Komplementkaskade (C1→C5a→MAC) die HAR initiiert. Durch Ausbildung von Lücken kommt es zur Extravasation und Ödembildung, die Expression von Weibel-Pallade-Körperchen (W-P) fördert die Gerinnung und lockt Leukozyten (Leu) und Thrombozyten (Plt) an. Der Verlust von regulierenden Gerinnungsinhibitoren fördert die Thrombosierung und den konsekutiven Zelltunergang (nach Dorling 1997)

alternativen Weg (Miagawa 1988, Suckfüll 1994, Zhao 1994). Den Beginn dieses phylogenetisch ältesten Teil unserer angeborenen, unspezifischen Immunabwehr macht die kontinuierliche Entstehung von C3b durch spontane Hydrolyse im Serum. Bei der Ablagerung auf homologen Oberflächen wird dieses durch den Faktor H und MCP (membran cofactor protein) gebunden und eine unkontrollierte Komplementaktivierung unterbunden. Lagert sich C3b jedoch an heterologe Flächen an (etwa eine xenogene Endothelzelle), bildet sich unter Anlagerung des B, der durch Faktor D gespalten wird, die C3-Konvertase des alternativen Weges (C3bBb). Durch Properdin (Faktor P) stabilisiert (C3bBbP) mündet es mit Spaltung des C3 in die gemeinsame Endstrecke der Komplementkaskade bis zur Ausbildung des MAC (s. Abb.: 1.1). Die über diesen Weg angestoßene HAR erscheint erheblich schneller und stärker, findet aber nur im diskordanten Modell statt.

Ferner stellen die Spaltprodukte C3a und C5a mäßig potente Anaphylatoxine dar, die neben spasmogenen, vasopermeabilitätssteigernden, chemotaktischen und aggregierenden Eigenschaften durch Bindung an spezifische Rezeptoren die Fähigkeit zur Freisetzung vasoaktiver Peptide (z.B. Histamin, Serotonin), lysosomaler Enzyme, toxischer Radikale und Arachidonsäurederivate (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane) besitzen.

1.2.1.2. Histologische Merkmale der HAR

Histologisch ist die Zerstörung der Endothelzellen durch den MAC nicht das auffälligste Merkmal der HAR (Platt 1991). Die Untersuchungen an Geweben, die mit beginnender HAR nach nur kurzer Reperfusionzeit gewonnen wurden, zeigen keine ausgedehnte EC-Lyse, die sicherlich die auftretenden Hämorrhagien, Ödeme und Thrombosen erklären würde. Diese tritt erst zu späteren Zeitpunkten auf, wenn das Organ zunehmend zerstört ist.

Vielmehr führt eine innerhalb weniger Minuten ablaufende, Ak-vermittelte Komplement-abhängige Aktivierung der EC vom Typ I (Proteinsynthese-unabhängig) (Palmetshofer 1998a) zum Verlust der Funktion und Struktur der Endothelzelle. Diese Zellaktivierung, die ohne Genexpression einhergeht, bildet hierbei die Hauptverbindung zwischen Dysfunktion des Mikrozirkulationssystems und der Entzündung und Gerinnung (Platt 1991). Einerseits führt die durch XNA-Bindung hervorgerufene C5a Bildung (nicht-cytotoxische Wirkung des C) zu einem massiven Heparansulfat-Verlust der EC. Andererseits öffnen sich interzelluläre Spalten durch temporäres Zusammenziehen des einschichtigen Gefäßendothel, das den XNA ausgesetzt war, wodurch die darunter liegende Matrix bar liegt (Saadi 1994, 1995). Diese frei liegenden Strukturen regen Thrombozyten zur Adhäsion und Aggregation an, interzelluläre

Lücken ermöglichen das Austreten intravasaler Stoffe. Der Verlust von NO an der EC führt zur Vasokonstriktion.

Hierdurch entsteht das histologische Bild einer HAR mit Zerstörung des Parenchyms und der Mikrovaskularisation meist schon kurz nach Reperfusion. Primär zeigt sich eine kapilläre EC-Schwellung und gelegentliche venöse Thromben. Es bildet sich ein ausgeprägtes interstitielles Ödem über das gesamte Myokardium, gefolgt von diffusen interstitiellen Hämorrhagien. Erythrozytenklumpen und Fibrin-/Thrombozytenaggregate verstopfen die venuläre und kapilläre Strombahn und führen so zur Zerstörung der Gefäßintegrität mit konsekutiven massiven Hämorrhagien und ischämisch-nekrotischen Myokardarealen (Rose 1996).

Immunhistochemisch zeigt sich vornehmlich die Ablagerung von C4 und IgM entlang der endothelialen Oberfläche, auch C3 und MAC werden an gleicher Stelle nachgewiesen. IgG wird, wenn vorhanden, in interstitiellen Spalten und in Fibrinthrombi gefunden. (Platt 1991). Die spärliche lymphozytäre Infiltration entspricht dem Verhältnis an Erythrozyten (RBC) des peripheren Blutes.

1.2.2. Verzögerte, vaskuläre Abstoßung (AVR)

Wird eine HAR erfolgreich verhindert, tritt innerhalb von Tagen bis Wochen ein Abstoßungsprozess ein, der in der Literatur als akut vaskuläre (AVR) (Leventhal 1993) oder auch verzögert xenogene Abstoßung (DXR) (Blakely 1994) beschrieben wird und durch eine Schwellung und Schädigung der EC, Ischämie sowie diffuse Thrombosierung gekennzeichnet ist. Wenngleich das pathologische Bild dem der HAR ähnelt, so bildet sich die AVR in einem Zustand, in dem eine HAR zumeist verhindert wird (C-Inaktivierung, Depletion von XNA, konkordantes Modell).

Die AVR erscheint nicht als verzögerte HAR, sondern weist einen eigenen Pathomechanismus auf, der grundsätzlich durch eine Endothelzellaktivierung vom Typ II (Palmetshofer 1998b) getriggert ist. Ursächlich für diese Aktivierung scheint in erster Linie eine Ak-Bindung, jedoch auch Monozyten, Makrophagen (Fryer 1997) und NK-Zellen (Goodman 1996) können dazu führen, wenngleich Ihre Bedeutung bei der xenogenen Abstoßung kontrovers diskutiert wird (van Overdam 2000).

Durch die Bindung XNA oder neugebildeter Ak (im Sinne einer Immunantwort auf das xenogene Organ) (McCurry 1997, Palmetshofer 1998) an Gal-/ non-Gal Epithope wird die porcine EC mittels Thyrosin-Phosphorylierung aktiviert, die über Induktion prokoagulanter Proteine, Cytokine und Adhäsionsmolekülen letztendlich zu einer mikrovaskulären Thrombosierung führt. Dieser Prozess kann auch in der Abwesenheit von C stattfinden.

Gleichzeitig bewirkt die Bindung von XNA eine strukturelle Veränderung ihres Fc-Fragmentes, so dass sie von Fc-Rezeptoren auf Monozyten (Millan 1997) und NK-Zellen (Goodman 1996) erkannt werden können und somit zur Freisetzung von Cytokinen (TNF, IFN, IL-1, Lymphotoxin) führt.

1.2.2.1. Histologische Merkmale

Histologisch herrscht das Bild massiver Extravasation von Blutbestandteilen und einem interstitiellen Ödem vor, bedingt durch intravaskuläre Gerinnsel und Thrombose mit Zerstörung der Gefäßwand. Auch finden sich hier fokale, ischämische Areale bis hin zu ausgeprägten Gewebsschäden. Ohne nennenswerten Unterschied zur HAR findet man EC-Schwellung und den immunhistochemischen Nachweis von Immunglobulinen und Komplementfaktoren in den perivaskulären Gewebsanteilen.

Zusammenfassend ist das Abstoßungsgeschehen durch EC-Schwellung, fokale Ischämien und diffuse mikrovaskuläre Thrombosen bis hin zur Fibrinablagerung gekennzeichnet (Lin 1998), verläuft jedoch langsamer als eine HAR und ist bei subletalem Verlauf reversibel (Alexandre 1989).

1.2.2.2. Molekulare und zelluläre Grundlagen

Durch die Bindung von Antikörpern, ähnlich denen, die gegen MHC oder Blutgruppenantigene gerichtet sind, wird die AVR eingeleitet (Lin 1998, Lederer 1996). Eine sublytische Aktivierung des Komplementsystems bewirkt durch eine $IL-1\alpha$ Induktion zu einem phenotypischen Shift der Endothelzelle, die unter anderem durch folgende Mechanismen ihre

koagulations-regulierenden Fähigkeiten verliert: Der Verlust der t-PA Aktivität (tissue plasminogen activator) verringert die fibrinolytische Aktivität (Schleef 1988), die Abnahme an Heparansulfat reduziert die antikoagulatorische Fähigkeit (Platt 1990), Thrombomodulin wird herunterreguliert (Moore 1987) und die Induktion von tissue factor fördert die Aggregation von Blutgerinnungskomplexen (Saadi 1995). Die Thrombenbildung wird durch Prostacyclin-induzierte Vasokonstriktion begünstigt, eine Leukozytenadhärenz wird durch E-Selektin gefördert (s. Abb. 1.3)

Die Ausbildung dieser prokoagulatorischen Umgebung der EC-Oberfläche wird durch die molekulare Inkompatibilität der Komplementaktivitäts-Regulatoren (RCA) von Schwein und Primat verstärkt, bzw. kommt wahrscheinlich erst dadurch zustande.

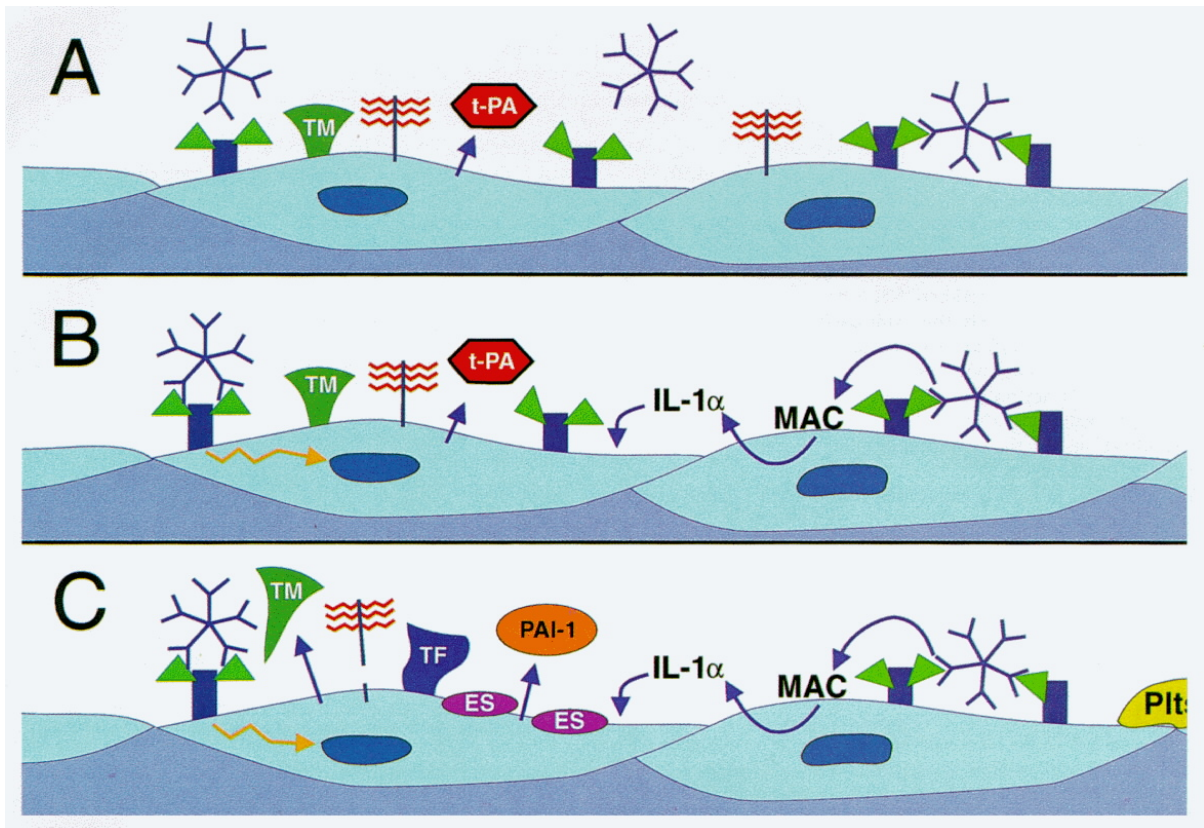


Abb.: 1.3: Bindung von präformierten oder neugebildeten Antikörpern am xenogenen Endothel startet über C-Aktivierung eine AVR (A). Durch IL-1 α Induktion kommt es zur Veränderung der EC-Oberfläche (B) und Bildung eines prokoagulatorischen Milieus aufgrund von tissue-factor (TF) Induktion, Freisetzung des Plasminogen-Aktivator Inhibitors PAI-1, die Expression von E-Selektin (ES), die Reduktion der t-PA (tissue plasminogen activator inhibitor 1) Aktivität sowie Verlust der Thrombomodulin (TM)-Aktivität (C) (Lawson 1996).

1.2.3. Akkomodation und zelluläre Abstoßung

Wird auch diese Form der Abstoßung verhindert, besteht die Möglichkeit, dass das Immunsystem des Empfängers eine spenderspezifische Toleranz entwickelt. Dieser Begriff beschreibt die entwickelte Unempfindlichkeit eines Transplantates gegen Ak- und Komplement-vermittelte Schäden und wurde zuerst in ABO-inkompatiblen Transplantationen beobachtet (Bannett 1987).

1.3. Fragestellung

Ziel dieser Dissertation ist es, die Formen der xenogenen Transplantatreaktion im heterotopen wie im orthotopen Schwein-Pavian Modell unter Langzeitbedingungen zu untersuchen. Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der makroskopischen, der histologischen und histopathologischen Beobachtung. Entsprechende Vorversuche im working-heart Modell und mit Rhesus-/ Cynomolgusaffen waren Bestandteil der experimentellen Arbeit, werden aber in diesem Kontext nicht bearbeitet.

So ist es die eine Aufgabe, das Auftreten einer HAR im nachfolgend beschriebenen Modell nachzuweisen, bzw. welche Einflussgrößen an der Entstehung einer HAR in diesem Modell beteiligt sind.

Als zweites gilt es, die Unterschiede der HAR gegenüber der AVR darzustellen, ob histologisch evaluierbare Unterschiede zur Abgrenzung vorhanden und diese mit der Literatur vereinbar sind. Über dies hinaus sucht die Arbeit nach Hinweisen für weitere Formen des xenogenen Abstoßungsgeschehens im Primatenmodell.

Zur Vermeidung einer HAR wurden die Tiere *prä transplantationem* einer extrakorporalen Immunadsorption (IA) unterzogen, eine medikamentöse, immunsuppressive Therapie (IS) mit Cyclophosphamid, Cyclosporin A, Mykophenolat Mophetil und Steroiden sollte das Auftreten einer verzögerten, akut vaskulären Abstoßung verhindern. Nur die Kombination aus einer Depletion von XNA und/oder Inhibition des C und einer potenten IS Behandlung ermöglichen die Bedingung zur Erforschung der xenogenen Abstoßung über einen längeren Zeitraum hinweg.

Als therapeutische Steigerung verwendeten wir im zweiten Teil der Untersuchungen hDAF-transgene Schweine als Spender, um ein längeres Überleben des Xenotransplantates zu erzielen, womit sich hauptsächlich die heterotope Gruppe auseinandersetzt. Die Gruppe der orthotop transplantierten hDAF-transgenen Organe soll zeigen, ob die Transgenität eines Regulatorproteins der C-Aktivierung (RCA) fähig ist, eine Transplantatabstoßung zu verhindern.

Da eine Abstoßungsdiagnostik nicht einzig und allein auf histologischer Ebene geführt werden kann, werden weitere Versuchsdaten zur Diagnosefindung herangezogen. Hierbei nehmen Komplement- und Gerinnungssystem in der xenogenen Abstoßung eine Schlüsselfunktion ein, weshalb die laborchemischen Parameter vor allem dieser beider Systeme in die Arbeit mit einfließen. Ferner soll durch die prä- und perioperative Bestimmung der präformierten Anti-pig-Ak die Effektivität der IA und die Korrelation von induzierter humoraler Immunantwort und klinischer Abstoßungsreaktion untersucht werden.

Die verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten beeinflussen das Organüberleben, und damit auch das histologische Bild. So beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage, ob die feingewebliche Untersuchung mit der Dauer der Transplantatfunktion korreliert, oder ob andere Einflüsse in der histologischen Beurteilung herangezogen werden müssen.

2. Material und Methodik

2.1. Xenogene Herztransplantation

2.1.1. Gruppen

1, Validierungsgruppe (n=5)

heterotope xenogene Herztransplantation (hXHTx) ohne Immunadsorption (n=1)

orthotope xenogene Herztransplantation (oXHTx) ohne IA (n=1)

orthotope xenogene Herztransplantation mit IA (n=3)

2, hXHTx von Landrasseschweinen mit IA (LR-h; n=4)

3, oXHTx von Landrasseschweinen mit IA (LR-o; n=4)

4, hXHTx von hDAF-Schweinen mit IA (DAF-h; n=4)

5, oXHTx von hDAF-Schweinen ohne IA (DAF-o; n=4)

2.1.2. Spendertiere

Für die Versuchsgruppen 1-3 entnahmen wir die Spenderherzen männlichen und weiblichen, nicht-transgenen Landrasse-Schweinen mit einem Gewicht zwischen 4,0 und 5,2 kg. Die Zucht dieser Ferkel erfolgte am Lehr- und Versuchsgut der Ludwig-Maximilian-Universität in Oberschleißheim.

Für die Versuchsgruppen 4 und 5 verwendeten wir als Spendertiere eine Kreuzung aus Large White- und Landrasse-Schweinen der Fa. Imutran/ Novartis (Cambridge/ England), die heterozygot für hDAF transgen waren. Durch Mikroinjektion brachte man ein 6,5 Kb DNA-Konstrukt in die Zygoten ein. Dieses Minigen enthielt das Signalpeptid des humanen DAF-Gens, wie auch das dazugehörige erste Exon und Intron (Langford 1994).

Die Ferkel der von uns verwendeten Zuchtlinie A74 (Projekt-Licence Nr. PPL 80/00735) überexprimierten das hDAF auf der Oberfläche ihrer Endothelzellen und waren damit der menschlichen Expression vergleichbar oder überlegen (Cozzi 1995).

Die Tiere beiderlei Geschlechts wurden mit einem Alter von 2-10 Wochen und einem Gewicht zwischen 3,6 und 9,2 kg der Explantation unterzogen. Die transgenen Tiere wurde ca. 1-3 Wochen vor der xHTX durch die Firma Harlan Italy (Via Luigiana 15, 20125 Mailand, Italien) von der Zuchtanstalt (Via e. Fermi 8, 20050 Cozzerana, Italien) in die Stallungen des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU München (ICF) gebracht und dort unter entsprechenden Tierschutz- und S1- Sicherheitsbedingungen gehalten.

Bei der Auswahl der Spendertiere wurde neben der Übereinstimmung der Blutgruppe stets auf die zu erwartende Größe des benötigten Spenderorgans geachtet. Um dies zu erreichen, verwendeten wir Ferkel, deren Körpergewicht etwa zwei Drittel des Empfängers betrug.

2.1.3. Empfängertiere

Hierfür bezogen wir über einen kommerziellen Anbieter (Fa. Werner Bode/ Bentheim) den Resttierbestand an Pavianen (*Papio anubis*) eines deutschen Tierparks. Für alle Tiere, die eindeutig markiert waren (Tätowierung), war ein CITES-Zertifikat ausgestellt. Eine Bescheinigung über den einwandfreien gesundheitlichen Zustand (incl. Infektiologie, s.u.) durch einen Amtstierarzt lag für jedes Tier vor. Die männlichen und weiblichen Tiere erhielten wir mit einem Alter von 4-7 Jahren und einem Gewicht von 10,5 und 20,1 kg in den Gruppen 1 bis 3 und zwischen 14,5 bis 25,1 kg in den Gruppen 4 und 5.

Die Primaten wurden gemäß dem Versuchsantrag (Bayerische Forschungsstiftung, Regierung von Oberbayern, AZ 211-2531-17/98) prä- und postoperativ in Einzelkäfigen (Höhe/ Breite/ Tiefe [cm]: 177/ 80/ 160, Ehret GmbH & Co.KG., Emmendingen) mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Nahrung sowie unter veterinärmedizinischer Aufsicht im ICF gehalten.

Alle Tiere wurden entsprechend dem Deutschen Tierschutzgesetz (vom 26.2.1993) und nach den Richtlinien des British Animal Scientific Procedures Act (1986) behandelt.

2.1.4. Präoperative Diagnostik

Zum Ausschluss von Infektionskrankheiten wurden die Tiere vom kommerziellen Händler bereits hinsichtlich bakteriellen (*Mycobacterium tuberculosis*, Yersinien, Shigellen, *Camphylobacter*, *Salmonella*), parasitären (Nematoden, Trichomonaden, *Giardia*) und viralen Infekten (Tollwut, Herpes-Virus B, SIMV, HIV und Hepatitis A/B) abgeklärt sowie prophylaktisch medikamentös gegen Wurmerkrankungen behandelt (Droncit®, Bayer). Die

virologischen Untersuchungen hierfür wurden am Paul-Ehrlich Institut Langen, die bakteriellen/ parasitologischen Untersuchungen am Deutschen Primatenzentrum Göttingen durchgeführt.

Bei Ankunft im ICF wurden die Tiere von einem Veterinär erneut als gesund befunden.

Einen Tag vor der geplanten Operation wurde den Primaten Blut zur serumchemischen Diagnostik sowie zur Bestimmung des Blutbildes und der präformierten Antikörper entnommen.

2.2. Heterotope xenogene Herztransplantation (hXHTx)

2.2.1. Spenderoperation

2.2.1.1. Anästhesie

Die über Nacht (8 h) nüchtern gehaltenen Ferkel wurden mit einer i.m. Injektion von Ketamin (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn GmbH; 25 mg/kg KG) und Azaperon (Stresnil®, Janssen GmbH; 10 mg/kg KG) analgosediert, gewogen sowie Herz und Lunge auskultatorisch untersucht. Nach Legen eines peripheren Zuganges in eine Ohrvene wurde das Tier in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert, an ein Extremitäten- EKG angeschlossen, desinfiziert, steril abgedeckt und tracheotomiert. Die Analgosedation und Muskelrelaxation wurde während der maschinellen Beatmung (Servo Ventilator 900 B; Dräger AG, Lübeck/D) mit Fentanylcitrat (Fentanyl-Janssen®; 20 µg/kg KG) und Pancuroniumbromid (Pancuronium Curamed®; 0,1 – 0,3 mg/kg KG) aufrecht erhalten.

Die Vitalparameter überwachten wir anhand eines Extremitäten- EKG (Siemens Sirecust, Erlangen), eines Pulsoxymeters (Oxi-Pulse®; PSD, USA) an der Zunge und einer kontinuierlichen invasiven Druckmessung (DTX™ Plus; Becton Dickinson, Singapore) über einen Katheter in der A. carotis interna. Zur besseren Volumensubstitution wurde ein großlumiger Venenkatheter in die benachbarte V. jugularis interna eingebracht.

2.2.1.2. Organentnahme

Durch mediane Sternotomie und Längsinzision des Perikards wurde das Spenderherz freigelegt. Nach entsprechender Präparation und Mobilisation wurden Aorta, Truncus pulmonalis und Vv. cava inf. und sup. angeschlossen. Zur systemischen Antikoagulation applizierten wir 350 IE/ kg KG Heparin (Heparin-ratiofarm®) zentralvenös. Nach Unterbinden und Abtrennen der V. azygos wurden der Truncus pulmonalis und die beiden Hohlvenen ligiert, die untere Hohlvene und eine linke V. pulmonalis inzidiert, um eine

Überdehnung des Herzens während des Abklemmens zu vermeiden. Anschließend klemmten wir die Aorta und infundierten 1000 ml (4°C) Kardioplegie- Lösung (Celsior®, Pharmacia & Upjohn S.A., France) in die Aortenwurzel, eine externe Kühlung erfolgte mit 4°C kaltem NaCl 0,9%. Zur Entnahme des Herz-Lungenpaketes in toto wurden nach dem Herzstillstand die Vv. cavae, die Aorta ascendens, die Ligg. pulmonalia und die Trachea abgesetzt. In kalter, isotoner NaCl- Lösung wurden nun ex vivo beide Lungenhili ligiert und die Lungenflügel entfernt.

Für die heterotope Herztransplantation übernahmte man die Ligatur an den beiden Hohlvenenstümpfen und schuf einen artefiziellen Atriumseptumdefekt, um einen Blutabfluß vom linken Herzen in den rechten Vorhof zu gewähren. Zuletzt passte man die Aorta grob an die zu erwartenden anatomischen Verhältnisse im Empfänger an.

Für die orthotope HTx hingegen eröffnete man das rechte Atrium posterolateral von der VCI aus bis hin zur Basis des rechten Herzohres unter Schonung des Koronarsinus und des Sinusknoten. Ferner entfernte man die Gewebebrücke zwischen den Vv. pulmonales, um den linken Vorhof für die Implantation zu öffnen. Die Anpassung von Aorta und Aa. pulmonales erfolgten erst bei Implantation entsprechend der anatomischen Gegebenheiten.

Bis zur weiteren Verwendung wurde das Herz in 3 sterilen Beuteln in kalter cardioplegischer Konservierungslösung (Celsior®) in einem Eisbett aufbewahrt und konnte auch so unter sterilen Bedingungen gewogen werden.

2.2.2. Transplantation am Empfänger

2.2.2.1. Anästhesie:

Der Empfänger-Pavian wurde, nach Entzug von Futter und Wasser für gut 12h, mit einer i.m. Injektion Ketamin (Ketavet®; Pharmacia & Upjohn GmbH; 10mg/kg KG) und Xylazinhydrochlorid (Rompun®, Bayer AG; 2 mg/kg KG) in die Glutealmuskulatur prämediziert und mit einem peripheren venösen Zugang in der V. parva versehen, über den gegebenenfalls rasch weitere Medikamente verabreicht werden konnten. Einem Abfall der Oxygenierung des Blutes, gemessen mit einem Pulsoxymeter an der Wangenschleimhaut konnte mit O₂- Gabe über eine Nasensonde entgegengewirkt werden. Nach Rasur des entsprechenden OP- Feldes, der Leisten und Ellebeugen sowie der Ableitungsstellen für die EKG- Elektroden und Reinigung mit antiseptischer Seife (Hibiscrub®) wurde das Tier in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert. Zur Einleitung der endotrachealen Intubation (Tubus 5,5-6,5 Ch) verabreichten wir Fentanylcitrat (Fentanyl-Janssen®; 10-25 µg/kg KG), Midazolam (Dormicum®; 0,15 mg/kg KG), Atropin (7 µg/kg KG) und zur Relaxation

Pancuroniumbromid (Pancuronium Curamed ®; 0,1 – 0,3 mg/kg KG). Die Analgosedation wurde mit Fentanyl i.v. und Isofluran (Forene®; 0,2 – 2%) in der Beatmungsluft fortgeführt. Zur intensiven Überwachung der Vitalparameter wurde dauerhaft ein 5-Kanal EKG (Sirecust, Siemens) abgeleitet und der Blutdruck kontinuierlich über einen arteriellen Katheter (Leadercath, 20G, VYGON,) in der A. femoralis gemessen (Einmal-Druckwandler DT-XX, Viggo-Spectramed/ Ohmeda, Erlangen), über den auch Proben zur Blutgasanalyse gewonnen werden konnten. Eine rektale Temperaturmesssonde zeigte die entsprechende Körperkerntemperatur an. Die Volumensubstitution von 1-3 ml/kg KG/h Ringer-Lactat Lösung und jede weitere Medikation erfolgte über einen in der V. femoralis liegenden ZVK (Baxter, 2-lumig, 7-10 Fr) und den in einer V. brachialis liegenden peripheren venösen Zugang (Vigo, 18 – 20G). Die genaue Urinmenge wurde zur Überwachung der Nierenfunktion mittels Blasenkatheter (je nach Geschlecht und Größe 6-10 Ch) bestimmt. Magensekret wurde über eine nasale Magensonde (14 CH) abgeleitet.

Behandlungspflichtige Veränderungen der Kreislaufsituation oder des Allgemeinzustandes des Primaten wurden mit den selben Richtlinien und Medikamenten behandelt, wie sie auch in der herzchirurgischen Anästhesiologie am Menschen angewendet werden. Eine antibiotische Abdeckung erfolgte perioperativ mit Cefuroxim i.v. (Zinacef®; 20 mg/kg KG).

2.2.2.2. Operation

Nach üblicher steriler OP- Feldvorbereitung eröffnete man mittels medianer Laparotomie entlang der Linea alba vom mittleren Epigastrium bis zur Symphyse das Abdomen. Es wurden die abdominalen Organe verlagert, die infrarenale Aorta abdominalis, V. cava inferior dargestellt und mit Gummibandligaturen (Ethiloop, 1,1 mm; Ethicon) angeschlossen. Nach systemischer Heparinisierung mit 350 IE/kg KG wurde zunächst die V. cava mittels Cooleyklemme ausgeklemmt, longitudinal inzidiert und in fortlaufender Naht (7/0 Prolene) mit dem Truncus pulmonalis des Spenderherzens anastomosiert. Die Spenderaorta wurde nun auf die selbe Art in einer Seit-zu-Endanastomosierung mit der Aorta des Empfängers verbunden. Zur Entlastung des rechten Herzens wurde zwischen dem rechten Herzohr und der rechten V. iliaca communis ein Abflussweg gebildet. Nun entlüftete man das Herz mit heparinierter Kochsalzlösung und startete die Reperfusion durch Öffnen der Klemme. Die einsetzende Blutversorgung und rasche Erwärmung des Transplantates bewirkten meist die spontane Konversion in den Sinusrhythmus, der ansonst durch interne Defibrillation (5- 15 Watt) erreicht wurde. Eventuelle Anastomosenlecks wurden übernäht und mit Fibrinkleber (Tissucol, Immuno AG, Wien, Österreich) gesichert. Bei zufriedenstellender Funktion des

Xenotransplantates wurde unter Beachtung einer torsionsfreien Lagerung des Transplantates und der abdominalen Organe die Bauchdecke mit Vicryl 2/0 allschichtig überwendlich verschlossen und die Haut intrakutan (Daxon 4/0) adaptiert.

2.2.3. Postoperatives Management

Unter Narkose mit Propofol und Azaperon überwachte man die Stabilisierung der Herz-Kreislauffunktion unter Ausschluss einer Nachblutung. Eventuelle intraoperativ notwendigen i.v. Gaben von Katecholaminen wurden ausgeschlichen. Bei Erfüllung aller Extubationskriterien und adäquater Neurologie ließ man das Tier nach Versorgung aller invasiven Zugänge von der Analgosedation erwachen und lagerte es aufrecht sitzend in einen mit Heizlampen temperierten und Fellen ausgelegten Käfig. Der Pavian wurde postoperativ für 48 h dauerhaft überwacht. O₂ wurde entweder über eine Nasenbrille oder einen losen Schlauch in Nasennähe angeboten. Von vielen Tieren wurden die belassenen EKG-Elektroden wie ein manuelles RR-Meßgerät gut toleriert, so dass eine objektive Beurteilung der hämodynamischen Situation weiterhin möglich war.

Die Verabreichung der Immunsuppressiva sowie ein verhaltensadaptiertes Schmerzmedikationsschema wurde unmittelbar postoperativ eingeleitet.

2.3. Orthotop xenogene Herztransplantation (oXHTx)

2.3.1. Spenderoperation

Das anästhesistische und operative Vorgehen bei der Entnahme des Spenderherzens unterschied sich in keiner Weise von der in 2.2.1. beschriebenen Methode.

2.3.2. Empfängeroperation

2.3.2.1. Anästhesie

Abgesehen von der Rasur des Thorax (Operationsgebiet) war die anästhesistische Vorbereitung identisch zu dem unter 2.2.2.1. beschriebenen Vorgehen.

2.3.2.2. Operation, orthotope Implantation

Die orthotope Herztransplantation führten wir gemäß der atrialen Manschettentechnik nach Lower und Shumway durch (Lower 1960). Dafür wurde, nach Desinfektion und sterilem Abdecken, der Thorax durch eine mediane Sternotomie eröffnet, das Perikard längs inzidiert und die Kanülen für die Herz-Lungen-Maschine (HLM) in die Aorta ascendens und die

angeschlossenen Hohlvenen eingebracht. Die systemische Heparinisierung mit 350 IE/kg Heparin wurde vor Ort mittels ACT (activated clotting time) überprüft und ein Wert von >460 Sekunden angestrebt. Mit Ausklemmen des Herzens an Aorta und Vv. cavae startete der totale cardiopulmonale Bypass und das Empfängerherz konnte entlang der Vorhof-Kammergrenze unter Belassung der beiden atrialen Manschetten exzediert werden. Es erfolgte nun die Anastomosierung der in situ belassenen Empfängervorhöfe durch eine fortlaufende 5/0 Prolene- Naht mit den entsprechenden Spendervorhöfen, wobei beim linken Atrium am Herzohr und am rechten in der Mitte des interatrialen Septums begonnen wurde. Anschließend wurden die Aorten und Pulmonalarterien von Spender und Empfänger end-zu-endseitig (5/0 Prolene) anastomosiert.

Nach Wiedereröffnen des Blutzufusses zum Herzen durch Lösen der Tourniquets an den Hohlvenen wurden das implantierte Herz sorgfältig entlüftet. Neben Massieren erhöhte man hierfür zum einen den pulmonalvenösen Rückstrom durch Blähen der Lungen, zum anderen konnte direkt über eine in der linken Apex und der Aorta platzierten Kanüle Luft entweichen. Bevor die Füllung des Herzens ausreichend war, wurde die Aortenklemme geöffnet und das Myokard über die Koronarien perfundiert. Die Wiedererwärmung auf >32°C und die Versorgung mit oxygeniertem Blut bewirkten zumeist ein spontanes Konvertieren in den Sinusrythmus, ansonsten wurde intern defibrilliert. Undichte Nähte und Entlüftungsstellen wurden in der anschließenden Reperfusionzeit mit 5/0 Prolene-Naht versorgt.

Sobald das Transplantat eine suffiziente Leistung erbrachte, begann man mit der Entwöhnung von der HLM. Nach Beendigung des kardiopulmonalen Bypass entfernte man die Kanülen in Aorta und Vv. cavae und verschloss die Punktionsstellen. Die systemische Heparinisierung wurde entsprechend der verabreichten Heparinmenge und der ACT mit Protaminsulfat (Protamin 1000 Roche®) antagonisiert. Eine ausführliche Blutstillung und der Verschluß des Thorax (Sternum: Stahldraht 3 (6 metric), Ethicon; subkutanen Gewebe: Vicryl 3/0 zweischichtig, Hautnaht PDS 4/0 intakutan) unter Belassung zweier perikardialen Drainage beendeten den operativen Eingriff.

2.3.3. Postoperatives Management und Untersuchungen

Zum Ausschluss einer signifikanten Nachblutung und zur Stabilisierung der Herz-Kreislauffunktion wurde das Tier unter Isofluran und Propofol für eine weitere Stunde überwacht. Sobald es die Umstände erlaubten, wurden die sedierenden Substanzen verringert, alle invasiven Zugänge, einschließlich aller Drainagen gezogen und versorgt und das Tier extubiert. Bis zum völligen Erwachen wurde es erst unter Sauerstoffzufuhr bequem auf dem

OP-Tisch gelagert und mit Wärmelampen temperiert, um anschließend ohne jeglichen invasiven Zugang oder Katheter in den beheizten, gepolsterten und mit Sauerstoff angereicherten Käfig überbracht zu werden. Die oft gut tolerierten und dann verbliebenen EKG- Elektroden erleichterten die ununterbrochene postoperative Überwachung der folgenden 24-48 h. Bereits 3h nach Extubation stand den Tieren Flüssigkeit zur freien Verfügung.

Die Paviane wurden nach dem Eingriff zwei Mal täglich (8:00, 17:00) zu Untersuchungen aus dem Käfig genommen, wenn nötig unter Sedation mit Ketamin (10-20 mg/kg i.m.) und Xylazin (2-4 mg/kg i.m.). Hierbei wurde das Gewicht gemessen, die Wundverhältnisse inspiziert, die tägliche Medikation verabreicht und entsprechend dem klinischen Zustand Elektrolytlösung i.v. und/ oder hochkalorische Sondenkost (Fresubin) über eine Magensonde appliziert.

Um die Funktion des Xenograftes zu überprüfen, wurde hierbei immer ein Extremitäten-EKG abgeleitet und eine Herzechokardiographie durchgeführt, um Myokardkontraktilität und Ejektionsleistung zu quantifizieren und adhärenente Thromben auszuschließen.

In der ersten postoperativen Woche entnahmen wir täglich, ab der zweiten Woche jeden zweiten Tag, Blut über einen peripher venösen Zugang, wobei die entnommene Menge pro Monat 9% des Gesamtblutvolumens nicht überschritt.

Es wurden folgende laborchemische Untersuchungen im Institut für Klinische Chemie der LMU (KIC) oder am Institut für Chirurgische Forschung der LMU (ICF) durchgeführt:

Hämatologie (Bayer-Technikon H1E Hämatologie Analyser (KIC) und CellCoulter (ICF): Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten, Thrombozyten, Differentialblutbild

Medikamentenspiegel für

MMF und

CyA: SYVA monospezifisch: (EMIT Syva Cobas Mira Plus)

2.3.3.1. Anti-pig-Antikörperspiegel (a-p XNA) mittels Hämagglutinationstest

Als agglutinierende Zellen verwendeten wir Schweineerythrozyten, die für jede Bestimmung frisch gewonnen wurden. Hierfür wurde einem gesunden Schwein etwa 10 ml heparinisertes Blut abgenommen, das durch schonende Zentrifugation (2500 U/ min, 10 min) in Plasma und korpuskuläre Bestandteile getrennt wurde. Nach Entfernen des Plasmas und des

lymphozytären Überstandes mittels Vakuumpipette wurden die Erythrozyten drei mal mit reichlich PBS (0,81% NaCl- Lösung, mit Phosphat gepuffert, Apotheke Klinikum Großhadern) gewaschen. Aus 150µl gewaschenen Erythrozyten, die mikroskopisch betrachtet regelhaft (rund, keine Zellfragmente) zu sein hatten, und 50 ml PBS wurde eine Suspension hergestellt. Von dem zu untersuchendem Serum (100 µl), dessen Gerinnungs- und C-Faktoren zuvor bei 56°C über 30 min inaktiviert wurde, stellten wir eine geometrische Verdünnungsreihe her (1:1, 1:2, 1:4 bis 1:2056) und inkubierten diese zusammen mit dem gleichen Volumen an Erythrozytensuspension für 90 min bei 37°C und weitere 30 min bei 4°C, um sowohl Wärme- als auch Kälteagglutinine zu erfassen. Danach wurde die Suspension aufgeschüttelt, auf einem Objektträger ausgestrichen und unter dem Mikroskop befundet. Als Titer der a-p XNA (IgM, IgG) galt die Verdünnungsstufe, bei der zuletzt eine Hämagglutination festzustellen war (s. Abb. 2.1).

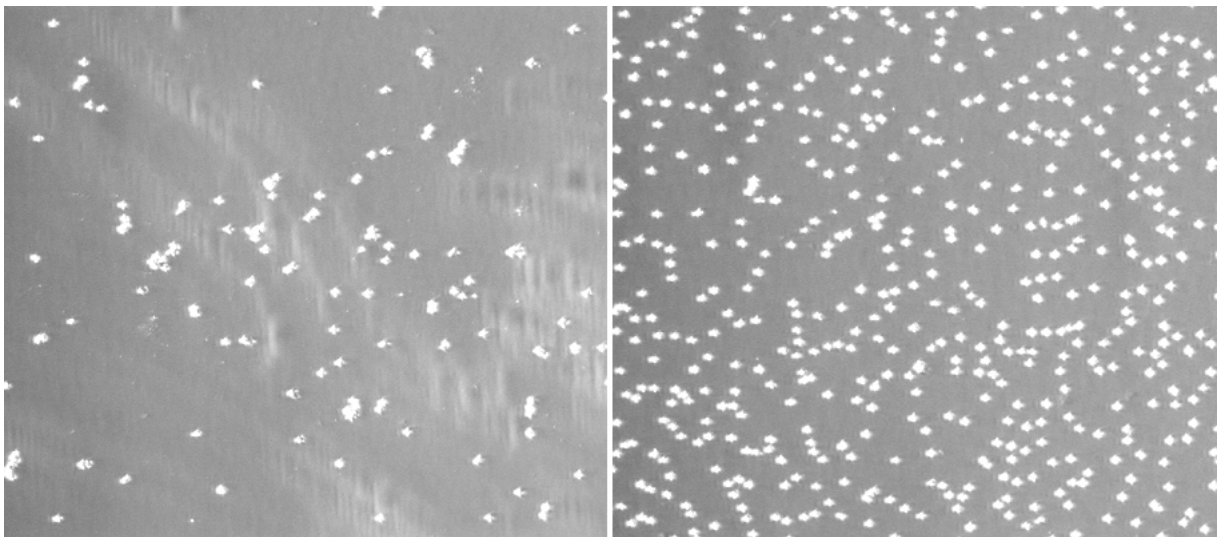


Abb.: 2.1: Anti-pig Antikörper Hämagglutinationstest: links positiv mit Agglutination von Schweineerythrozyten. Freie Erythrozyten im Sinne einer negativen Agglutination (rechts)

Um die Effektivität der IA zu beurteilen und die Titer-adaptierte IA (s.u.) durchführen zu können, entwickelten wir einen Hämagglutinationsschnelltest, der eine rasche Bestimmung der a-pXNA ermöglicht. Hierfür wurde im Grunde der selbe Versuchsaufbau gewählt, jedoch verkürzten wir die Inaktivierungszeit auf 20 min, die Warminkubation auf 10 min und die Kaltinkubation auf 5 min. Wenngleich die Differenzierungsmöglichkeit der einzelnen Titerstufen im Vergleich zum oben beschriebenen Hämagglutinationstest (der in allen Fällen durchgeführt wurde) nicht so genau war, so zeigte sich ein zu 90% korrelierender Titerverlauf um jeweils 5 Verdünnungsstufen tiefer.

Zur raschen peri-/ postoperativem Labordiagnostik konnten im Operationssaal folgende Parameter bestimmt werden

pH, pCO₂, pO₂, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Hct, Hb, HCO₃, BE, O₂ SAT: Blood Gas Analyser 348 (Chiron Diagnostics, Essex, UK)

Quick, pTT: Kartensystem Biotrack®, Coagucheck® (Böhringer, Mannheim)

ACT (activated clotting time): Hemochron Blood Coagulation Timer (Int. Technidyne Corp., Metuchen, NJ, USA). In eine beschichtete Küvette (Hemochron Whole Blood Coagulation System, Ad. Krauth GmbH & Co., Hamburg) wurde 1 ml Vollblut gefüllt und im Gerät bei 37°C unter Drehung die Zeit gemessen, bis das Blut geronnen war. Nach Heparinabgabe sollte die Gerinnungszeit > 480 sec. betragen.

Zur Bestimmung der im folgenden aufgeführten Parameter wurde Serum oder Plasma bei – 79°C eingefroren und am Institut für Klinische Chemie der LMU ausgewertet, das Blutbild wurde aus Vollblut sofort bestimmt:

• Serumchemie: (Hitachi 737 clinical chemistry analyser):

Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Glucose, GOT/ALAT, GPT/ASAT, LDH, CK, CK-MB, Troponin I, Kreatin, Harnstoff, Bilirubin, Osmolarität.

• Blutbild (XE-2100 Sysmex):

WBC, Neut, Lymph, Mono, Eo, Baso, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Plt.

• Immunglobuline IgG, IgM, IgA (Olympus AU 2700).

• Komplementfaktoren C3, C4 (Behring Nephelometer Analyser II, Dade Behring).

• Gerinnung (STA Analyser, Roche): PT, PTT, Fibrinogen, D-Dimere, Protein C.

Ausscheidung, Allgemeinzustand, Verhalten, Reaktion auf Behandlungen und sonstige Auffälligkeiten wurden in den Studienunterlagen festgehalten. Die Tiere hatten, wie auch präoperativ, freien Zugriff zu Futter (350 g/d Standard Trockendiät, frisches Obst/ Gemüse ad

libidum) und Wasser. Zur Ablenkung während des Tages hatten die Primaten menschlichen Kontakt durch medizinisches Personal oder Tierpfleger, zeitweilig wurde auch ein Radio- oder Fernsehgerät eingeschaltet.

2.4. Therapie der Abstoßung

2.4.1. Medikamentös

Die orale Applikation der Medikamente erfolgte zur morgendlichen und abendlichen Visite und Untersuchung über eine nasale Ernährungssonde. Cyclosporin A steht in flüssiger Galenik zur Verfügung, die restlichen oralen IS wurden im Mörser zermahlen und in Wasser gelöst verabreicht.

Cyclosporin A (CyA) wurde initial als i.m.-Injektion (Sandimmun Cyclosporin® 100 mg/ml, Sandoz Pharmazeutical) mit einer Dosis von 25 mg/kg/d verabreicht. Die Tiere erhielten diese Dosis während der Operation (Tag 0). Am Tag 1 wurde CyA morgens als i.m.-Injektion mit einer Dosis von 20 mg/kg, am Abend bereits oral (Sandimmun Optoral® Lsg, bzw. Sandimmun Neoral® 100 mg/ml, Sandoz Pharmazeutical) mit einer Dosis von 100 mg/kg verabreicht. Ab dem 2. Tag erfolgte eine nach dem morgendlichen Talspiegel adaptierte Dosierung 2 mal täglich; ein Serum-Zielspiegel von 150 -200 ng/ml wurde angestrebt.

Cyclophosphamid (CyP) (Endoxan® injection, ASTA Medica AWD GmbH) wurde als einmalige i.v.-Injektion am Tag -1 mit einer Dosis von 40 mg/kg, am OP-Tag mit einer Dosis von 20 mg/kg/d verabreicht. An den Tagen 2 und 4 wurde kalkuliert 10 mg/kg/d appliziert, die Gabe richtete sich nach Leukozyten- und Thrombozytenzahl (WBC/ Plt) und des im Blut bestehenden anti-pig-Antikörperspiegels.

Mycophenolat Mofetil (MPA) (CellCept®, Roche) wurde ab dem Tag -1 oral mit einer Tagesdosis von 70 mg/kg/d in zwei Gaben verabreicht. Ab dem Tag 1 erfolgt eine spiegeladaptierte orale Gabe, ein morgendlicher Talspiegel von 3-5 µg/ml wurde angestrebt.

Steroide: Die Applikation von Methylprednisolon (MPS Urbason®, Upjohn) erfolgte 30 min vor Reperfusionbeginn mit 10 mg/kg i.v. An Tag 1 und 2 wurde Prednisolon (Prednesol® 5, Glaxo) in der Dosierung 1 mg/kg (1 x tgl.) oral verabreicht, und in den folgenden Tagen um 0,05 mg/kg/d getapert, bis eine Erhaltungsdosis von 0,2 mg/kg/d erreicht war.

2.4.2. Immunadsorption

Zur Reduktion der präformierten Antikörper unterzogen wir die entsprechenden Tiere einer extrakorporalen Immunapharese mittels der Immunadsorptionssäulen der Firma Therasorb, die in einer automatischen Adsorptions-Desorptions Einheit (ADA) der Firma Medicap (Ulrichstein) verbaut waren.

Die nach dem Aphaeseprinzip von Stoffel und Demant (Stoffel 1981) entwickelten Ig-Therasorb® Säulen binden hochselektiv und gleichmäßig humane Antikörper durch polyklonale Schafantikörper. Diese sind spezifisch gegen humane Immunglobuline der Klassen M, G 1-4, A, E sowie gegen Immunglobulinfragmente und zirkulierende Immunkomplexe gerichtet. Die Schafantikörper sind mit ihrem Fc-Anteil an die Bestandteile einer Sepharose-CL-4B-Suspension gebunden und werden so in der Säule gehalten.

Zur Behandlung wurde der Pavian nach Prämedikation mit Ketamin (Ketanest 20mg/kg KG) und Xylazin (Rompun 2-4 mg/kg KG i.m.) in einer Perfusorgesteuerten Propofolnarkose gehalten.

Über einen in der V. femoralis liegenden, doppellumigen Katheter (7 Fr, 20 cm) wurde heparinisiertes Vollblut entnommen und in einem Filter der ADA das Plasma von den korpuskulären Anteilen separiert.

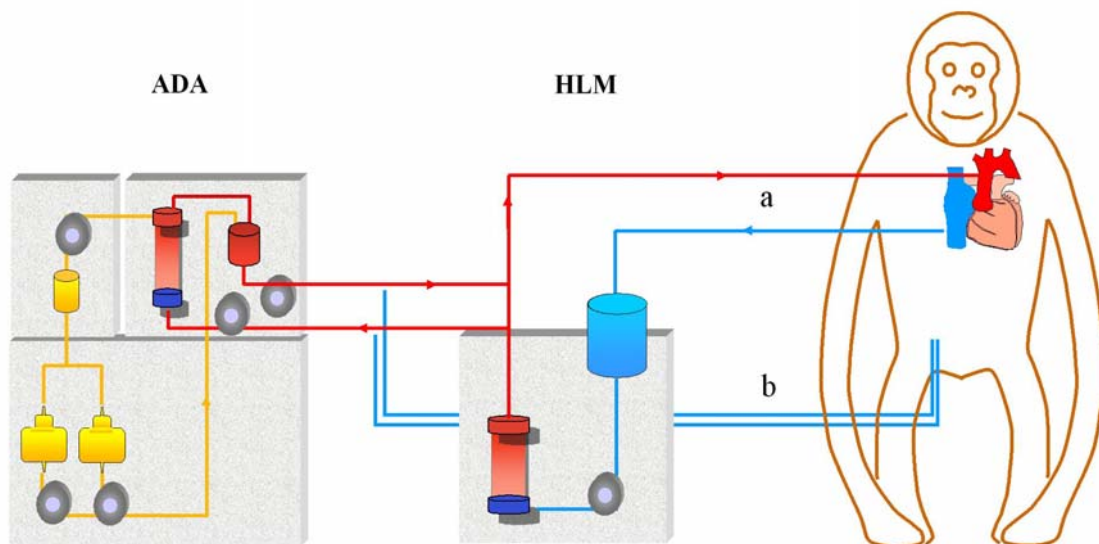


Abb. 2.2: Intraoperativer Aufbau der Immunsorptionseinheit ADA: Entnahme und Rückführung des Blutes über die V. femoralis (b) oder Einsatz an der HLM (a)

Mit diesem wurde über eine elektronisch gesteuerte Pumpe eine der beiden Säule beladen. Spezifische polyklonale Schafantikörper (s. o.) in der Säule banden nun aus dem vorbeiströmendem Plasma die entsprechenden Immunglobuline. Das so gereinigte Plasma wurde darauf zusammen mit den zellulären Bestandteilen über den proximalen Anteil des venösen Katheters wieder dem Tier zugeführt.

Um eine kontinuierliche Behandlung zu gewährleisten, verwendeten wir abwechselnd zwei Säulen. Während eine beladen wurde, konnte die andere von den zuvor eluierten Antikörpern durch einen Lösung aus Glycin, PBS und Kochsalz gereinigt werden. Das in einem Zyklus zu reinigende Volumen belief sich auf rund 300 ml Vollblut und wurde durch kolloide Ersatzstoffe ausgeglichen.

Um bei einer Zyklusdauer von rund 20 min die Gesamtdauer dieser Behandlung, und damit einer extrakorporalen Zirkulation zu verringern, wurde in einigen Fällen das Vollblut dem zuführenden Schenkel der laufenden Herz-Lungenmaschine entnommen und auch wieder zugeführt (s. Abb. 2.2).

2.5. Endpunkte der Studie

Es wurden folgende Endpunkte definiert, bei deren Eintreten der Versuch durch Einschläferung des Tieres beendet wurde.

1. Finale Transplantatabstoßung (im heterotopen Modell dokumentiert durch ein Sistieren der Herzaktionen)
2. Nicht beherrschbare Infektion
3. Medikamenten-Toxizität (z.B. Diarrhoe, Blutung)
4. Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Tieres, der ein unzumutbares Leiden verursacht.
5. Kardiorespiratorische Insuffizienz
6. Analgetika-refraktäre Abweichung vom natürlichen Verhalten

Die Tiere wurden nach Sedation mit Ketamin und Xylazin durch eine Überdosis Phenobarbital (400 mg) oder der Applikation von Fentanylcitrat (0,25 mg i.v.) und Kaliumchlorid (80 mval i.v.) terminiert. Zuvor wurde noch für abschließende Untersuchungen Blut abgenommen. Die vermutliche Todesursache oder die Todesumstände wurden ebenso wie Zeitpunkt und verabreichte Medikamentenmenge erfasst.

2.6. Obduktion

Nach Sistieren der Herzaktion und dem Ausbleiben von Hirnstammreflexen wurde Thorax und Abdomen median eröffnet und das Xenograft einschließlich der Anastomosen entnommen. Nach Wiegen und photographischer Dokumentation des Herzens, wurde dieses entlang der rechten und der linken Flussbahn eröffnet und die Koronarien, die Kammern und Klappen beurteilt (Thromben, Infarkt-/Abstoßungszeichen, Hämorrhagien, Klappenschäden). Von Vorder- und Hinterwand beider Ventrikel wurde jeweils eine transmurale Probe über die gesamte Myokardlänge entnommen (Basis bis Apex, s. Abb.: 2.2) und in Formalin (4%) fixiert.

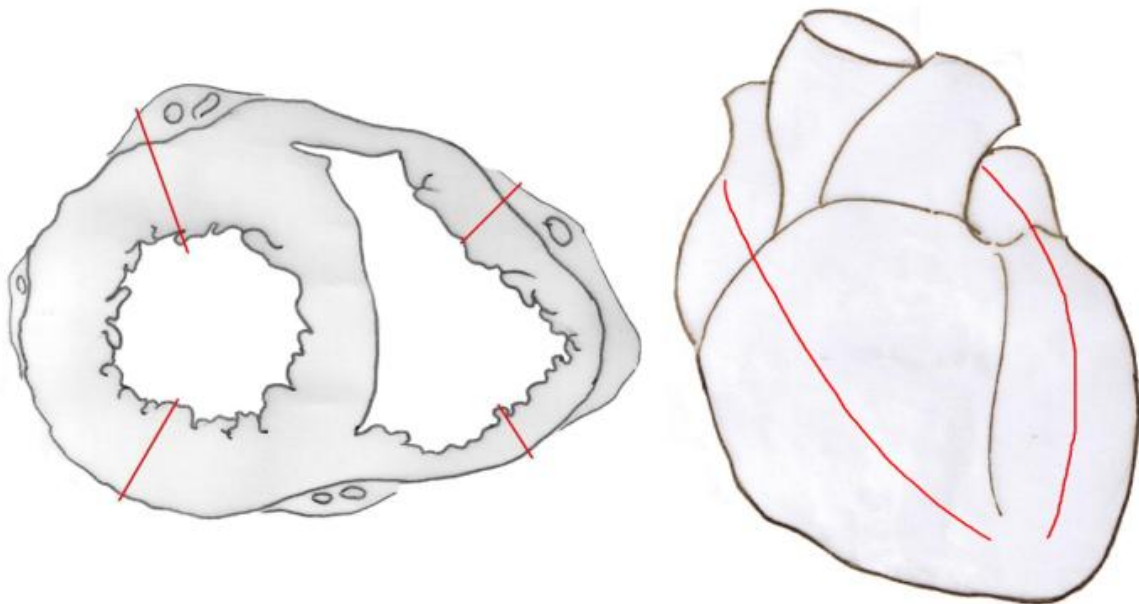


Abb. 2.2: Standardisierte Entnahmestellen von transmuralen Gewebestücken zur histologischen Beurteilung

Von entsprechenden Stellen wurden zur immunohistochemischen Untersuchung Biopsien (10x6x6 mm) auf Korkplättchen in Gewebekleber (Tissue-tek®, Miles, USA) gebettet und rasch, aber schonend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Aufarbeitung bei -79°C aufbewahrt. Für die feinstrukturelle Elektronenmikroskopie fixierten wir 4 Gewebestücke des linken Ventrikels für mindestens 4h in 6,25% Glutaraldehydlösung und lagerten sie bis zur Bearbeitung in 2% Saccharose. Das verbliebene Myokard wurde bei -20°C aserviert. Die Organe der Brust- und Bauchhöhle wurden in systematischer Reihenfolge makroskopisch auf etwaige Veränderungen hin inspiziert und palpiert. So konnte neben den routinemäßig entnommenen Proben von Lunge, Leber, Milz und Nieren auffälliges Gewebe in Formalin fixiert und eine pathologische Veränderung mikroskopisch beurteilt werden.

2.7. Histologie

2.7.1. Lichtmikroskopie

Zur konventionellen histologischen Beurteilung der Gewebeproben des Xenotransplantates färbten wir in Formalin fixierte und in Paraffin geschnittene Gewebeproben in einer Stärke von ca. 5 µm mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) und Elistca van Gieson (EvG).

Immunhistochemische Untersuchungen führten wir an 7 µm dicken Gefrierschnitten nach der Avidin- Biotin Methode (UniTec™, Mouse Immunohistochemistry System; Dianova Ltd., UK) durch.

Wir verwendeten zum Nachweis von C3, C4, C5b-9 anti-humane monoklonale Maus-Antikörper (Quidel C3b, Quidel C4b, SC5b-9; Quidel Corp, San Diego, USA). Die Immunglobulinablagerung wurde mittels muriner monoklonaler Antikörpern gegen menschliches IgG, IgM oder IgA (Dako-IgG, IgM, IgA; Dakopatts, DK) nachgewiesen.

Die Expression von hDAF auf den Endothelzellen stellten wir mit einem monoklonalen, anti-humanen DAF Antikörper (BRIC 216 IB-GRL Research Products; Estree, UK) dar.

Eine Auswertung der gefärbten Proben erfolgte durch zwei unabhängige und erfahrene Untersucher semiquantitativ nach einem 4 stufigem Score.

2.7.2. Elektronenmikroskopie

Die in Glutaraldehyd fixierten Gewebeproben wurden in Epoxidharz eingegossen und als Semidünnschnitte (500 nm) mit Toluidin-Methylenblau gefärbt, um lichtmikroskopisch eine Übersicht zu gewinnen. Bereiche von besonderem Interesse wurden dann als Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 100 nm auf ein Kupfergitter gelegt, mit Uranylacetat

und Blei gefärbt und mit dem Elektronenmikroskop (Philips 300) bei 10 000-facher Vergrößerung ausgewertet.

2.8. Statistik

Wir wählten bei unseren Primatenversuchen aufgrund des hohen ethischen Anspruches, aus tierschutzrechtlichen wie auch aus finanziellen Gründen die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe so, dass die Individuenzahl so gering wie möglich war, jedoch noch ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden konnte. Strenge statistische Aussagen waren jedoch nur in begrenztem Masse zu erheben. Die erhobenen Parameter wurden mit deskriptiven statistischen Verfahren untersucht und als Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert (\pm SEM) angegeben. Zur Signifikanzanalyse wählten wir aufgrund der geringen Fallzahl ein verteilungsfreies Verfahren. Um verbundene Stichproben (verschiedene Messpunkte in einer Gruppe) zu vergleichen, verwendeten wir den Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (nicht geeignet für $n > 5$). Der Vergleich unverbundener Stichproben erfolgte mit dem nicht parametrischen U-Test (Whitney-Mann-Test), das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt, die Berechnung erfolgte jeweils mit SPSS 7.5 für Windows (SPSS Science). Die graphische Darstellung der Parameter erfolgte mit SigmaPlot für Windows (Jandel Scientific, Erkrath).

3. Ergebnisse

3.1. Validierung der Abstoßungsreaktion im Schwein-Primaten- Modell

Kontrolle Pav 6:

Es kann eine ausgedehnte frische Myokardnekrose mit Ablassung des Zytoplasma und Zellkernverlusten sowie fokale, deutliche Hämorrhagien festgestellt werden. Das Gewebe ist durch ein deutliches interstitielles und fokal intrazelluläres Ödem aufgetrieben, ferner finden sich multiple interstitielle Fibrinablagerungen. Vor allem das kleine und mittlere Gefäßsystem, hierbei bevorzugt das venuläre, ist zu grossen Teilen mit Fibrin-Plättchen-Thromben verschlossen; neben einigen Gefäßzerreißen findet sich eine ausgeprägte intravasale wie auch interstitielle Granulozyteninfiltration.

Elektronenmikroskopisch zeigt sich ein Myokard mit regulärem Aufbau, an dem untersuchtem Material können keine Nekrosen oder Myofibrillogen festgestellt werden. Die Mitochondrien zeigen eine deutliche Schwellung der Matrix mit Verlust der Matrixgranula.

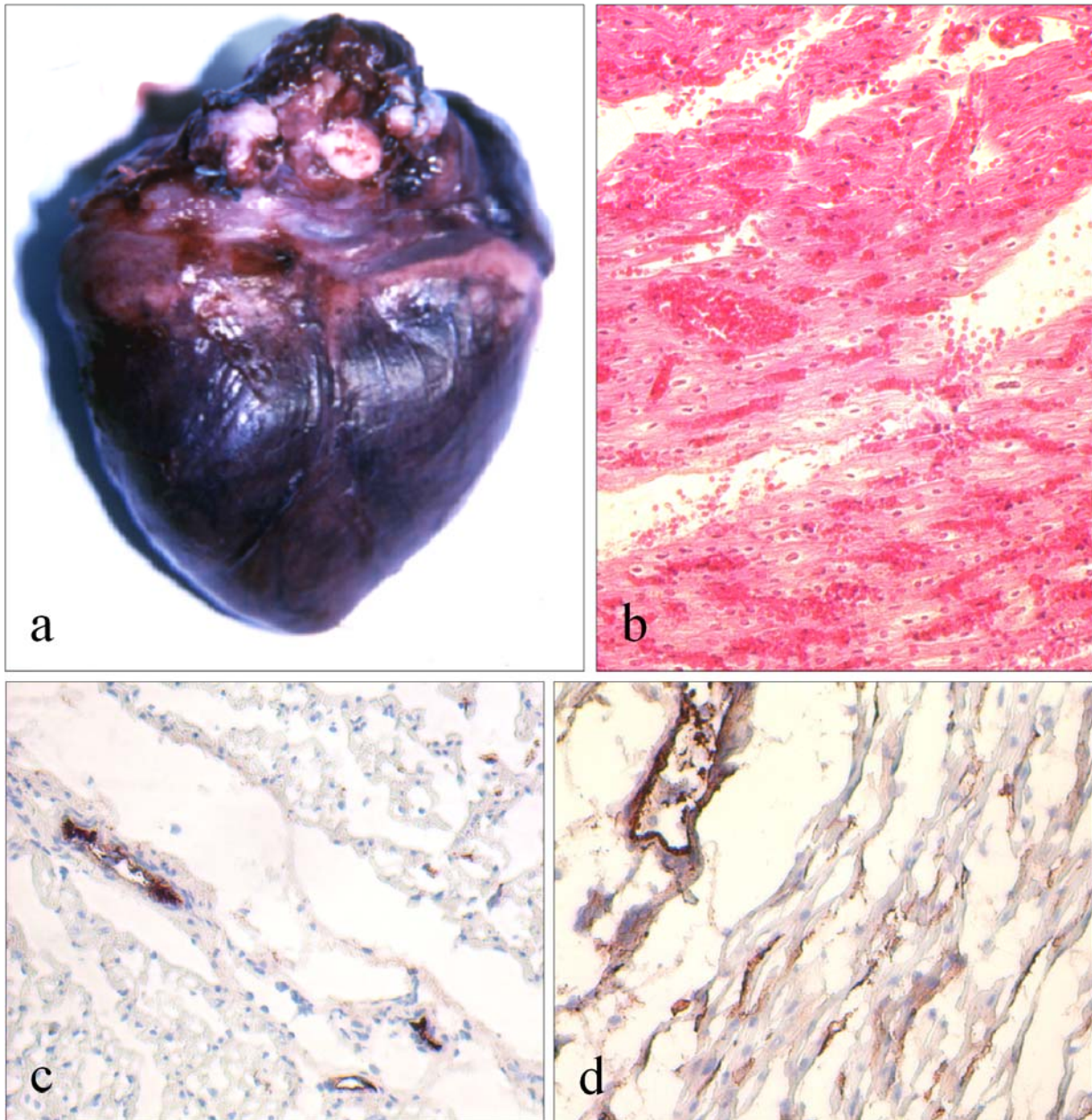


Abb. 3.1: Makro- und Mikroskopisches Bild einer HAR bei Pav 6. Die typische düstere Verfärbung (a) spiegelt sich in der HE- Färbung als diffuse hämorrhagische Durchsetzung des Gewebes wieder (b). Immunhistochemisch findet sich eine deutliche Ablagerung von C3 (c) und IgM (d).

Kontrolle Pav 7:

Am vorliegenden Material zeigt sich linksventrikulär ein ausgeprägter Myokardinfarkt (50% des Gesamtgewebes) neben regelrechtem Herzmuskelgewebe. Dieses ist mit einem mäßigen interstitiellem Ödem sowie endokardseitig betonten Hämorrhagien durchsetzt. Besonders die venulären Gefäße sind mit Thromben und Erythrozytenhaufen verschlossen, im umliegenden Interstitium findet sich sowohl eine geringe Fibrinablagerung wie auch die Infiltration durch

Granulozyten. Im elektronenmikroskopischen Präparat wurde der entscheidende Befund des Zelluntergangs nicht miterfasst, jedoch zeigt sich auch hier eine Stase der Mikrozirkulation mit Sequestration von neutrophilen Granulozyten und Schwellung der Mitochondrien.

3.2. Heterotope Xenotransplantation von Landrasseschweineherzen auf Paviane mit peri- und postoperativer Immunadsorption (LR-h)

3.2.1. Überleben und Todesursache

Zur Verhinderung eines Abstoßungsgeschehens wurde in dieser Gruppe eine präoperative IA durchgeführt. Bei **Pav 08** konnte durch das primär fest gewählte Schema von 4 Zyklen IA der a-pXNA Titer nicht ausreichend gesenkt werden. Nach HAR des Xenografts wurde das Tier 0:55 h nach Reperfusion eingeschlafert. Das Tier **Pav 05** verstarb durch eine massive Nachblutung aufgrund einer aortalen Nahtruptur noch unter Sedation. **Pav 03** entwickelte nach komplikationslosem perioperativem Verlauf einen progredienten, hämorrhagischen Pleuraerguß und verstarb am 11 Tag im Rahmen einer respiratorischen Insuffizienz. Mit dem fehlendem Nachweis einer Transplantatfunktion an Tag 15 wurde der Versuch **Pav 13** terminiert.

	<i>IA-Zyklen</i>	<i>a-pXNA vor IA</i>	<i>a-pXNA nach IA</i>	<i>Organüberleben</i>	<i>Todesursache</i>
<i>Pav 03</i>	4	1:64	1:16	11,3 d	respiratorische Insuffizienz
<i>Pav 05</i>	4	1:256	1:32	5:30 h	Nahtruptur aortal, technisches Versagen
<i>Pav 08</i>	4	1:512	1:128	0:55 h	terminiert, HAR bei insuffiziente IA
<i>Pav 13</i>	12	1:256	1:8	15,2 d	terminiert, AVR, XNA-Wiederanstieg an d8
<i>Pav 07</i>	0	1:64		11:30 h	terminiert, HAR keine IA

Tab. 3.1: Im Mittel 6 Zyklen IA reduzierten die a-pXNA-Titer von $1:272 \pm 91,9$ auf $1:46 \pm 27,8$ in der LR-h Gruppe, das mittlere Überleben betrug $6d 16h \pm 3d 20h$

Aufgrund des Wiederanstiegs des a-pXNA Titers führten wir am 11.Tag eine erneute IA von 10 Zyklen durch und senkten den Titer auf 1:1. Es folgte ein schlagartig auftretender Rebound der a-pXNA bis 1:1024, wodurch das Xenograft im Rahmen einer AVR verloren wurde (s. Tab. 3.1).

3.2.2. Serumchemie

Durch die IA erfolgte die Reduktion von IgM um 65,5 %, von IgG um 83,2 % und von IgA um 59 %, bis zu Zeitpunkt 3h nach Reperfusion fielen die Ig um weitere 20,7 % (IgM), 4,5% (IgG) und 27,4 % (IgA). In Pav 03 und 13 erfolgte bis zum Tag 4 ein erneuter Anstieg auf 34,4 % (IgM), 45,3 % (IgG) und 47,7 % (IgA) des Ausgangswertes, in Pav 13 beobachteten wir nach IA an Tag 11 einen erneuten Rebound. Der a-pXNA Titer zeigte einen dem IgM ähnlichen Verlauf. Auch konnte bei den Komplementfaktoren eine Reduktion durch die IA um 54,3 % für C4 und 55,2 % für C3 festgestellt werden, ab dem 2. postOP Tag erreichten die C-Faktoren wieder den Normbereich. Im Kontrolltier Pav 07 zeigte sich während der Reperfusiondauer ein Abfall um 18 %, bzw. 10,7 % (s. Abb.3.2).

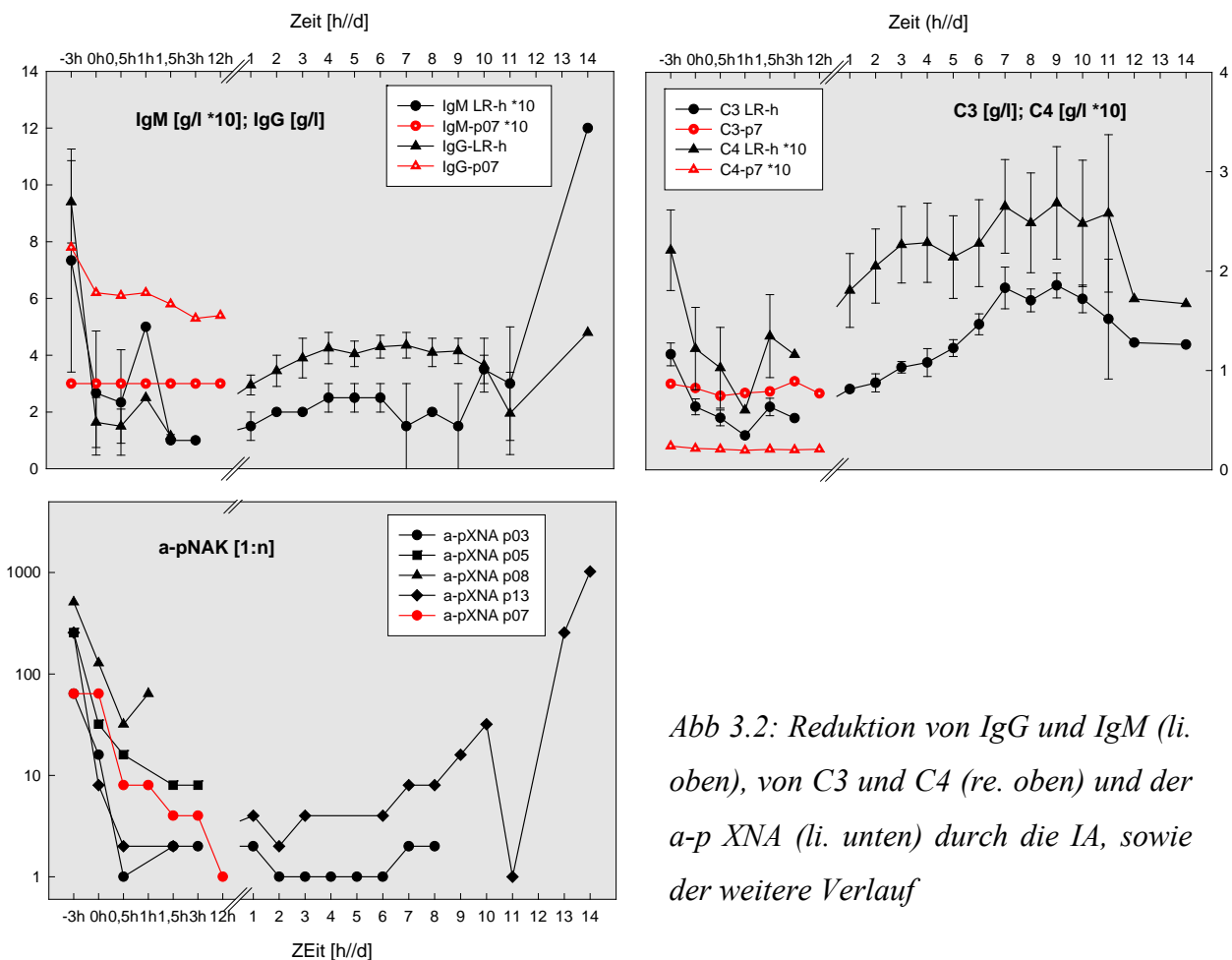


Abb 3.2: Reduktion von IgG und IgM (li. oben), von C3 und C4 (re. oben) und der a-p XNA (li. unten) durch die IA, sowie der weitere Verlauf

Bei den Herzenzymen CK, CK-MB Masse, sowie bei LDH und GOT fand sich erwartungsgemäß ein deutlicher Anstieg nach stattgehabter Manipulation und kalter Ischämie, bzw. perioperativem Schaden mit einem peak für CK-MB und LDH am ersten Tag, Trop I und GOT entwickelten ihren Gipfel erst etwas später. Einen ganz deutlichen und raschen Anstieg beobachteten wir bei Pav 08, Pav 07 hingegen zeigte einen der Versuchsgruppe vergleichbaren Verlauf (s. Abb.3.3).

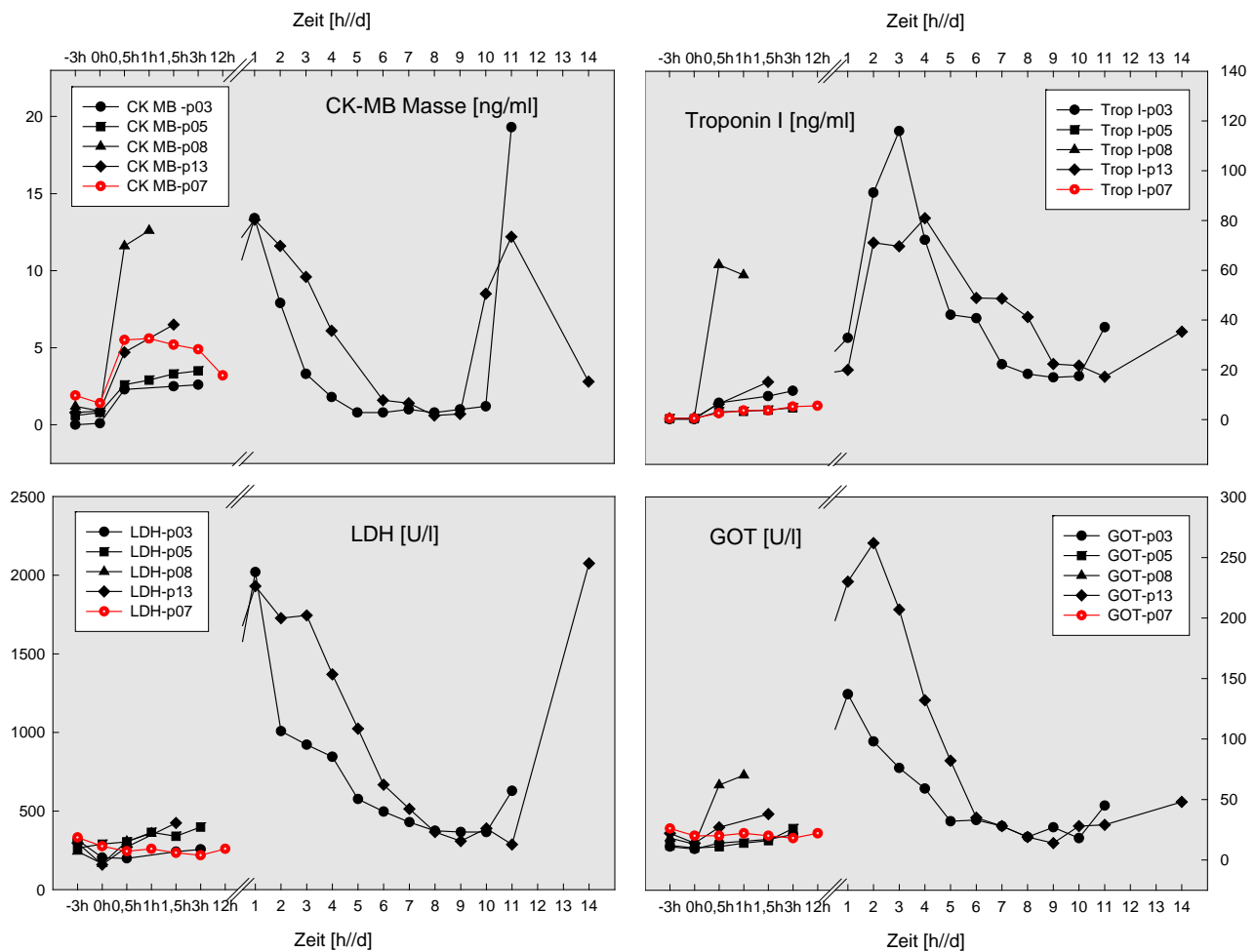


Abb. 3.3: Serumchemischer Verlauf der Herzenzyme CK-MB (li. o.), Troponin I (re. o.), LDH (li. u.) und GOT (r. u.) im perioperativen Verlauf

3.2.3. Histologie/ Immunhistochemie

Versuch Pav 03:

In der Lichtmikroskopie zeigt sich größtenteils vitales Herzmuskelgewebe mit wenigen fokalen Nekrosearealen (10% Nekrose), gering ausgeprägtem intrazellulärem und nahezu fehlendem interstitiellem Ödem. Subepi- und endokardial kann der Nachweis diffuser Hämorrhagien sowie weniger frischer und älterer Thromben gestellt werden.

Versuch Pav 05:

Am vorliegenden Material findet sich neben einem minimalen Nekroseareal (<5% Gesamtgewebe) lediglich ein interstitielles Ödem sowie epikardial geringe, streifige Hämorrhagien. Intravasal können keine Thromben nachgewiesen werden.

Versuch Pav 08:

Es zeigt sich durch die gesamte Wanddicke eine starke hämorrhagische Durchsetzung des Gewebes sowie ein ausgeprägtes interstitielles und intrazelluläres Ödem. Die mikrozirkulatorischen Gefäße, vornehmlich Venolen, sind thrombosiert und granulozytär infiltriert; die mittleren und großen Gefäße erscheinen frei. Myozytärer Zelluntergang ist nicht zu beobachten. Elektronenmikroskopisch findet sich neben den bereits beschriebenen Befunden eine intravasale Sequestration von neutrophilen Granulozyten. An den HMZ finden sich keine Hyperkontraktionen, Fibrillenverluste oder Nekrosen, die dargestellten Mitochondrien zeigen sich außer Verlust der Matrixgranula regelhaft.

	<i>Pav 03</i>	<i>Pav 05</i>	<i>Pav 08</i>	<i>Pav 13</i>	<i>Pav 07</i>
<i>EC-Ruptur</i>	-	-	+++	+++	++++
<i>Ödem inter-/</i> <i>intrazellulär</i>	+/ +	++/ +	++++/ ++	+++/ ++	++/ ++
<i>Hämorrhagie</i> <i>endo-/epikardial</i>	++/+++	-/+	++++/+++	+++/+	+++/>++
<i>Thrombose</i>	++	-	++	++++	+++
<i>Myozytenschaden</i>	~10%	< 5%	~10%	~95%	~50%
<i>Zellinfiltrat</i>	-	-	+++	+++	++
<i>C3</i>	++++	(+)	+++	+++	+++
<i>C4</i>	++	-	+++	++	++++
<i>MAC</i>	-	-	+	+	+
<i>IgM</i>	++	+	++++	++	++++
<i>IgG</i>	-	-	(+)	+++	+

Tab. 3.2: Semiquantitative Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung der Gruppe 2 (LR-h)

Versuch Pav 13:

Äußerst düsteres Bild mit nahezu komplettem Myokarduntergang (95% des Gewebes). Weitestgehender thrombotischer Verschluss sowohl der großen arteriellen und venösen Gefäßen, wie auch der mikrovaskulären Strukturen die gesamte Wandbreite umfassend. Des Weiteren findet man endokardial betonte Hämorrhagien sowie eine perivaskuläre, granulozytäre Infiltration in dieser Region. Epikardial beobachtet man einen fibrinösen Randsaum mit deutlicher zellulärer Infiltration. Elektronenmikroskopisch wird der ausgeprägte Herzmuskelzellenschaden mit Hämorrhagien und Fibrinniederschlägen bestätigt, in den Mitochondrien findet sich eine deutliche Ausfällung von Ca^{2+} .

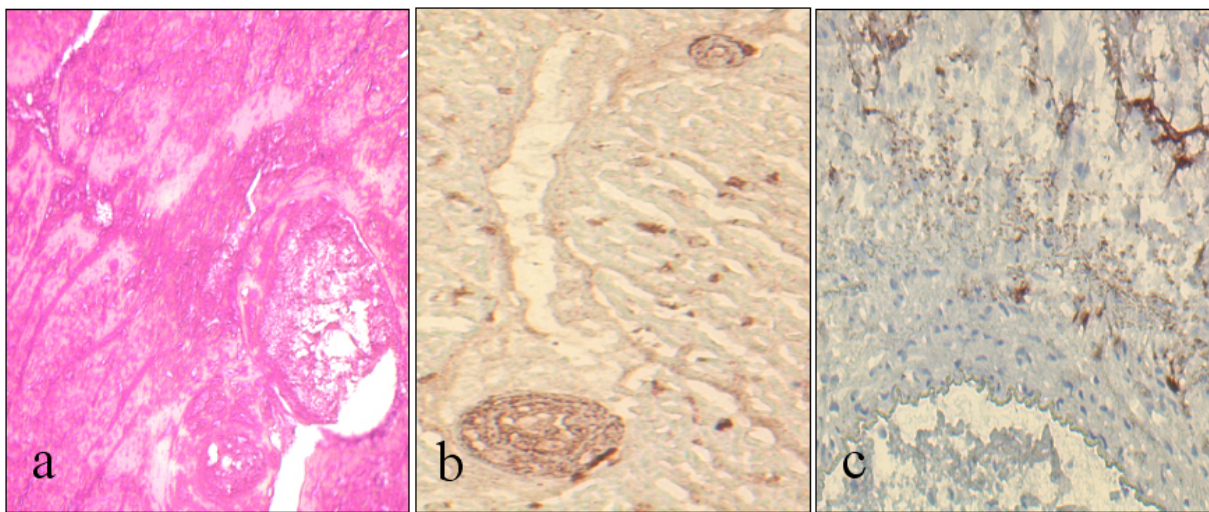


Abb. 3.4: Histologie einer AVR in Pav 13. In der HE-Färbung zeigt sich ein nahezu vollständig zerstörtes Myokard mit Zellkernverlust, nekrotischen Arealen und thrombotischem Verschluss von Venen und Arteriolen (a). Perivaskulär kann IgG (b), im interstitiellen Raum C3 (c) nachgewiesen werden.

3.3. Orthotope Xenotransplantation von Landrasseschweineherzen auf Paviane mit peri- und postoperativer Immunadsorption (LR-o)

3.3.1. Überleben und Todesursache

Auch in dieser Gruppe wurde eine präoperative IA durchgeführt. Die Erfahrung aus vorherigen Versuchen zwang uns zu einer Anpassung der IA-Zyklen an den a-pXNA Ausgangswert sowie die mittels Schnelltest (s. 2.3.3) gemessene Effektivität der IA. Trotz Reduktion des a-pXNA Titers auf 1:64 durch die IA wurde das orthotope Xenograft im Versuch **Pav 10** hyperakut abgestoßen.

Die Organe der Tiere 09, 11 und 12 zeigten nach Reperfusion ein suffiziente Herz-Kreislauffunktion, die durch regelhaftes EKG und Herzecho bestätigt werden konnte. Das Tier **Pav 09** entwickelte, wohl durch die lange extrakorporale Zirkulation (HLA und IA) ein akutes Nierenversagen, an dessen Folgen es nach 24:40 h verstarb. Der Versuch **Pav 11** wurde nach knapp 29h aufgrund eines Multi-Organversagens des Empfängers terminiert. **Pav 12** verstarb nach 23:20h an einem hypoxischen Kreislaufversagen, eine Reintubation erbrachte keinen Erfolg (s. Tab. 3.3).

Der ohne IA durchgeführte Versuch **Pav 06** wurde bei rascher Entwicklung einer fulminanten HAR nach 1 h beendet.

	<i>IA-Zyklen</i>	<i>a-pXNA vor IA</i>	<i>a-pXNA nach IA</i>	<i>Organüberleben</i>	<i>Todesursache</i>
<i>Pav 09</i>	10	1:256	1:8	24:40 h	akutes Nierenversagen
<i>Pav 10</i>	14	1:2048	1:64	5:34 h	HAR insuffiziente IA
<i>Pav 11</i>	14	1:1024	1:32	28:51 h	Multi-Organversagen
<i>Pav 12</i>	14	1:1024	1:32	23:20 h	respiratorische Insuffizienz
<i>Pav 06</i>	0	1:1024		1:00 h	HAR keine IA

Tab. 3.3: Überleben und Verlauf der XNA der orthotopen Landrassegruppe (LR-o)

3.3.2. Serumchemie

Die Adsorption der Ig erfolgte durch die ADA zu 89,3 % für IgM, 97,4 % für IgG und 85,7 % für IgA, der IgM Spiegel veränderte sich in den folgenden 3h nicht, IgG stieg erneut um 3,4%, IgA verminderte sich um weitere 3,5 %. Die Ig reduzierten sich bei Pav 06 bis zum Versuchsende um 63,6% (IgM), 56,2 % (IgG) und 71,4% (IgA).

Die XNA-Titer fiel durch die IA im Mittel um 95,1%, in den ersten 30 min nach Reperfusion um weitere 0,54%. Im Kontrolltier Pav 06 hingegen reduzierte sich der Titer im selben Zeitraum um 75%, bis zum Versuchsende um weitere 12,5%.

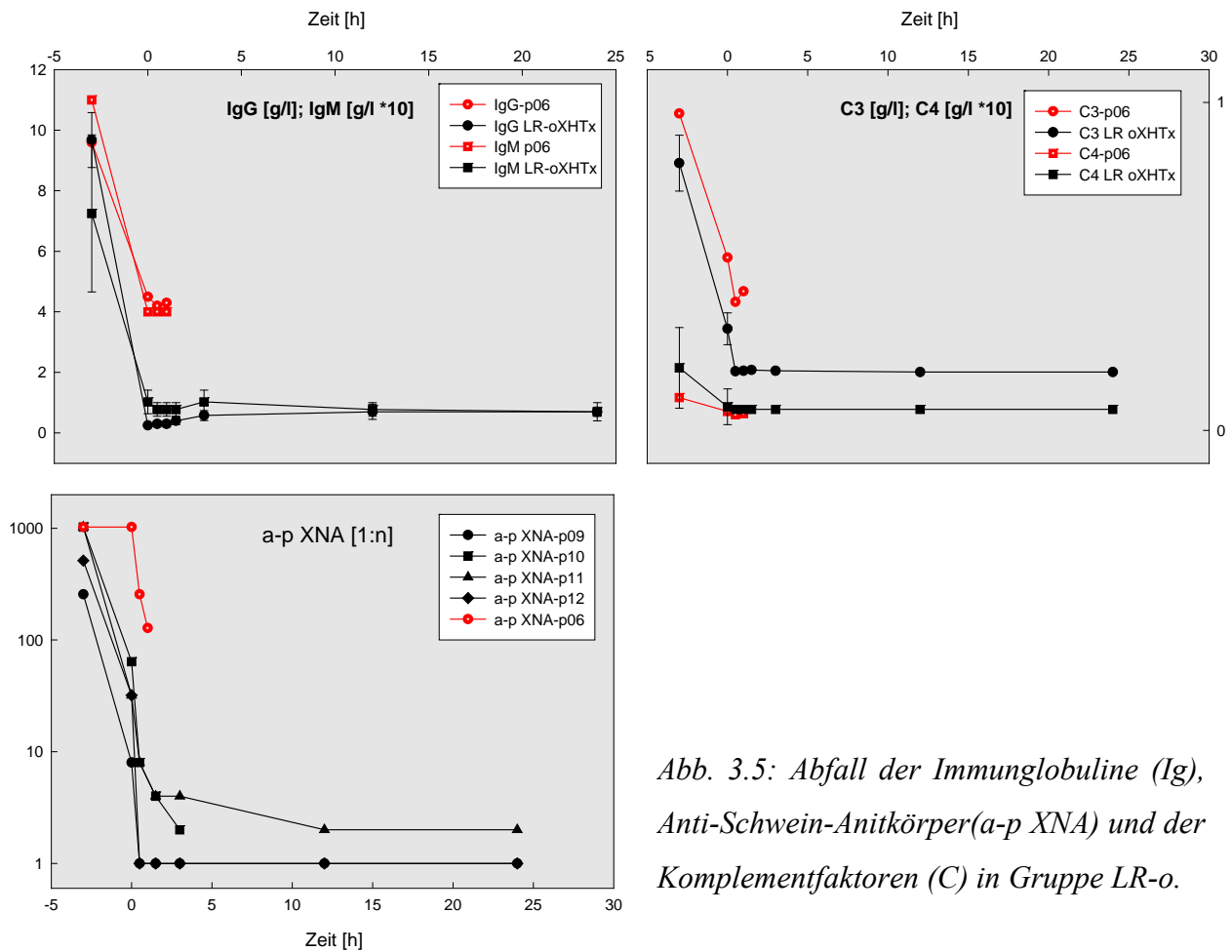


Abb. 3.5: Abfall der Immunglobuline (Ig), Anti-Schwein-Anitkörper(a-p XNA) und der Komplementfaktoren (C) in Gruppe LR-o.

Die C-Faktoren wurden durch die IA in etwas geringerem Maße reduziert (C3 um 61,9 %, C4 um 62,1 %), es folgte in den folgenden 3 h ein Verbrauch für weitere 15,4% (C3), bzw 4,3% (C4) (s. Abb. 3.5).

Im Vergleich zur LR-h Gruppe erfolgte ein deutlich höherer und rascherer Anstieg der Herzenzyme. CK-MB zeigt seinen Gipfel bei etwa 2,5h, Pav 10 und die Kontrolle Pav 06 weisen den steilsten Anstieg ohne nachfolgenden Abfall auf, ähnlich verhält sich das Troponin I. LDH und GOT steigen erst mit einiger Verzögerung auf Maximalwerte an (s. Abb. 3.6).

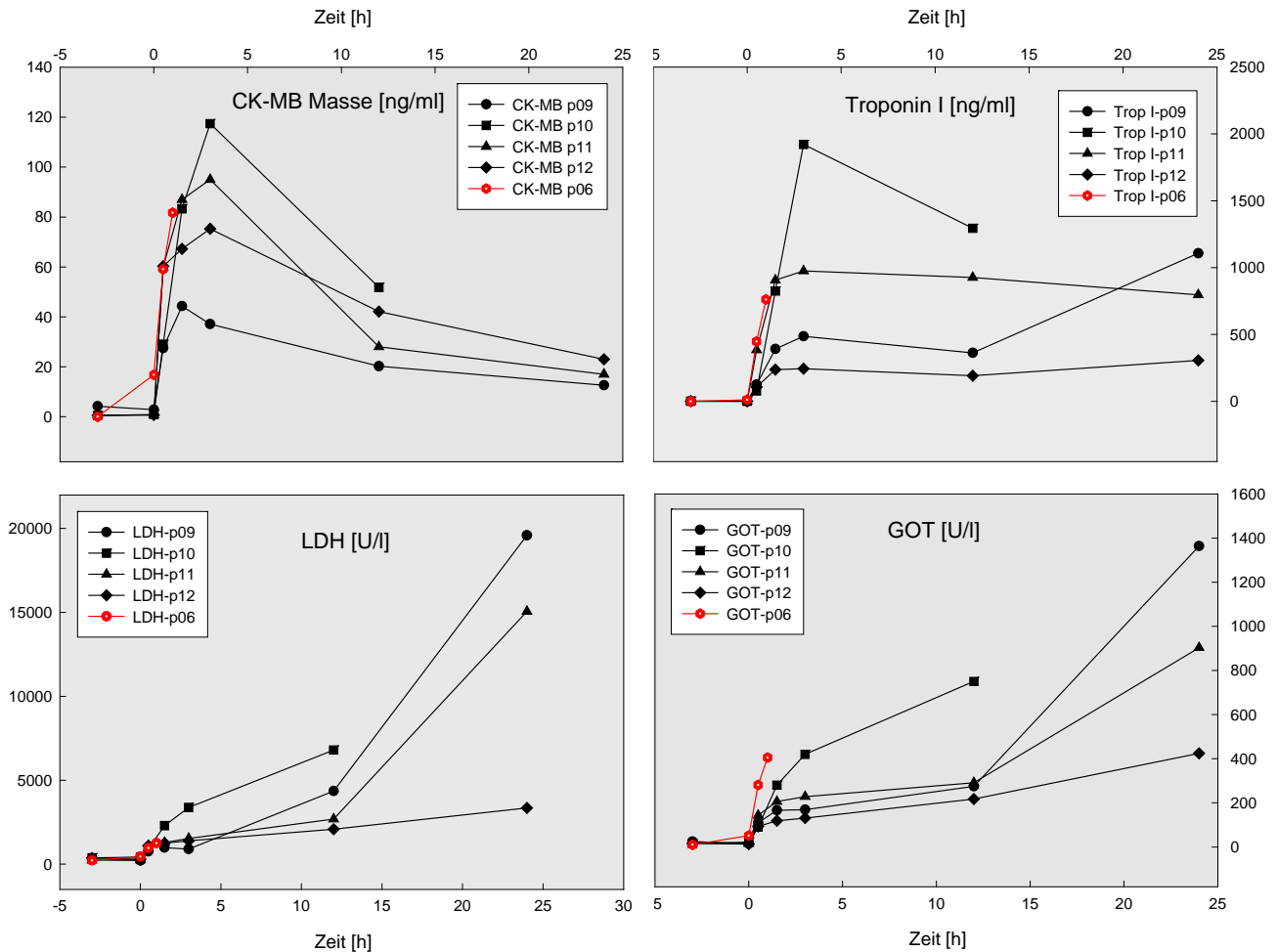


Abb. 3.6: Die Herzenzyme CK-MB, Troponin I sowie LDH und GOT im Verlauf der LR-o Gruppe

3.3.3. Histologie/ Immunhistochemie

Versuch Pav 09:

Neben intaktem HMG finden sich infarktartige Myokardnekrose (30%) mit starken Hämorrhagien. Die großen intramuralen Gefäße sind teilweise durch Fibrin-Plättchenthromben ausgefüllt, in der Mikrozirkulation finden sich einige thrombotische Verschlüsse.

Die ultrafeinstrukturelle Untersuchung aus diesen Bereichen weist fokale Hyperkontraktionen der HMZ auf, die teilweise in Zytoplasmankrosen übergehen. Ferner findet sich der Verlust der mitochondrialen Matrixgranula sowie die perivaskuläre Fibrinexsudation und Granulozytensequestration.

Versuch Pav 10:

Lichtmikroskopisch findet sich eine strukturierte Ausbildung von Hämorrhagien, vornehmlich der Herzinnenwand, sowie ein massives interstitielles Ödem. Vornehmlich die kleinen und mittleren Gefäße sind mit Fibrin- Plättchen- Thromben ausgefüllt, die Ausprägung steigert sich von außen nach innen. Neben Zerreißen von Gefäßwänden kann eine ausgeprägte intravasale und interstitielle Häufung von Granulozyten beobachtet werden.

Die Elektronenmikroskopie beschreibt ein vergleichbares Bild, des weiteren sieht man hier neben Hyperkontraktionsbänden die blasige Abhebung des Sarkolemm, wie auch die fokale Schwellung der Mitochondrien mit Cristae-Ruptur.

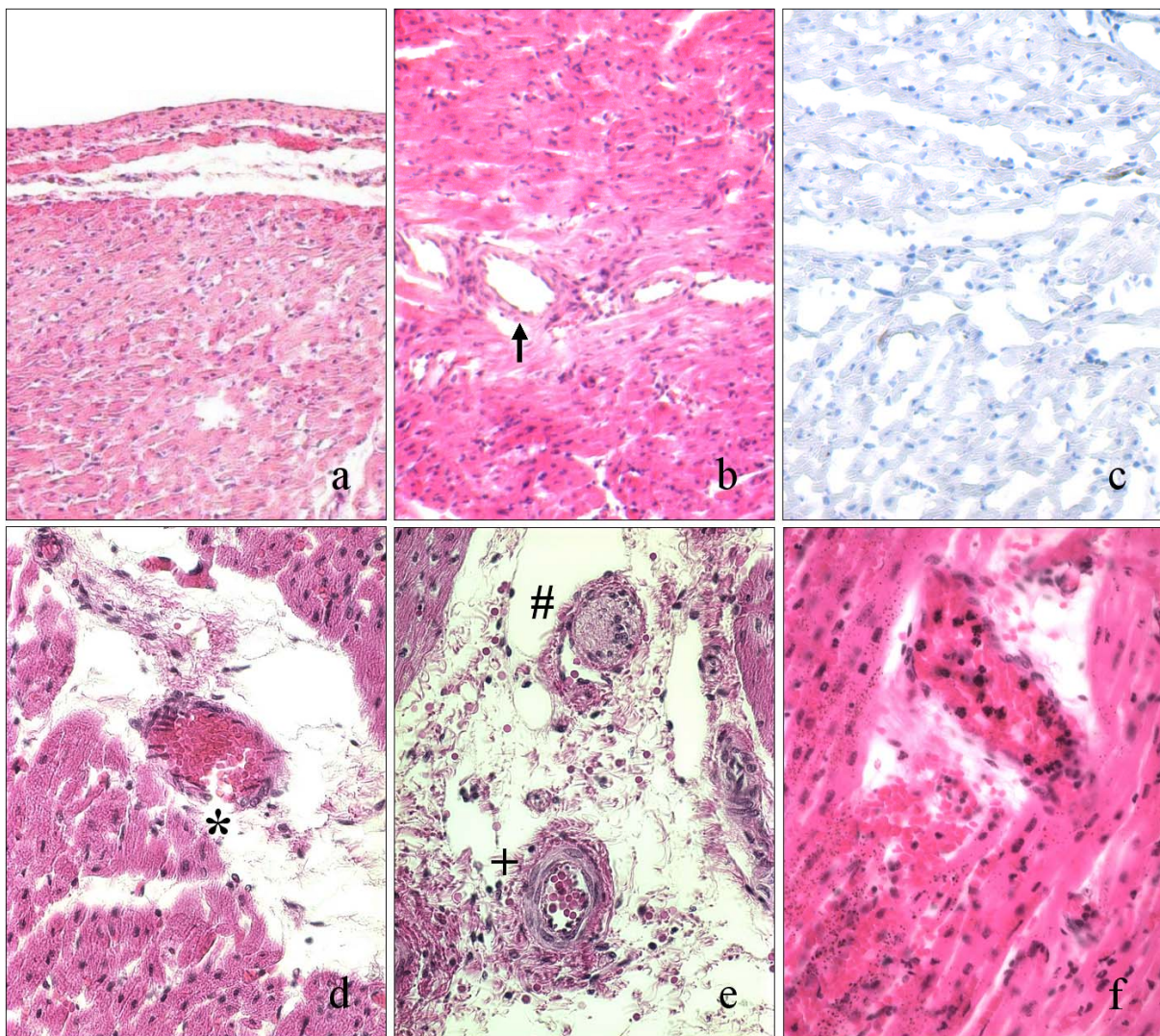


Abb. 3.7: Nahezu unauffälliges Herzmuskelgewebe bei Pav 09 (a, HE, 10x) mit freien Venolen und Arteriolen (b, HE, 20x) sowie nur minimalem Nachweis von C3 (c). Bei Vorliegen einer HAR bei Pav 10 hingegen Gefäßzerreißen (d, HE, 40x), thrombotisierte Venolen (e,# HE, 40x und f, HE, 40x)*

Versuch Pav 11:

Nahezu intaktes Myokard mit einer fokalen, epikardialen Nekrose (<10%) bei mäßiger interstitieller und intrazellulärer Ödembildung. Epikardial findet sich ein streifiges hämorrhagisches Infiltrat bei fehlendem Nachweis mikro-/ makrozirkulatorischer Thromben, lediglich in wenigen Venolen zeigt sich ein Erythrozytensticking.

Versuch Pav 12:

Es stellt sich regelhaftes Myokardgewebe mit perivaskulär gelegenen, jedoch gering ausgeprägten Hämorrhagien dar. Vereinzelt zeigen sich fokale Myokardnekrosen sowie einige wenige thrombosierte kleine Gefäße. Elektronenmikroskopisch findet man die regelhafte Differenzierung der Kardiomyozyten ohne Hinweis für Hyperkontraktionsbanden oder Zytoplasmanekrosen.

	<i>Pav 09</i>	<i>Pav 10</i>	<i>Pav 11</i>	<i>Pav 12</i>	<i>Pav 06</i>
<i>EC-Ruptur</i>	+	+++	-	(+)	++++
<i>Ödem inter-/ intrazellulär</i>	++/ +	++++/ ++	++/ ++	+++/ +	++++/ ++
<i>Hämorrhagie endo-/epikardial</i>	++/+++	+++/+++	+/ +++	+/ +	++++/+++
<i>Thrombose</i>	++	++	(+)	+	++++
<i>Myozytenschaden</i>	~40%	~10%	<10%	~30%	~30%
<i>Zellinfiltrat</i>	+++	++++	-	-	+++
<i>C3</i>	+	+	-	+	+++
<i>C4</i>	(+)	+++	(+)	+	++++
<i>MAC</i>	(+)	++	(+)	(+)	+
<i>IgM</i>	+	++++	+	++	+++
<i>IgG</i>	+	+	-	+	-

Tab. 3.4: Histologische und immunhistochemische Befunde der orthotopen Landrassegruppe

3.4. Heterotope Xenotransplantation von hDAF transgenen Schweinen auf Paviane mit peri- und postoperativer Immunadsorption (DAF-h)

3.4.1. Überleben und Todesursache

In dieser Gruppe kombinierten wir eine immunadsorptive Therapie mit der Verwendung h-DAF transgener Schweine. Die Intensität der Immunadsorption wurde, gemäß der Erfahrungen in den Landrasse-Versuchen, an den Ausgangstiter angepasst. Lediglich im Versuch Pav 19 konnte aufgrund eines Shuntflusses der angestrebte Titer von < 1:32 nicht erreicht werden (s. Tab. 3.5). Mit einem mittleren Transplantatüberleben von rund 5 Tagen wurden alle 4 Herzen durch eine akut vaskuläre Abstoßung (AVR) verloren, keines der transgenen Organe wurde hyperakut abgestoßen. Abgesehen von Pav 19, wobei sich der Titer auf hohem Niveau hielt, war hierbei jeweils ein Rebound der a-p XNA zu beobachten. Bei sonographisch deutlicher Kontraktionsminderung, bzw. völliger Asystolie bei Pav 18 und 21, wurden die Versuche terminiert.

	<i>IA-Zyklen</i>	<i>a-pXNA vor IA</i>	<i>a-pXNA nach IA</i>	<i>Organüberleben</i>	<i>Organverlust/ Todesursache</i>
<i>Pav 14</i>	14	1:1024	1:4	6,2 d	AVR, terminiert
<i>Pav 18</i>	10	1:2048	1:16	3,4 d	AVR, terminiert
<i>Pav 19</i>	6	1:128	1:64	8,0 d	AVR terminiert
<i>Pav 21</i>	10	1:256	1:16	2,4 d	AVR terminiert

Tab. 3.5: Verlaufparameter der heterotop transplantierten DAF-transgenen Schweineherzen

3.4.2. Serumchemie

Auch in dieser Gruppe erfolgte eine deutliche Reduktion der Ig durch die IA (Zeitpunkt –3 bis 0), vornehmlich von IgG (98,9%) aber auch deutlich von IgM (78,6%) und IgA (64,9%). In der Reperfusionphase kam es lediglich bei IgA zu einem Verbrauch ([h 0,5] -3,6% und [d1]

-17,9%) um einen Rebound auf 85,7% des Ausgangswertes zu erlangen, IgG stieg bis Versuchende stetig auf 58,8% des Ausgangs. IgA stieg mit einem Zwischengipfel an d2 (48,7% d. Ausg.) auf 54% an d8. Nach Entfernung der C-Faktoren um 54,5% (C3) bzw. 56,2% (C4) erfolgte nach weiterem minimalen Abfall in der Frühphase ein Anstieg auf 91,3% d.A. an d3 (C3), bzw. auf 81,9% an d2 für C4, um im weiteren erneut abzufallen.

Durch die präop. IS sowie die IA wurde der mittlere a-pXNA um 93,2% gesenkt, um – abgesehen von p21- ohne weiteren Abfall in der Reperfusion einen deutlichen Rebound zu entwickeln (z.B. p18 an d2 oder p14 an d6) (s. Abb.3.8).

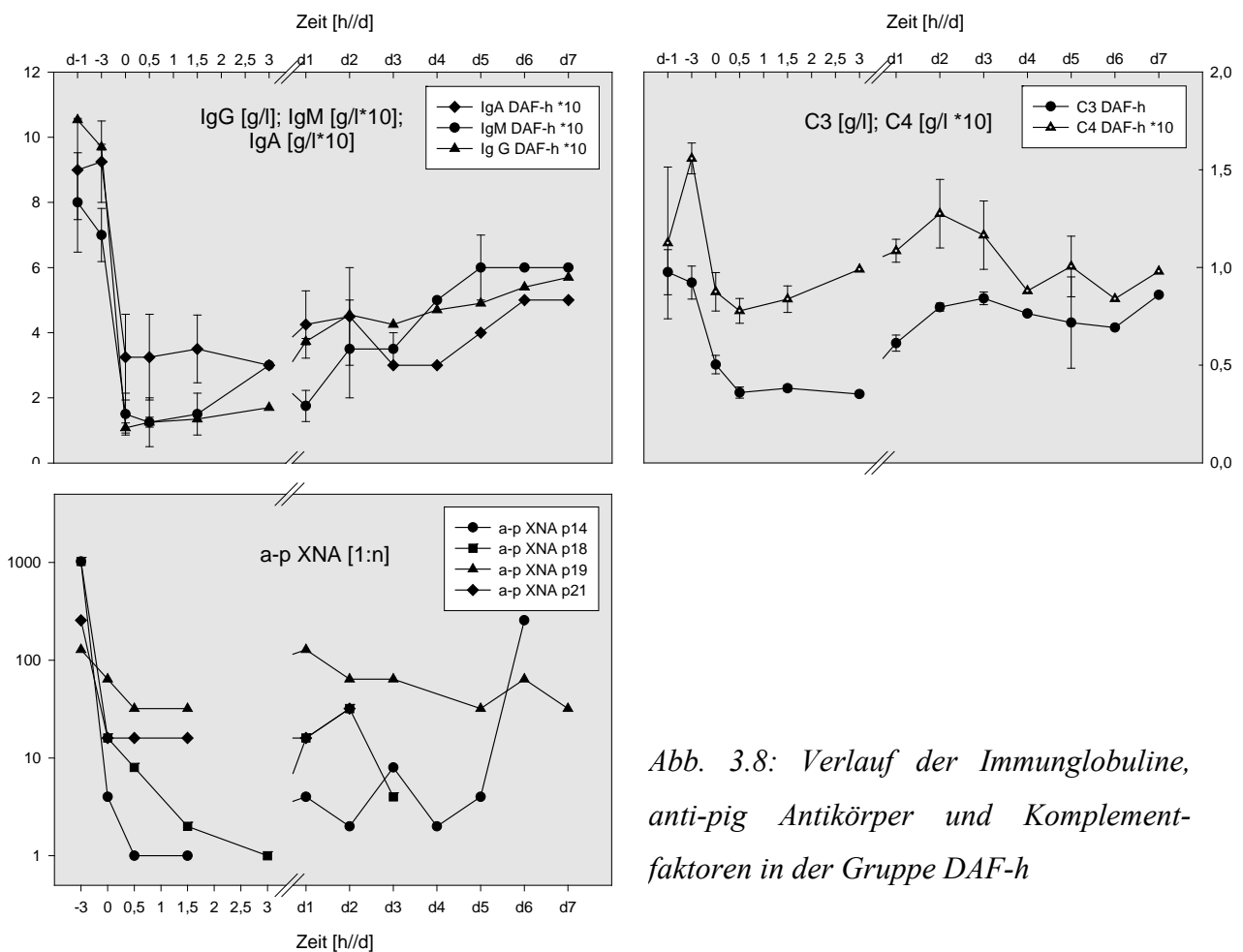


Abb. 3.8: Verlauf der Immunglobuline, anti-pig Antikörper und Komplementfaktoren in der Gruppe DAF-h

Die Herzenzyme CK-MB und Trop I zeigten einen erwartungsgemäßen Gipfel bei 12h bis 48h nach Manipulation und Ischämie in allen Versuchen, um dann erneut zu fallen (p14, p18, p19), die höchsten Werte waren bei p18 zu verzeichnen. Der erneute Anstieg ist als Zeichen einer statthabenden AVR zu deuten. Ein ähnlicher Verlauf war bei den enzymatischen Myokardparametern LDH und GOT zu beobachten (s. Abb. 3.9).

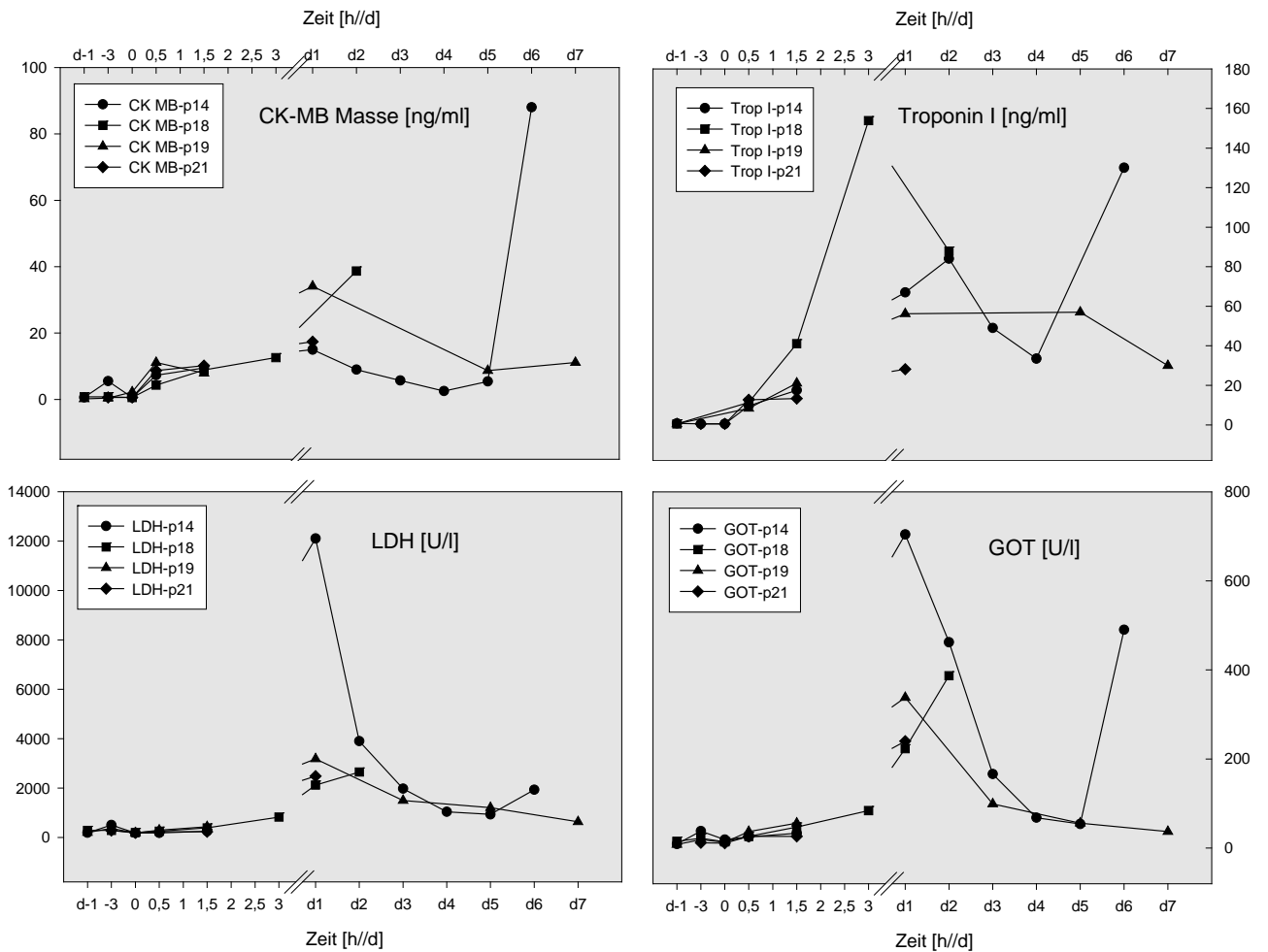


Abb. 3.9: Verlauf von CK-MB, Troponin I, LDH und GOT in der Gruppe DAF-h

3.4.3. Histologie/ Immunhistochemie

Versuch Pav 14:

Es stellt sich eine ausgeprägte, dem Epikard zugewandte hämorrhagische Schädigung mit deutlichem interstitiellem Ödem dar. Trotz dieses ausgeprägten Befundes finden sich nur fokale Nekroseareale (20% des Gesamtgewebes) mit vollständigem Zellkernverlust und Auflösung der Myokardstruktur. In den großen Gefäßen können alte, bereits organisierte Thromben nachgewiesen werden, in der Endstrombahn finden sich teils ältere, teils frische Thromben sowie eine deutliche Gefäßwandruptur mit nachfolgender zellulärer Extravasation und fibrinösem Niederschlag.

	Pav 14	Pav 18	Pav 19	Pav 21
<i>EC-Ruptur</i>	++++	+++	+++	++++
<i>Ödem inter-/ intrazellulär</i>	+++/ ++	++/ ++	+++/ +++	+++/ +++
<i>Hämorrhagie endo-/epikardial</i>	+++/ ++	+/ +++	++/ +++	++/ ++++
<i>Thrombose</i>	++	++++	++++	++++
<i>Myozytenschaden</i>	~20%	~30%	~90%	~70%
<i>C3</i>	++	-	++	+
<i>C4</i>	++	-	+	-
<i>MAC</i>	++	-	++	++
<i>IgM</i>	++	-	++	(+)
<i>IgG</i>	++	+	+++	++
<i>DAF</i>	++	+++	(+)	++

Tab: 3.6: Histologische und immunhistochemische Befunde der Gruppe DAF-h

Versuch Pav 18:

Diffuse, epikardial-seitig akzentuierte Hämorrhagien mit dem Nachweis frischer und älterer Thromben in zahlreichen arteriellen und auch einigen venösen Gefäßen, ferner findet sich die ausgeprägte Ausbildung eines interstitiellen und intrazellulärem Ödems. Die ausgedehnten, infarktartigen Myokardnekrosen mit vollständigem Zellkern/-Stukturverlust zeigen ihre Hauptschädigung zum Endokard hin und bessern sich zur Herzaußenseite. Die Ausprägung der Gefäßthrombosierung ist in analoger Weise zu beobachten. Des weiteren ist eine deutliche granulozytäre Infiltration des perivaskulären Gewebes zu beobachten.

Die Elektronenmikroskopie beschreibt, neben massiven Hämorrhagien und ausgeprägten inter- und intrazellulären Ödemen, eine deutliche Myozytolyse mit Verlust der Aktin-Myosin-Struktur sowie einer Verkalkung der mitochondrialen Matrix. Ferner finden sich intravaskuläre Fibrinthromben, sowie die deutliche Fibrinausschwemmung ins interstitielle Gewebe.

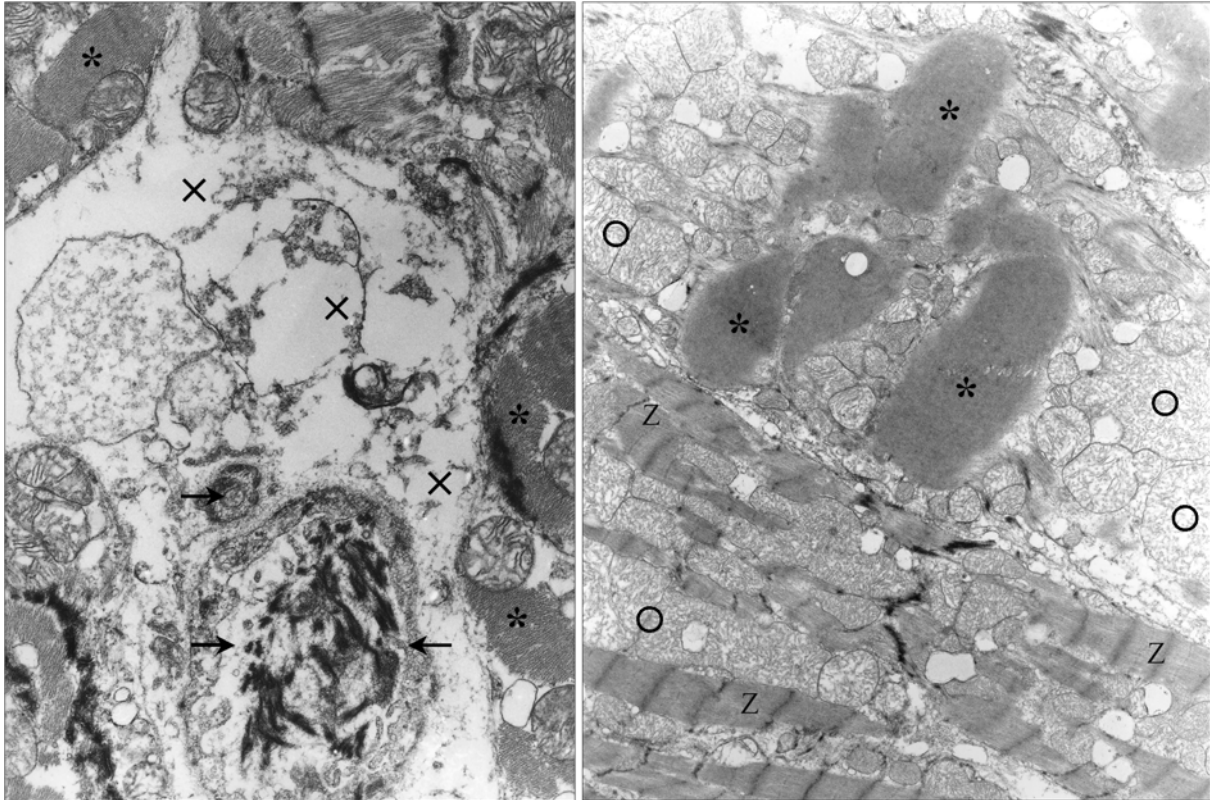


Abb. 3.10: Elektronenmikroskopisch findet sich ein ausgeprägtes interstitielles Ödem sowie Fibrinthromben in der Mikrovaskularisation (→). Rechts sieht man neben normalen Herzmuskelzellen (Z) myozytären Hyperkontraktionsbanden () sowie eine ödematöse Schwellung der Mitochondrien als Ausdruck der abstoßungsbedingten Schrankenstörung (○).*

Versuch Pav 19:

Diffuse Hämorrhagien in Umgebung der großen Gefäße mit deutlicher granulozytärer Infiltration. Multiple Thromben nahezu aller Gefäße (arteriell/ venös) der Mikro- und Makrozirkulation werden begleitet von einer, nahezu das gesamte Gewebe betreffenden, infarktartigen Myokardnekrose (90% des Gesamtgewebes), lediglich in Subepi- und endokardialen Schichten findet man einige vitale Myozyten.

Die ausgedehnte Myokardnekrose mit Verlust der Zellstruktur wird in der ELMI bestätigt, hier wird ferner auf zellulärer Ebene die Mikrokalzifizierung der Mitochondrien sowie eine multiple Fibrinthrombenbildung im Gefäßsystem beschrieben.

Im Bereich der interstitiellen Hämorrhagien findet sich immunhistochemisch die diffuse Anreicherung von C3, MAC, IgM und IgG, sowie der fokale Nachweis von C4.

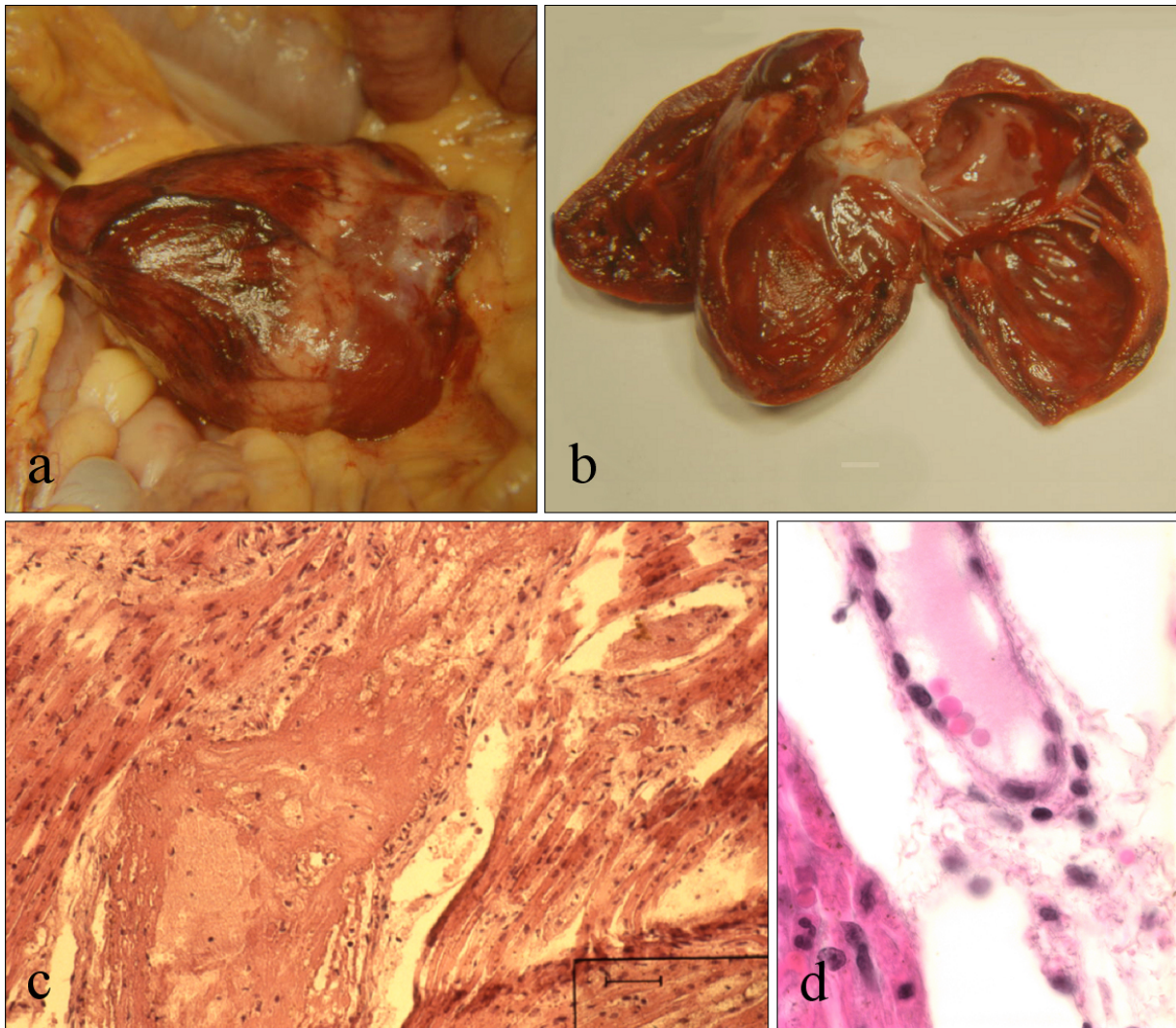


Abb. 3.11: Durch eine AVR abgestoßene, heterotope, hDAF-transgene Transplantate zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Links oben venöse Stauung des ansonst noch frisch wirkenden HMG in situ (a, Pav 19), das nach Eröffnung fokale hämorrhagische Areale zeigt (b, Pav 19). Mikroskopisch imponiert ein nahezu vollständig zerstörtes Gewebe (c, Pav 14, HE 10x) mit Thrombosierung der großen und kleinen venösen Gefäße (d, Pav 21, HE 100x).

Versuch Pav 21:

Hier findet sich Licht- wie Elektronenmikroskopisch das ausgeprägte Bild einer myozytären Schädigung, die sich großflächig über das Gewebe zieht (70%). Der Zelluntergang geht einher mit einem interstitiellen und intrazellulärem Ödem sowie Thrombosen der mikro- und makroskopischen Gefäße. Der mehrfach nachweisbaren Ruptur der EC-Verbände folgend ist das Gewebe mit kräftigen Hämorrhagien durchsetzt.

Immunhistochemisch zeigt sich vornehmlich eine mäßige Anfärbung von IgG an den EC sowie ein minimaler fokaler Nachweis von C3.

3.5. Orthotope Xenotransplantation von hDAF transgenen Schweinen auf Paviane ohne Immunadsorption (DAF-o)

3.5.1. Überleben und Todesursache

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des h-DAF Proteins im xenogenen Organismus führten wir in dieser Gruppe einen möglichst klinischen Versuchsaufbau durch, indem die Organe orthotop – also im lebenserhaltenden Modell – und ohne vorherige IA transplantiert wurden. Das Tier **Pav 15** erhielt aufgrund einer klinisch wirksamen Anämie am 2. pOP 250 ml mehrfach gewaschene, humane Erythrozyten der Blutgruppe 0 Rh negativ. Nach Gabe einer Testdosis von 20 ml und anschließender Überprüfung einer Kreuzreaktion, bzw. einer Hämolyse (Mikroskop/ Laborchemie) erfolgte die problemlose Transfusion. Das Tier litt an den Tagen 5-10 an intermittierend Diarrhöen mit Temperaturen bis 39,5°C, unter breiter antibiotischer und symptomatischer Behandlung klangen die Symptome ab. Bei einem zunehmenden ANV mit generalisiertem Ödem, Lungenödem und drastischem Anstieg der Retentionsparameter ([d11]: Krea 9,4 mg/dl; Hst 445 mg/dl; K⁺ 6,8 mmol/l) wurde das Tier bei adäquater Transplantatfunktion eingeschläfert.

	<i>a-pXNA</i>	<i>Verlauf</i>	<i>Organüberleben</i>	<i>Organverlust/ Todesursache</i>
<i>Pav 15</i>	1:128	Diarrhoe [d5-10], Temp >39 [d5], 250 ml hum. EK [d2],	11d 2h	akutes Nierenversagen, terminiert
<i>Pav 16</i>	1:1024	Konservierungsschaden bei Kardioplegie	1:03 h	akutes Tx-Versagen
<i>Pav 17</i>	1:4096	Erbrechen [d8-13], Temp >39 [d10], Sinustachykardie [d5-8]	19d 16h	reanimationspflichtige Anämie
<i>Pav 20</i>	1:256	Gastritits, ischämische Dünndarmulcera	13d 1h	Ileus, terminiert

Tab. 3.7: Verlaufs- und Todesdaten der orthotop transplantierten Tiere mit hDAF-transgenen Spenderherzen

Bei der Explantation des Spenderorganes von **Pav 16** kam es zu einer inadäquaten Perfusion des Graft, welches hierbei für einige Minuten gegen die geschlossene Aortenklemme pumpte und dabei überblähte. Bei Reperfusion des Organs zeigte sich rasch ein low-output-Syndrom

mit finalem Kammerflimmern nach 1h, makroskopisch zeigte das Herz nicht die für eine HAR typische, düster hämorrhagische Verfärbung.

Das längste Überleben war bei **Pav 17** zu beobachten: Bei bis dahin klinisch gut tolerierter, chronischer Anämie kam es am 20. pOP zu einem reanimationspflichtigen, hämodynamischen Schock mit Kammerflimmern und längerer Hypoxie, so dass der Versuch nach Transfusion von 250 ml humanen EK (mehrfach gewaschen, Blutgruppe 0 Rh negativ) und insgesamt 60 minütiger mechanischer und medikamentöser Reanimation abgebrochen wurde. Das Tier zeigte bis dahin eine gute Transplantatfunktion mit kontinuierlichem Sinusrhythmus ohne jegliche ST-Veränderungen, es fielen lediglich intermittierende hypotone, tachykarde Phasen (RR 80/60, 140/min) auf, die durch Volumengabe gut zu therapieren waren. Ein gastrointestinaler Infekt von d8-15 mit Erbrechen, Durchfällen und Temperaturen um 39°C konnte durch testgerechte Antibiose behandelt werden.

Pav 20 fiel bei guter kardialer Transplantatfunktion mit einem zunehmenden Gewichtsverlust (insg. 4,6 kg) sowie verminderte Nahrungsaufnahme auf. Unter Protonenpumpeninhibitor-Therapie (Pantoprazol) kam es am 10. pOP zu einer transfusionspflichtigen ([d11]: 500 ml humane EK, mehrfach gewaschen, BG 0 Rh neg) gastrointestinalen Blutung mit Teerstuhl und blutigem Magensekret. Bei zunehmender Darmatonie im Sinne eines paralytischen Ileus wurde das Tier am 13. pOP eingeschläfert. Bei der Sektion fanden sich neben einer ausgeprägten Gastritits ein perforiertes Dünndarmulkus sowie mehrere ischämischer Dünndarmläsionen; ein malignes Geschehen im Sinne eines Lymphoms des Magens konnte histologisch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.



Abb. 3.12: Bei dem Magenulcus von Pav 20 (links) konnte ein Lymphom nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Im Bereich des Jejunum im selben Tier fand sich ein perforiertes, ischämisches Ulkus, das zur Beendigung des Versuches führte (rechts).

3.5.2. Serumchemie

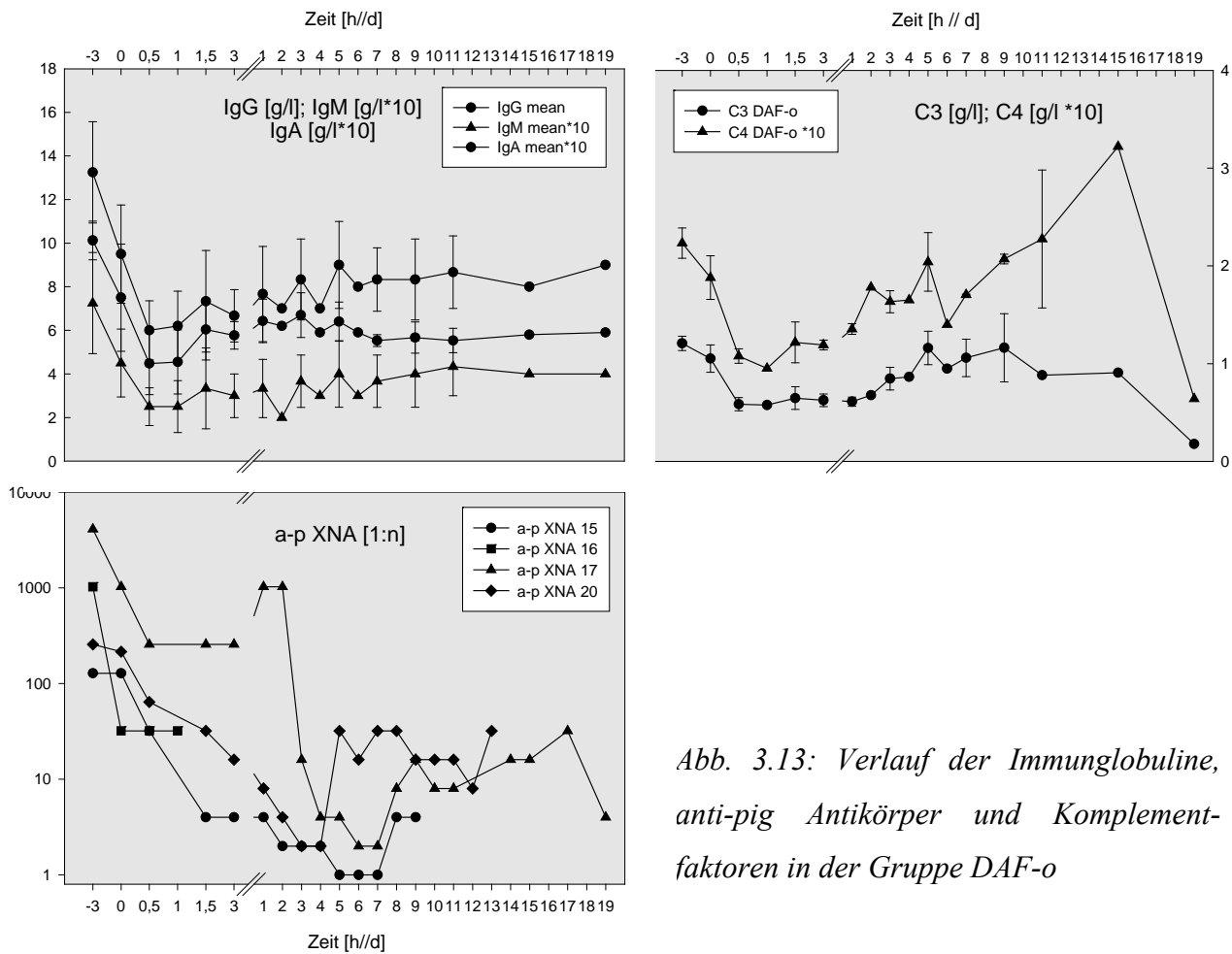


Abb. 3.13: Verlauf der Immunglobuline, anti-pig Antikörper und Komplementfaktoren in der Gruppe DAF-o

Obwohl keine IA durchgeführt wurde, erfolgte eine deutliche Reduktion der zirkulierenden IgM (37,9%), IgG (25,9%) und IgA (28,3%) bis zum Zeitpunkt der Reperfusion. Bereits 30 min. nach Reperfusion wurden die niedrigsten Werte erreicht (IgM 34,5%; IgG 44,2%; IgA 45,3% jeweils vom Ausgangswert) um im weiteren Verlauf kontinuierlich, jedoch nur mäßig anzusteigen. Ein ganz ähnlicher Verlauf war bei den C-Faktoren zu verzeichnen, der Abfall an d19 ist durch die Reanimationsbedingungen bei Pav17 zu werten. Auch die a-pXNA zeigten einen kurzfristigen perioperativen Abfall, um sich im Folgenden mäßig zu regenerieren. Die Herzenzyme der ersten 24h pOP wiesen einen deutlichen Gipfel mit einem gemittelten Maximum von 151 ng/ml für CK-MB und 872 ng/ml für Troponin I, 252 U/l für GOT und 3251 U/l für LDH auf.

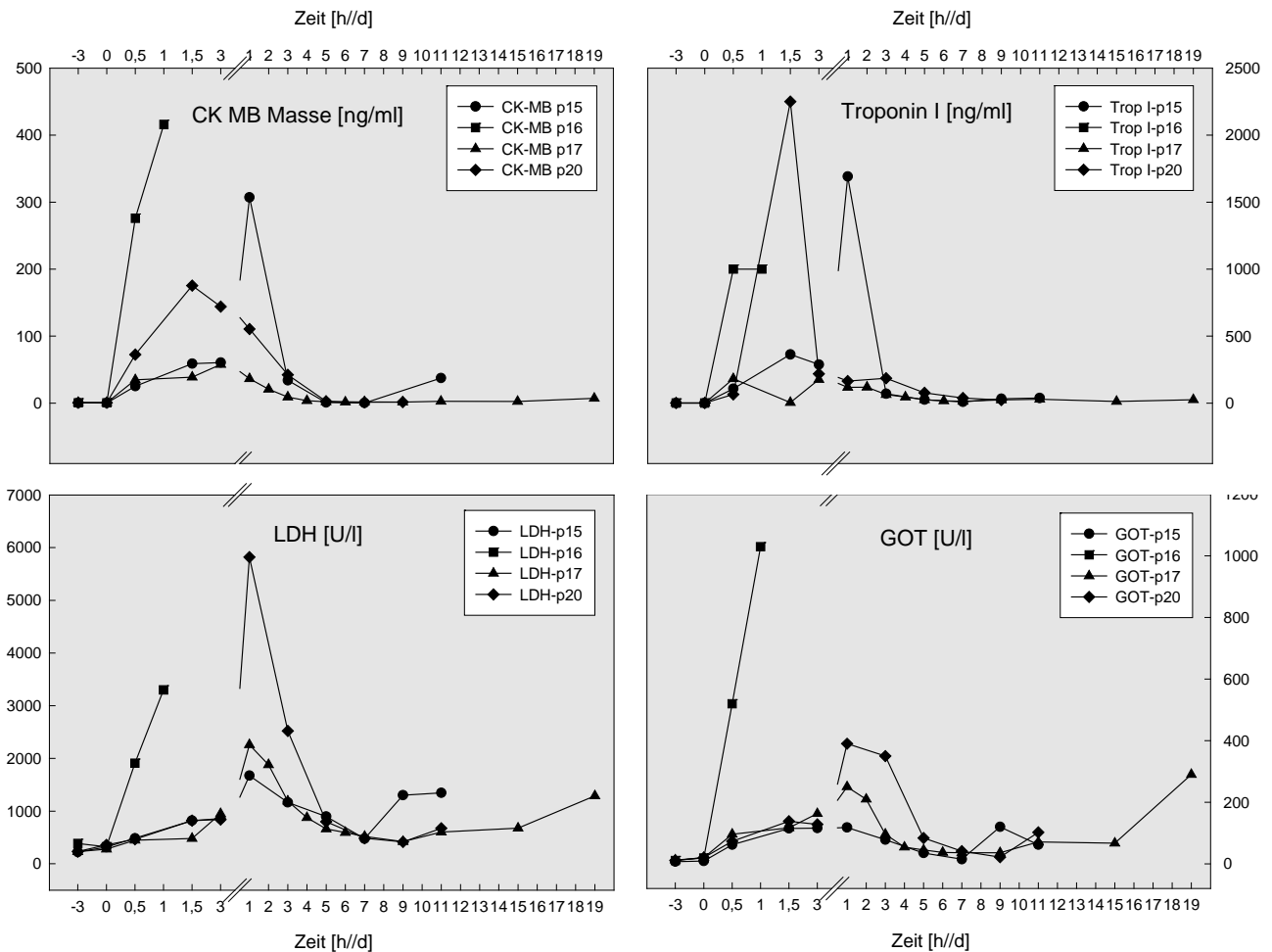


Abb. 3.14: Der perioperative Anstieg der kardialen Enzyme fiel bei suffizienter Organfunktion der Gruppe DAF-o wieder ab, um bei der darauf folgenden AVR erneut zu steigen.

3.5.3. Histologie/ Immunhistochemie

Versuch Pav 15:

Nahezu intaktes Herzmuskelgewebe mit kleinfleckigen, disseminierten frischen und abgeräumten Nekrosearealen (<10%) und mäßigem interstitiellem Ödem. Im Bereich frischer Nekrosen finden sich fokale Hämorrhagien sowie ein intrazelluläres Ödem. Des weiteren ist der vereinzelte Nachweis von venösen Thrombosen zu treffen. Am Epikard ist eine frische fibrinöse Exsudation nachzuweisen.

Versuch Pav 16:

Es zeigt sich Myokardgewebe mit einem endokardial betontem, interstitiellem Ödem sowie fokalen, insgesamt jedoch gering ausgeprägten frische Hämorrhagien ohne den Nachweis von intraluminalen Thromben. Lichtmikroskopisch können keine Nekrosen festgestellt werden (Myozytenschaden <5%). Auffällig ist die intra- sowie paravaskuläre Anreicherung von segmentkernigen Granulozyten.

	<i>Pav 15</i>	<i>Pav 16</i>	<i>Pav 17</i>	<i>Pav 20</i>
<i>EC-Ruptur</i>	+	++	-	+
<i>Ödem inter-/ intrazellulär</i>	++/ ++	+++/ (+)	+/ +++	++/ +++
<i>Hämorrhagie endo-/epikardial</i>	+/+	+/>++	+/>++	+/>++
<i>Thrombose</i>	-	+	+	++
<i>Myozytenschaden</i>	< 10%	~5%	~30%	~30%
<i>Zellinfiltrat</i>		++	++	+
<i>C3</i>	+	++	++	+
<i>C4</i>	+	++	+	+
<i>MAC</i>	-	+	-	-
<i>IgM</i>	++	+++	+++	++
<i>IgG</i>	+++	+	+	+
<i>DAF</i>	++	+++	++	+++

Tab. 3.8: Histologische und immunhistochemische Befunde der Gruppe DAF-o

Versuch Pav 17:

Am Myokard beobachtet man ein diffuses interstitielles sowie intrazelluläres Ödem mit Vakuolisierung der Kardiozyten. Neben vitalem Herzmuskelgewebe erkennt man apikal (50%) und endokardial (30%) akzentuierte, teils konfluierende Myokardnekrosen. In diesem Bereich können mehrfach Mikrothromben sowie Hämorrhagien nachgewiesen werden. Epikardial, vornehmlich an der Hinterwand stellt sich eine fibrinöse Entzündungsreaktion dar.

Elektronenmikroskopisch findet sich ein hochgradig intrazelluläres Ödem mit Schwellung der Mitochondrien, fokale Myokardnekrosen, mehrfache Mikrothromben mit Fibrinabscheidung sowie interstitielles Fibrin.

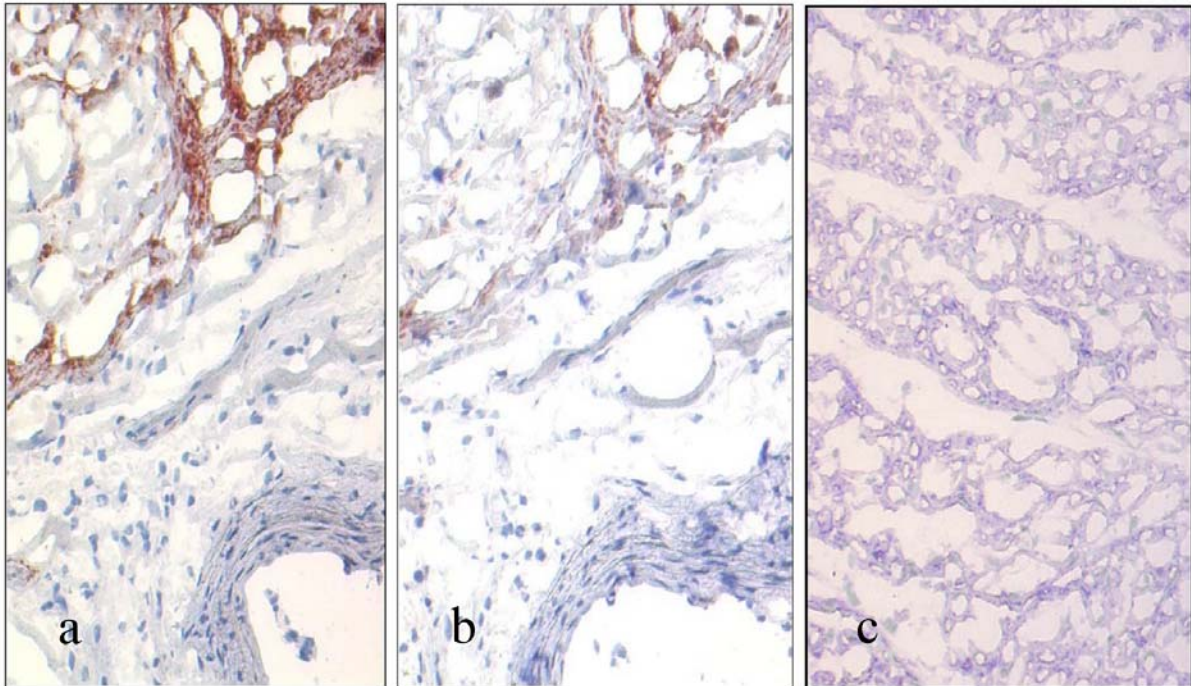


Abb. 3.15: Nach 20 Tagen orthotoper, xenogener Transplantation eines hDAF-transgenen Schweineherzens findet sich eine geringe Ablagerung von C3 (a) und C4 (b) vorwiegend im interstitiellen Raum. C5b-9 (MAC) kann nicht nachgewiesen werden (Pav 17).

Versuch Pav 20:

Mäßig ödematös aufgelockertes Myokard mit mäßiger, diffuser hämorrhagischer Durchsetzung und fokalem Nachweis älterer und frischer Mikro-/ Makrothromben mit intravaskulärem Fibrin, sowie eine vornehmlich im äußeren Drittel der Herzwand befindlichen interstitiellen Fibrinexsudation. Zu beobachten sind fokale Ischämie- und Nekroseareale mit tlws. vollständigem Zelluntergang (30%) umgeben von gesunden Herzgewebe.

Im Ultradünnschnitt fällt zudem eine Vakuolisierung der mitochondrialen Matrix auf.

Immunhistochemisch stellt man eine mäßig bis geringe Anreicherung von IgM, IgG sowie perivaskulär von C3 und C4 fest, der MAC kann nicht nachgewiesen werden.

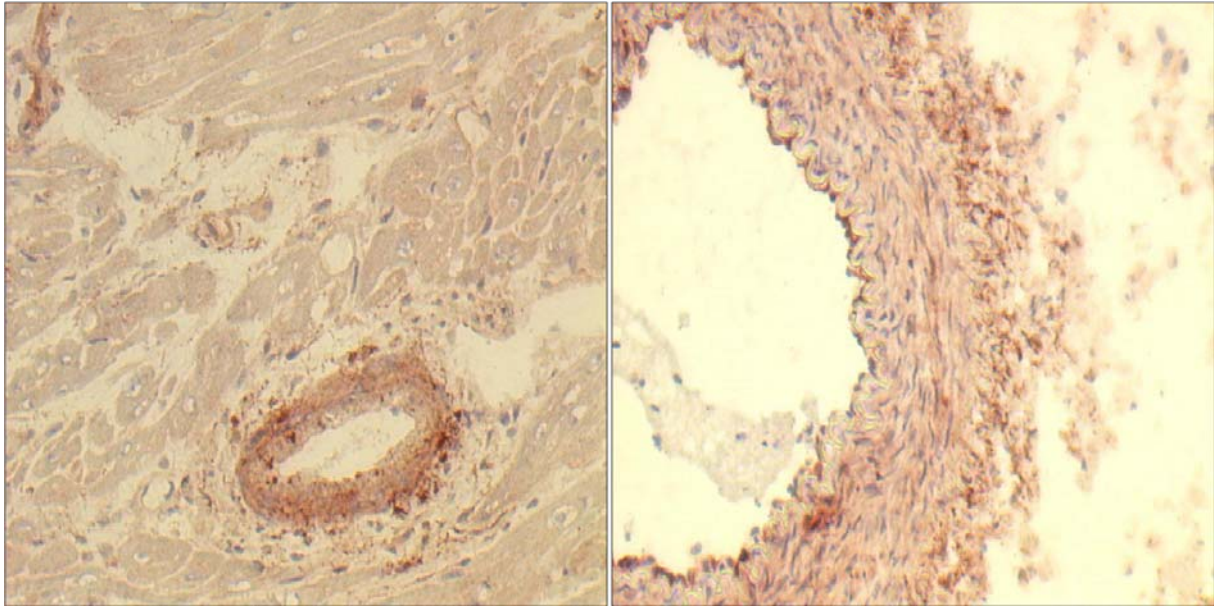


Abb. 3.16: Immunhistochemischer Nachweis der hDAF-Expression auf dem Schweineendothel der Versuche Pav 19 (rechts) und Pav 20 (links).

4. Diskussion

4.1. Evaluierung des Abstoßungsmodells

Um eine HAR im Schwein –Primatenmodell zu evaluieren, erfolgten zwei Versuche ohne IA: Nach heterotoper xenogener Herztransplantation (Pav 7) versagte das Xenotransplantat nach 11,5 h aufgrund einer HAR, im orthotopen Aufbau (Pav 6) ohne IA erfolgte bereits nach 1h das Vollbild einer HAR. Makroskopisch weist vor allem das orthotop transplantierte Organ die typische düstere Veränderung rasch nach Reperfusionbeginn mit zunehmender Schwellung des Myokards vor. Die Kreislauffunktion konnte bei persistierendem Kammerflimmern nicht mehr aufrecht erhalten werden. Das histologische und immunhistochemische Bild bestätigte die bereits ausführlich beschriebenen (Lexer 1986, Rose 1991) Veränderungen einer HAR. Im heterotopen Kontrollversuch kam es zu keinem so raschem Verlust des Transplantates. Bei anfänglich zufriedenstellender Organfunktion wurde das Abdomen rasch verschlossen. Sonographisch diagnostizierten wir jedoch bald zunehmende Unregelmäßigkeiten der Herzaktion, so dass unter erneut vertiefter Narkose relaparotomiert und das Schweineherz inspiziert wurde. Bei äußerlich nur fleckiger Verfärbung und mäßiger Schwellung wurde der Versuch bei dann aussetzender Transplantatfunktion nach 11h 30min terminiert. Das eröffnete Xenotransplantat wies eine livide Verfärbungen der Myokardinnenseite mit kleinen Adhäsionsthromben auf. Das

histologisch gewonnene Bild mit deutlicher Einlagerung von IgM und positivem MAC bestätigte die klinische Diagnose einer HAR (s. Abb. 4.1).

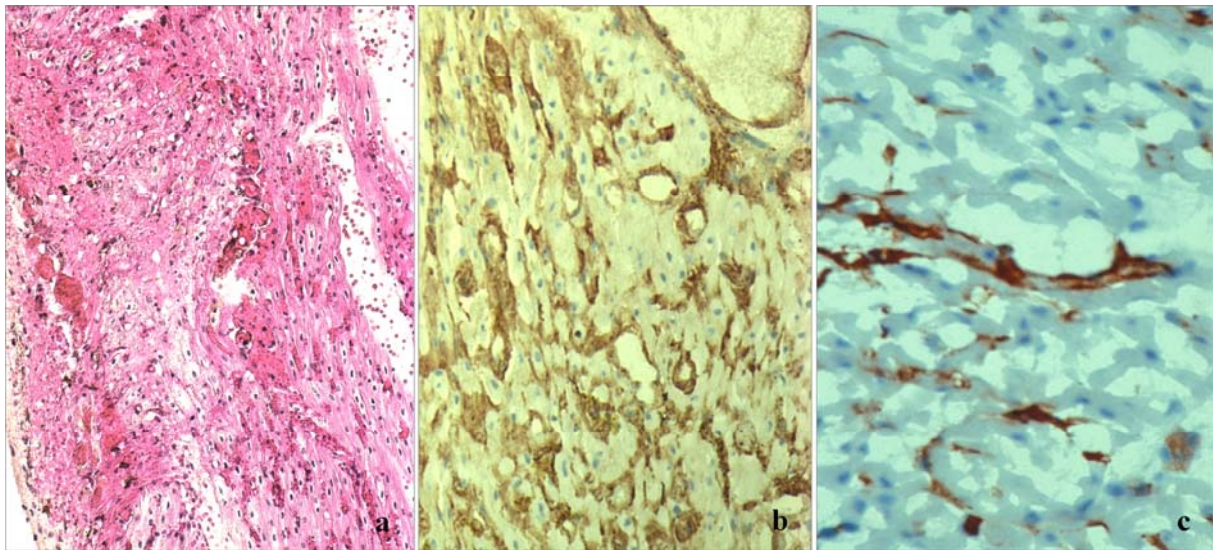


Abb.4.1: Sowohl die diffuse Hämorrhagie und Thrombosierung (a, HE 10x), wie die immunhistochemisch nachgewiesene perivaskuläre Ablagerung von IgM (b, 20x) und MAC (c, 40x) bestätigen eine HAR.

Wohl aufgrund des niedrigen a-pXNA Titer von 1:64 entwickelte sich eine langsamere, erst nach Stunden einsetzende und im histologischen Bild weniger eindrückliche HAR als bei Pav 6. Der Erstbeschreiber der HAR, Kiessmeyer (1966) legte aufgrund derartig zeitlich variierender Verläufe den Zeitrahmen für deren Auftreten mit 24h fest.

Auch wenn aufgrund pathophysiologischer Theorien eine HAR im „unmodifizierten“ diskordanten Modell regelhaft auftritt (Auchincloss 1988), gibt es Berichte über mehrtägiges Organüberleben im heterotopen Modell. Eine Behandlung erfolgte hierbei analog zur allogenen Tx mit einem 2fachen (Cooper 1988) oder 3fachen (Lin 1997) IS-Protokoll. In Myokardbiopsien dieser Versuche konnten jedoch bereits nach wenigen Stunden histologische Zeichen einer HAR festgestellt werden, was ein subletales Abstoßungsgeschehen bei niedrigen XNA-Ausgangswerten nahe legt.

Wie es sich auch in unseren weiteren Versuchen zeigte, scheint sowohl die HAR wie auch die darauffolgende AVR kein on/off-Phänomen zu sein, sondern eine stufenweise, ggf. auch kompensierbare Schädigung des Herzmuskelgewebes. Rose et al. (Rose 1996) entwickelte aufgrund dieser Tatsache ein fließendes Stufenschema der histologischen Abstoßungsreaktion (s. Tab. 4.1).

Phase I: Initialstadium (milde Abstoßung)

Normales Myokard abgesehen von
Venulären Thromben
Schwellung des Kapillarendothels

Phase II: Zwischenstadium (mäßige Abstoßung)

zusätzlich zu Phase I:
interstitielles Ödem
Erythrozytenstau und -Verklumpung in Kapillaren
vereinzelte Kapillarthromben

Phase III: Endstadium (schwere Abstoßung)

zusätzlich zu Phase II:
Kapillarzyerreißung, nachfolgend interstitielle Hämorrhagie
parenchymale Nekrosen
Arterielle Thrombosen

Tab. 4.1: Histologische Einteilung der hyperakuten Abstoßung nach Rose (1996)

4.2. Therapieformen der xenogenen Abstoßung

Die Erfolge in der allogenen Tx sind größtenteils auf die Entwicklung potenter IS zurückzuführen, die vorrangig in die adaptive Immunantwort eingreifen. In der XTx hingegen wird ein Organ vornehmlich durch den entwicklungs geschichtlich ältesten Anteil des Immunsystems, der unspezifische Immunabwehr (innate immunity) – die unter anderem aus Komplementsystem und präformierten Antikörpern besteht, abgestoßen. Die therapeutischen Schwerpunkte, eine HAR im xenogenen Schwein-Primatenmodell zu verhindern und das Tx-Überleben zu verlängern, bestehen somit in der Elimination, Inhibition oder Inaktivierung dieser Abwehrfunktionen.

4.2.1. Elimination präformierter Antikörper (XNA)

Die naheliegendste Variante erfolgte durch die Elimination der im Empfängerorganismus zirkulierenden XNA, etwa durch Plasmapherese/ Plasmaersatz (Chopek 1987, Alexandre 1989) oder durch eine xenogene, extrakorporale Organperfusion *prä transplantationem* und dem daraus folgenden Verbrauch im perfundierten Organ (Lexer 1986). Eine intravenöse Applikation von synthetischen Oligosacchariden mit α Gal-Epitopen als Antigen für XNA folgt einem ähnlichen Eliminationsvorgang (Ye 1994, Cooper 1994), zeigt sich aber als äußerst toxische Behandlung und für ein Langzeitüberlebensmodell nicht geeignet. Ebenso die Elimination durch eine unspezifische Bindung an Penicillamin (Galili 1993). Eine weitere Lösung stellt die extrakorporale Adsorption (IA) von Immunglobulinen dar (Palmer 1989, Leventhal 1995). Hierbei werden dem Plasma lediglich Ak entzogen und damit – im

Gegensatz zur Plasmapherese - der gleichzeitige Verlust anderer Plasmaproteine sowie eine mögliche allergische Reaktion des Empfängers auf Ersatzstoffe unterbunden (Schneider 1997). Die Elution von anti- α Gal-Ak durch spezifische α Gal-Säulen führt zu einer deutlichen Reduktion der XNA und ermöglicht eine suffiziente Nierenfunktion von Schweinenieren in Primaten (Xu 1998). Eine Elimination durch hochspezifische α Gal-Säulen oder auch reinen IgM-Säulen berücksichtigt jedoch nicht den Polymorphismus an XNA, die eine xenogene Immunantwort hervorrufen können (Mc Kane 1998, Taniguchi 1996, Lin 1996). Es stellte sich in in-vitro Versuchen heraus, dass anti-nonGal-Ak, wie sie auch im menschlichen Serum beschrieben sind (Zhu 2002), zu einer Lyse von Schweinezellen führen (Rood 2006). Ebenso zeigen jüngere Versuche mit Gal-knockout (Gal-/-) Schweinen, dass hierbei anti-nonGal-Ak eine AHXR auslösen (Chen 2005), der letztendliche Angriffspunkt bleibt jedoch weiterhin unbekannt (Ezzelarab 2005).

Aus diesem Grund wurde in unseren Versuchen eine unspezifische IA mit Ig-Therasorb®-Säulen durchgeführt, die neben den bekannten α Gal-Ak auch unspezifische bzw. bis dato unbekannte XNA binden. Primär wurde hierbei eine präoperative IA durchgeführt, die besonders auf die XNA der IgM-Klasse abzielte. Andererseits bestand in dieser Therapieform die Möglichkeit, die postoperativ in einem Reboundeffekt gebildeten, sekundären IgG-Ak zu eliminieren und damit akut ein bevorstehendes Abstoßungsgeschehen zu therapieren.

4.2.2. Regulierung des Komplementsystems (C)

Wie bereits beschrieben, stellt die Aktivierung der C-Kaskade einen bedeutenden Schritt in der Pathogenese der HAR dar (s. Abb. 1.1). Selbst wenn diese überwunden ist, kann durch die C-Aktivierung eine AVR induziert werden (Bach 1996). Durch die parenterale Gabe von Cobra Venom Factor (CVF) (Leventhal 1993, Kobayashi 1997) oder sCR1 (Pruitt 1991) erreicht man eine vorübergehende Inaktivierung der C-Kaskade, eine deutlich erhöhte Infektanfälligkeit ist jedoch der Preis dieser Therapie.

Die von uns verwendete IA mittels Therasorb®-Säulen führten neben der Antikörperreduktion zu einer perioperativen Verringerung der C-Aktivität um rund 55 % mit durchschnittlich 6 Zyklen IA (LR-h). Eine Steigerung der Zyklen auf 13 im Mittel bewirkte eine Reduktion um 62% (LR-o). Dieser Effekt, der wohl durch die Bindung von C1 an Fc-Regionen der (in den Säulen gebundenen) Ig zurückzuführen ist, unterstützt die Abstoßungstherapie mittels IA in der akuten Phase.

4.3. Abstoßungsgeschehen nach xHTx im Landrasse-Modell

4.3.1. Abstoßung im heterotopen Landrasse Modell (LR-h) mit IA

Der Versuch Pav 03 endete nach 11 Tagen durch ein respiratorisches Versagen des Empfängers, das bis zuletzt schlagende Xenograft wies einige bereits organisierte Nekrosen auf. Die fokalen Ablagerungen von C3 und IgM jedoch deuten auf kleine Abstoßungsherde trotz suffizienter IA hin, der deutliche Anstieg der Herzenzyme mit ebenso raschem Abfall unterstreicht diese Annahme. Minimale histologische Veränderungen des Xenotransplantats des Versuchs Pav 05, der durch ein technisches Versagen endete, weisen auf eine immunologische Auseinandersetzung auf niedrigstem Niveau des Empfängers mit dem fremden Gewebe hin und unterstreicht die Annahme eines fließenden Prozesses. Klinisch, laborchemisch wie auch histologisch zeigt sich dagegen in Pav 08 ein massives, hyperakutes Abstoßungsgeschehen bei ungenügender Absenkung der XNA durch 4 Zyklen der IA. Bei kontinuierlichem Anstieg der XNA-Titer bei Pav 13 ab Tag 8 entwickelte sich eine AVR. Es konnten bis zuletzt Herzaktionen abgeleitet werden, so dass das Graft bis zum d13 in situ verblieb. Hierdurch entstand histologisch ein fortgeschrittener Schaden am Herzmuskelgewebe, die Ablagerung von IgG bestätigte eine AVR.

Aufgrund dieser Beobachtung und denen aus Vorversuchen (5 XHTx mit IA in Cynomolgen, 3 XHTx mit IA in Pavianen, hier unveröffentlichte Daten) ermittelten wir einen Schwellentiter von 1:32 der a-pXNA, der erreicht, bzw. unterschritten werden muss, um eine HAR zu verhindern. Daher wichen wir in den folgenden Versuchen (incl. Pav 13) von den standardmäßig geplanten 4 Zyklen IA ab und richteten die Behandlungsdauer der IA nach dem a-pXNA Titer im Schnelltest (s. 2.3.3.), bis der festgelegte Schwellenwert unterschritten war.

4.3.2. Abstoßung im orthotopen Landrasse Modell (LR-o) mit IA

Die Todesursache des orthotop transplantierten Pav 09 beruhte auf einem akuten Nierenversagen mit Sistieren der Ausscheidung, einem konsekutivem Lungenödem, einer Hypernatriämie sowie einer Hyperkaliämie bis 8,1 mmol/l. Nach mehrmaliger kardiopulmonalen Reanimaiton unter hohen Katecholamindosen verstarb das Tier letztlich an therapierefraktärem Kammerflimmern. Hiervon rühren wohl auch die vereinzelt fleckigen Nekrosen des Myokards neben völlig intaktem, jedoch hyperkontraktilen HMG wie auch intramurale Thromben. Die geringe Ablagerung von IgM/ IgG und C unterstützen den Ausschluss einer Abstoßung. Nach insuffizienter IA endete Pav 10 nach 5h im klinischen und histologischen Vollbild einer HAR mit rapidem Anstieg der Herzenzyme, massiver

hämorrhagischer und ödematöser Veränderung des Myokards sowie deutliche IgM- und C-Ablagerung. Pav 11 verstarb bei suffizienter Transplantatfunktion an einem, durch erhöhtes Operationstrauma und HLM verursachtes Multiorganversagen (MOV). Die histologischen sowie immunhistochemischen Färbungen machten bei nahezu ungeschädigtem HMG eine Abstoßung als Ursache des MOV unwahrscheinlich, eine einzelne epikardiale Nekrose rührte von einer Verbrennung durch ein Defibrillatordpadel her. Auch bei Pav 12 ist ein Transplantatversagen als Grund für das Versuchende auszuschließen: Etwa 45min nach Extubation (problemloses weaning von der Beatmung) geriet das Tier bei zu geringer Gasaustauschfläche aufgrund eines hämorrhagischen Pleuraergusses, in ein akutes respiratorisches Versagen mit hypoxischer Krise, die Kreislaufsituation konnte trotz Reintubation, Pleurapunktion und medikamentöser Therapie nicht stabilisiert werden.

4.4. Aussagekraft des heterotopen und orthotopen Modell zum Abstoßungsgeschehen

Aufgrund der verhältnismäßig unkomplizierten Durchführbarkeit stellen heterotope HTx im Gegensatz zu den orthotopen die bevorzugten Untersuchungsmodelle für Abstoßungsreaktionen und deren Therapie dar. Das Halsherzmodell nach Carell (Carell 1907), bzw. die modifizierte Form des „in vivo Langendorff-Modell“ nach Mann (Mann 1933), mit einem einfachen operativen Zugangsweges ohne Eröffnung einer Körperhöhle und einer guten palpatorischen und interventionellen Untersuchungsmöglichkeit des Transplantates, erscheint als günstigste Technik. Bei Primaten jedoch kann dieser Zugangsweg aufgrund der anatomischer Halshautenge erst ab einem Empfängergewicht von etwa 15 kg durchgeführt werden. Bei vergleichbaren Ergebnissen der zervikalen und der abdominalen Tx (Lexer 1986) wählten wir bei durchschnittlich leichteren Versuchstieren die abdominale heterotope HTx nach Ono und Linsey (Ono 1969). Das Organ ist hierbei durch die Bauchdecke von äußerlichen Irritationen (Kratzen, Stöße des Empfängers) bestens geschützt und kann mittels Palpation, abdominalen EKG und Ultraschall verhältnismäßig einfach in seiner Funktion untersucht werden.

Neben der erhöhten Infektgefahr und Darmparalyse durch den abdominalen Eingriff steht die unklare zeitliche Festlegung des Organversagens als Negativkriterium im Vordergrund. Das von Scheringa (Scheringa 1995) im heterotopen Modell geforderte Versuchen 15 min nach Sistieren der Herzaktion ist bei einem potentiell wehrhaften Versuchstier nicht jederzeit feststellbar. Ein Tx-Versagen im heterotopen Modell hingegen beeinträchtigt das Wohlbefinden des Empfängers erst verhältnismäßig spät, besonders wenn das Organ im Verhältnis zum Empfänger sehr klein ist. Folglich kann zwischen Tx-Versagen und

Versuchende geraume Zeit vergehen, in der sich das histologische Bild durch fortbestehende Auseinandersetzung der Immunabwehr und fortschreitende Nekrosen deutlich verändert. Mittels abdominellem EKG konnten häufig bei abgestoßenen Organen regelmäßige, wenn auch sehr flache QRS-Komplexe bei nahezu fehlender echokardiografischer Pumpfunktion abgeleitet werden, womit die von Scheringa definierte Kriterien zum Versuchende nicht herangezogen werden konnte. Die echokardiographische Ejektionsfraktion als Kriterium eines Tx-Versagens zu verwenden, erscheint bei passiver Koronarperfusion ohne arterielle Nachlastbedingung und damit fehlender physiologischer Ventrikelfüllung ebenso wenig sinnvoll. Das fehlende Herzversagen durch abstoßungsbedingte Rhythmusstörungen und elektromechanischer Entkoppelung, wie es im orthotopen, lebenserhaltendem System infolge von koronarer Minderperfusion und kardialer Überlastung auftritt, vereitelt im heterotopen Modell häufig die Definition eines genauen Versuchendes und damit die zeitnahe Gewinnung einer realistischen und reproduzierbaren Histologie.

Daher wählten wir neben dem heterotopen Modell das dem klinischen Einsatz möglichst nahe liegende orthotope xenogene Herztransplantationsmodell, wengleich der Einsatz einer HLM, das enorme Operationstrauma wie auch der höhere fachliche und logistische Anspruch das Erreichen des Versuchszieles negativ beeinflussen können. Daß im orthotopen Versuchsaufbau Langzeitbeobachtungen bis zu 1½ Jahren möglich sind, bewies Sir Roy Calne in porcinen Iso- und Allotransplantationen (Calne 1978). Jedoch müssen im diskordanten Modell die orthotopen Ergebnisse im Vergleich zu den heterotopen äußerst vorsichtig interpretiert werden. Durch die effektive, kreislaufferhaltende Arbeitsleistung des Xenograft kommt es bei einem Abstoßungsgeschehen aufgrund des dann rasch eintretenden Kreislaufversagens zu einem erheblich schnellerem Versuchende. Selbst das im konkordanten Xenomodell erreichte heterotope Langzeitüberleben konnte im orthotopen Modell nicht reproduziert werden (Sadeghi 1987). Durch die Arbeitsbelastung des Herzens verändert sich auch das histologische Bild des Myokards, da im Vergleich zum lediglich retrograd perfundierten Modell metabolische Einflüsse eine wichtigere Rolle spielen. Wie jedoch oben bereits erwähnt, ist damit eine rasche und auch valide histologische Aufarbeitung des Xenotransplantates möglich.

Wie von Müller-Werdan gezeigt, führt die Anwesenheit XNA ex vivo bei Kardiomyozyten zu einer Desynchronisation bis hin zum Kontraktionsstillstand (Müller-Werdan 1994). Dieses Phänomen fanden wir im heterotopen, besonders aber im orthotopen Xenomodell wieder. Als klinisch führendes Zeichen registrierten wir nach Reperfusion zunehmende Formen von Rhythmusstörungen wie Sinustachykardie, Blockbilder, Bi- und Trigemini sowie VT-Salven.

Oft bildeten sich in der ersten Stunde der Reperfusion plötzlich hämodynamisch wirksame Rythmusstörungen, die nach rascher Defibrillation oder manueller Reanimation einen drastisch gesteigerten Katecholaminbedarf hervorriefen. Diese Interventionen wiederum können das histologische Bild bezüglich der Beurteilbarkeit deutlich einschränken.

Abstoßungsgeschehen, die auf einem niedrigen Niveau verlaufen, führen im orthotopen Modell durch die Dysregulation der kreislaueerhaltenden Herzfunktion erheblich schneller zum Transplantatversagen als im heterotopen Modell, womit das längere Überleben der heterotopen Xenotransplantate gegenüber den orthotopen im deutlichen Gegensatz zum histologischen Bild steht. So erklärt sich, trotz längeren Überlebens, der durchschnittlich höhere myozytäre Schaden der heterotopen Gruppe als der orthotopen.

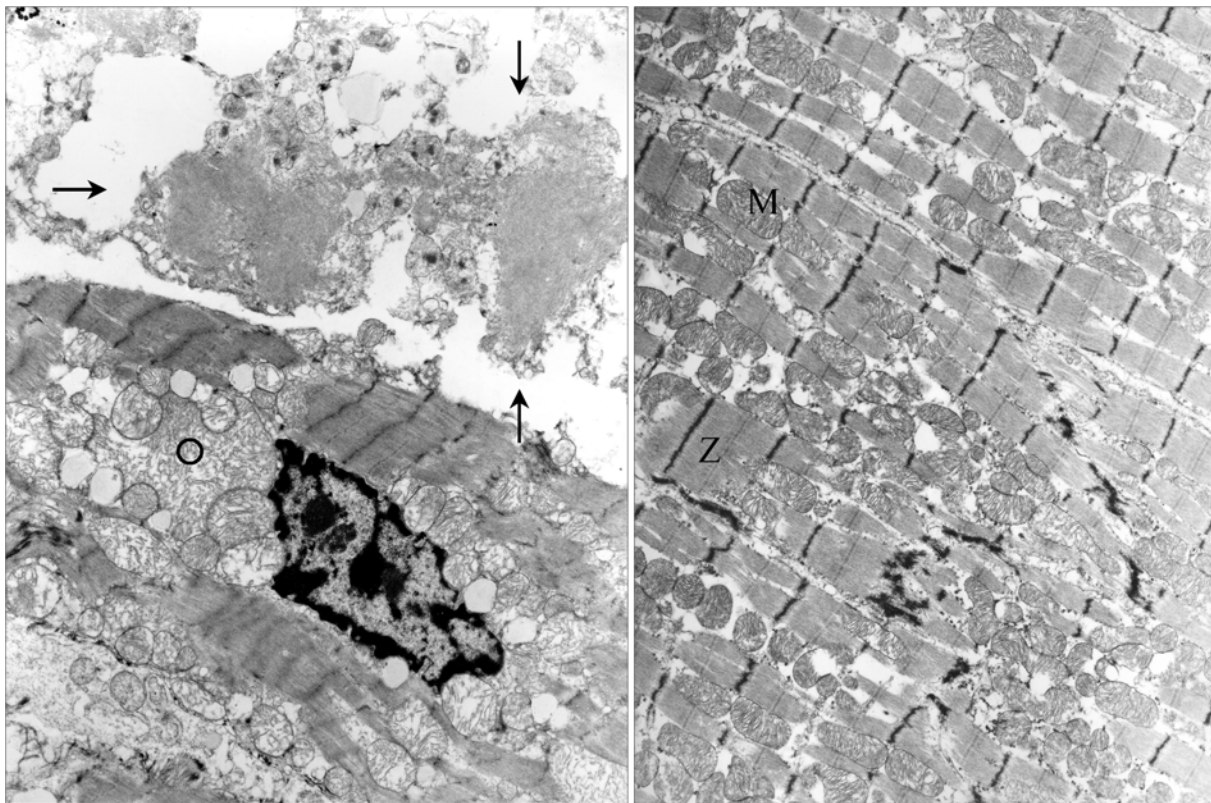


Abb. 4.2: Links sieht man Nekroseareale der hyperkontraktilen Myozyten (→) sowie mitochondriale Schwellung als Zeichen eines Abstoßungsgeschehens. Rechts findet sich nahezu regelrechtes Herzmuskelgewebe mit deutlicher Querstreifung (Z) und eingestreuten Mitochondrien (M).

4.5. Abstoßungsgeschehen von hDAF-transgenen Schweineherzen nach xHTx

Neben der Behandlung des Empfängers (s.o.) stellt die Veränderung des zu transplantierenden Gewebes ein Neues, aber sehr zukunftssträchtiges Potential in der Realisierung der Xenotransplantation dar. Wir sehen das durch XNA aktivierte Komplementsystem als Schlüsselereignis einer Abstoßungsreaktion an. Unter physiologischen Bedingungen verhindern komplement-regulierende Proteine (Lachmann 1991, Liszewski 1996, Morgan 1995) eine überschießende Kaskadenaktivierung und stellen damit natürliche, oberflächengebundene oder freie Hemmungsmediatoren dar. So verdrängt das membranständige DAF-Protein (decay accelerating factor, CD55) C2a aus der C3 und C5-Konvertase (C4b2a/3b) des klassischen Pfades und verhindert die Bildung der alternativen C3-Konvertase (C3bBb). Das Membran Cofactor Protein (MCP, CD46) dient als Cofaktor der Spaltung von C3b und C4b- Inaktivierung durch Faktor I und stört somit auch die Bildung der C3/C5- Konvertase beider Wege. Ferner sind der Komplement Rezeptor 1 (CR1), Faktor H, C4 binding protein, Faktor I, S-protein, Sp-40 und der Homologous Restriction Factor (C8bp/HRF) zu nennen, die meist Kofaktorfunktion besitzen. Nicht zu dieser Familie gehört das membrangebundene CD59, das die Aktivität der terminalen Komplementkomponenten und damit die Bildung des MAC (C5b-9) reguliert.

Diese Regulatoren agieren meist jedoch spezie-spezifisch: So kann ein Komplementregulator auf dem Endothel des Xenotransplantates (Schwein) aufgrund seiner Inkompatibilität zu den heterologen Komplementproteinen die Komplementkaskade eines Primaten nicht effektiv kontrollieren (Atkinson 1991).

Fasst man die Ergebnisse der Primatenversuche zusammen, die für verschiedene humane RCA transgene Spenderschweine verwendeten, so sind die Ergebnisse trotz des theoretischen Vorteils relativ ernüchternd (Lambrigts 1996; Squinto 1997, McCurry 1995), abgesehen von hDAF-transgenen Schweinen der Gruppe um David White aus Cambridge, die ein heterotopes Tx-Überleben in Cynomolgen von 2-62 Tagen erbrachten (White 1996, Schmoeckel 1998). In unseren Versuchen mit hDAF-transgenen Herzen verwendeten wir Schweine der selben Zuchtlinie der Fa. Imutran.

4.5.1. Abstoßung im heterotopen hDAF-Modell (DAF-h)

In dieser im Ergebnis recht homogenen Gruppe konnte unter Verwendung hDAF-transgener Spenderorgane und durchschnittlich 10 Zyklen IA eine HAR jeweils verhindert werden. Sämtliche Versuche wurden nach klinisch/ sonografischer Feststellung eines deutlichen, bzw. völligen Transplantatversagens mit einem mittleren Organüberleben von 5d, und damit jenseits der HAR terminiert. Nach deutlicher Reduktion der Immunglobuline durch die IA folgte ein erneuter, stetiger Anstieg in der Rekonvaleszenzphase, der nicht als Um- oder Rückverteilung von Antikörpern aus dem Gewebe (McCurry 1997), sondern als eine Neubildung bestimmter XNA zu werten ist, mit einem raschen a-pXNA-Rebound korreliert und ein Tx-Vesagen mit dem histologischen Bild einer AVR einleitet.

Histologisch vorrangig hierbei war eine Schwellung der Endothelzellen mit Ruptur des EC-Verbandes, eines intra- wie extrazellulären Ödems und hämorrhagischer Extravasation. Ferner fielen frische wie auch ältere Fibrinablagerungen sowie Thromben der Mikro- und auch der Makrozirkulation auf. Besonders in den Versuchen Pav 19 und 21 zeigt sich eine starke Schädigung des HMG, die durch ein langes Intervall zwischen Abstoßung und Versuchende zu erklären ist. Die Thrombosierung, besonders in den größeren Gefäßen, kann nicht als postmortal angesehen werden, sondern muss als Auswirkung einer Typ II EC-Aktivierung gedeutet werden (Bach 1994, 1998). Die venuläre Thrombosierung mit konsekutivem Verschluss der vorgeschalteten Arteriolen stellt das Schlüssleereignis für eine Antikörpervermittelte Abstoßung dar (Rose 2000). Im Gegensatz zu hyperakut abgestoßenen Organen dominierte hierbei die Ablagerung von IgG als Zeichen einer AVR. IgM, C- Faktoren sowie MAC-Komplexe waren nur vereinzelt vorhanden.

Dies zeigt, dass durch hDAF in Kombination mit einer IA – im Falle Pav 19 sogar bei grenzwertig hohem a-pXNA Titer - eine HAR überwunden werden kann. DAF alleine jedoch vermag eine HAR nicht vollständig zu verhindern. Eine Übersicht aller transplantierten hDAF-Organen weist eine histologisch gesicherte HAR-Rate zwischen 6% und 11% auf (Schuurmann 2002), womit die hDAF-Transgenität keinen alleinigen Schutz darstellt.

Die von uns durchgeführte IA (LR-h, LR-o) wie auch anderwertige immunadsorptive Verfahren (Leventhal 1995, Lin 1997) weisen ebenso eine hohe Effektivität zur Verhinderung einer HAR auf, womit für spätere klinische Einsätze ein Kombination von Transgenität des Spenders und einem immunadsorptivem Verfahren zwingend notwendig ist. Besonders im Hinblick auf die Zeit jenseits der HAR-Hürde ist dieses Verfahren von enormen Vorteil, da bei engmaschiger Kontrolle der XNA eine IA in Kombination mit Adjustierung der

begleitenden IS Therapie als rasche und höchst effektive Interventionsmöglichkeit auch bei einer AVR eingesetzt werden kann.

Solange keine Immuntoleranz oder Akkomodation erreicht wird, bleibt die AVR die zentrale Hürde der Xenotransplantation (Kobayashi 1997), wobei das initiale Ereignis nicht gänzlich geklärt scheint. Als Hauptfaktoren werden die Aktivierung des Komplementsystem sowie eine Ak-induzierte Reaktion beschrieben, die in äußerst heterogener Weise zur einer Abstoßung führen, die unter AVR subsummiert wurde, jedoch verschiedene histologische Bilder wie auch Entstehungshypothesen hervorbrachten. So kommt es im Schwein/Primatenmodell sowohl zu C-abhängigen (Waterworth 1998) wie auch C-unabhängigen Abstoßungen (Lin 1998). Die erste zeigt ein der HAR ähnliches histologisches Bild, jedoch mit signifikantem inflammatorischem Zellinfiltrat (im Gegensatz zur HAR). In den Versuchen nach vollständiger Komplementinaktivierung hingegen scheint eine verzögerte EC-Aktivierung vom Typ II ursächlich zu sein, die im Gegensatz zur HAR (Typ I Aktivierung) in Abwesenheit von C und aufgrund von Gentranskription und Proteinsynthese der EC langsamer verläuft. Ebenso erfolgt hierbei eine Hochregulierung inflammatorischer Cytokine und die Begünstigung eines prokoagulatorischen Umfeldes (Bach 1994). Diese EC-Aktivierung wird entweder durch vorhandene XNA (vornehmlich anti-Gal Ak) hervorgerufen, oder aber durch xenoreaktive Ak, die durch Exposition von xenogenem Gewebe neu gebildet werden und im Gegensatz zur HAR vornehmlich der IgG-Klasse angehören (Minanov 1998). Sie können gegen Gal und auch non-Gal-Epitope gerichtet sein. Auf der anderen Seiten entwickelt sich NF- κ B-vermittelt ein prokoagulatorisches Milieu (Palmetshofer 1998) sowie eine Steigerung des Prokoagulant Tissue faktor (Saadi 1995 a/b). Aufgrund dieser unterschiedlichen pathophysiologischen Ansatzpunkte wie auch der uneinheitliche Begriffsvielfalt (AVR, DXR, AHXR) für ein Geschehen zwischen HAR und akuter T-Zell vermittelter Abstoßung, welches hier unter dem Begriff der akuten vaskulären Abstoßungsreaktion (AVR) zusammengefasst wurde, entwickelte die Cambridge Xenotransplantation Group (unter Einbeziehung der hier beschriebenen Versuche) eine neue Stadieneinteilung des xenogenen Abstoßungsgeschens (Pino-Chaves 2001, Dorling 2003) (s.Abb. 4.3).

Als dominante Rolle der AVR sind jedoch weiterhin antikörpervermittelte Mechanismen anzusehen, da selbst bei niedrigen, peripher messbaren XNA-Titern eine Antikörperaktivierung in Endothelzellen erfolgt, ein Hinweis auf eine rein Komplement-getriggerte Abstoßung besteht nicht (Cozzi 1995).

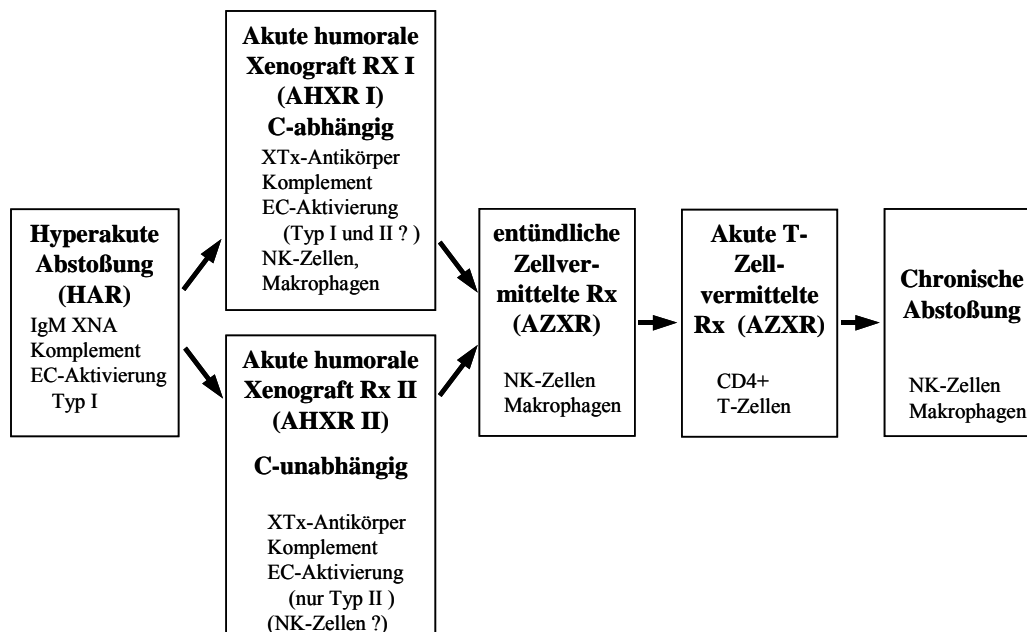


Abb. 4.3: Das bisher in der Literatur als AVR, DXR oder AHXR beschriebene Abstoßungsgeschehen lässt sich im diskordanten Model in eine Komplement-abhängige und eine Komplement-unabhängige Abstoßung trennen und ist mit einer Aktivierung der Endothelzellen und Schaffung eines prokoagulatorischen Milieus verbunden (Dorling 2003)

Wie man anhand der vorgestellten Literatur und entsprechend unserer Studie sehen kann, ist eine AVR nur durch Entfernung von XNA und IS sowie die Unterdrückung neugebildeter Ak zu erreichen. Wie wir sahen, stellt die alleinige IS derzeit keine suffiziente Therapie der Ak-Neubildung dar, ohne in toxische Bereiche zu kommen. Ein möglicher Ansatz besteht hierbei in einem großzügigem Einsatz der unspezifischen IA mittels Ig-Therasorb[®]. In dem bei uns etablierten Schwein-Primaten-Modell stießen wir beim Monitoring der a-pXNA (alle 12 h) an logistische Grenzen, eine engmaschige Kontrolle - etwa im 8h Rhythmus – scheint sinnvoll. Vielmehr jedoch war der kurzfristige, intermittierende Einsatz der ADA aus intensivmedizinischen Gründen (Notwendigkeit einer beatmungspflichtigen Analgosedation, Gabe von Blutprodukten, hohe Hämodilution, zu hohes Säulenvolumen) beim wehrhaften Primaten deutlich eingeschränkt, im klinischen Alltag jedoch realisierbar. Das Fehlen von adäquaten Blutprodukten (Erythrozytenkonzentraten, Fresh Frozen Plasma) erschwerte das peri- und postoperative Management. Durch Schaffung einer eigenen Primaten-Blutbank sowie intraoperative Cell-Saver Nutzung könnte jedoch bei zukünftigen Versuchen viel gewonnen werden.

4.5.2. Abstoßung im orthotopen hDAF-Modell (DAF-o)

Ganz deutlich wurden o.g. intensivmedizinische Schwierigkeiten in unserer orthotopen hDAF-transgenen Gruppe. Schließt man den Versuch P16 als Fehlversuch aus (Konservierungsschaden bei der Kardioplegie), so betrug das mittlere Überleben $14,6 \pm 2,6$ Tage, ein im Vergleich mit der Literatur gutes Ergebnis (Bhatti 1999). Vielmehr ist als Erfolg zu werten, dass weder klinisch noch histologisch eine HAR oder AVR als Todesursache eines Tieres auftraten. Alle drei Versuche mussten aufgrund intensivmedizinischer Probleme terminiert werden, die im klinischen Alltag zwar eine Komplikation darstellen, aber durchaus zu bewältigen sind. Das Tier P15 wurde mit akutem Nierenversagens infolge von Hämolyse nach Bluttransfusion am 11d eingeschläfert, P17 geriet in Ermangelung von passenden Blutprodukten in einen hämorrhagischen Schock, ein blutendes Duodenalulcus mit konsekutivem Ileus führten zu einem Versuchsabbruch bei P20. Komplikationen, die sicherlich mit auf die massive IS-Therapie zurückzuführen sind, beim Patienten jedoch wohl keine letale Konsequenz darstellen würden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass hDAF-transgene Schweineherzen im lebenserhaltenden, orthotopen Xenotransplantationsmodell die Kreislauffunktion über längere Zeit suffizient aufrecht erhalten können. Durch die Transgenität mit hDAF kann in den überwiegenden Fällen eine HAR überwunden werden. Eine kalkulierte immunsuppressive Vierfachkombination (CyA, MPA, CyP und Steroide) bewirkt neben einer Abwendung einer HAR ebenso die Verhinderung einer AHXR I/II. Besonders der Effekt von wiederholt gegebenem CyP auf die Nukleinsäurensynthese, die Wirkung auf B-Lymphozyten sowie die Hemmung der Blastendifferenzierung der IgM und IgG- produzierenden Zellen ist von entscheidender Bedeutung (Berthold 1999). Kritisch anzumerken ist jedoch die Gradwanderung zwischen bestmöglicher IS und toxischer Nebenwirkung auf den Gesamtorganismus. Nach gut reproduzierbarer Etablierung des heterotopen und des fachlich und logistisch aufwendigeren orthotopen XHTx-Modells in der Schwein-Primaten Konstellation schlagen wir daher eine Weiterentwicklung des IS-Protokolles um den potenteren Calcineurininhibitor Tacrolimus oder aber den mTOR-Inibitor Rapamycin vor. Ebenso sollten Antilymphozytensera (antiCD207, CD40, etc) oder NK-Zell-Ak zum Einsatz kommen. Nur durch ein differenziertes, systematisch ausgearbeitetes IS-Protokoll können weitere Xenotransplantation sowie die Therapien möglicher Abstoßungsreaktion durchgeführt werden (Brenner 2005).



Abb. 4.4: Der von uns Berni genannte Pavian 17 am 18. Tag nach orthotoper Herztransplantation eines hDAF-transgenen Schweineherzens.

5. Schlussfolgerung

Wir konnten zeigen, dass die Kombination aus einer Vierfachimmunsuppression (CyA, MPA, CyP und Steroide) und einer Immunadsorption mit Ig-Therasorb® eine HAR im heterotopen wie im orthotopen, xenogener Herztransplantationsmodell (Schwein-Pavian) suffizient verhindern kann. Die ausreichende Entfernung von XNA, welche durch direkte Endothelzell- und Komplement-Aktivierung zur HAR führen, ist hierbei *prä transplantationem* von entscheidender Bedeutung. Das Monitoring durch den von uns entwickelten Anti-pig-Antikörperschnelltest (s.2.3.3) bietet dabei ein rasches und zuverlässiges Werkzeug, um die Effektivität der IA zu kontrollieren. Wir ermittelten einen a-pXNA Schwellenwert von $\leq 1:32$

(respektive 1:1 im Schnelltest), der möglichst unterschritten werden muss, um ein hyperakutes Abstoßungsgeschehen zu verhindern.

Bei der humoralen Frühform (AHXR) der verzögerten, akut vaskulären Abstoßungsreaktion spielen neugebildete α 1-3Gal-Ak, jedoch auch nonGal-Ak eine entscheidende Rolle. Neben der angepassten immunsuppressiven Therapie können durch die IA mit Ig-Therasorb[®]-Säulen sowohl spezifische wie auch unspezifische Antikörper eliminiert werden, eine Tatsache, die bei der spezifischen anti-Gal-Ak-Elimination nicht berücksichtigt wird. Die von uns angewandte IA reduziert ebenso die Komplement-Aktivität, greift damit in die entscheidenden Mechanismen der HAR wie auch der AVR ein und kann daher zu prä- wie auch zur postoperativen Abstoßungstherapie eingesetzt werden.

In der postoperativen Prävention einer AVR könnte eine regelhaft durchgeführte Immunadsorption etabliert werden: Diese sollte spätestens jedoch am 2. postoperativen Tag beginnen, da ab hier ein Antikörperrebound durch Mobilisation vorhandener Antikörper und vor allem durch Antikörper-Neubildung zu erwarten ist. Die genaue zeitliche Festlegung einer therapeutischen IA kann durch eine engmaschige (alle 12 h, besser alle 8h) Titerbestimmung der XNA optimiert werden.

Durch extrakorporale Adsorption der XNA ist ebenso eine Dosisreduktion der Immunsuppressiva und damit eine Verringerung der toxischen Nebenwirkungen möglich.

Die Verwendung hDAF-transgener Spenderorgane in Kombination mit einer Vierfachimmunsuppression und IA verhindert das Auftreten einer HAR, im orthotopen Modell sogar unter Verzicht einer präoperativen IA. Die Nebenwirkungen sowohl der Immunadsorption (Hämodilution, Thrombopenie) wie der Immunsuppression begrenzen den schmalen therapeutischen Grad. Eine Verbesserung des IS-Protokolls unter Verwendung potenterer Medikamente, bzw. additiver Gaben von Antikörpern sowie eine Optimierung der peri- und postoperativen intensivmedizinischen Behandlung lässt eine längeres xenogenes Organüberleben erwarten.

In der histologischen Abstoßungsbestimmung zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen orthotopen und heterotopen Modell. Im nicht lebenserhaltendem, heterotopen Modell sahen wir sowohl makro- wie mikroskopisch eine verstärkte myozytäre Schädigung, die wir auf eine nicht zeitnahe Gewebegewinnung zurückführen. Das Sistieren des heterotopen, abdominalen Organs erscheint nicht offensichtlich, sondern nur zu den zweimal täglichen Untersuchungen des wehrhaften Tieres unter Sedation. Eine weitere Zellschädigung tritt durch eine derartige Zeitverzögerung auf. Bei fehlender physiologischer Belastung des Xenograft im heterotopen Modell wirken sich abstoßungsbedingte Dysregulationen geringer aus, es kommt nicht

regelmäßig zu einem akuten Herz-Kreislaufversagen wie im lebenserhaltendem, orthotopen Modell. Bei noch ableitbarer elektrokardiographischer Restfunktion des weiterhin perfundierten Xenografts kommt es ebenso zu einem längeren Verbleiben im Versuchsaufbau. So kann im Xenomodell Schwein-Primat die Histopathologie alleine keine endgültige Diagnose treffen. Nur die Zusammenschau von Versuchsaufbau, klinischem Verlauf, laborchemischen Daten und der histologischen und immunhistochemischen Beurteilung lassen eine valide Diagnosestellung zu.

6. Literaturverzeichnis

1. Alexandre GPJ, Gianello P, Latinne D, Carlier M, Dewaele A, Van Obbergh L, Moriau M, Marbaix E, Lambotte JL, Lambotte L, Squifflet JP. Plasmapheresis and splenectomy in experimental renal xenotransplantation. *In: Hardy MA (ed.): Xenograft 25 1989;259-266*
2. Allan JS. Xenotransplantation and Possible Emerging Infectious Diseases. *Mol Diagn 1996;1(3):209-217*
3. Atkinson JP, Oglesby TJ, White D, Adams EA, Liszewski MK. Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin Exp Immunol 1991;86(Suppl 1):27-30*
4. Auchincloss H Jr. Xenogeneic transplantation. A review. *Transplant 1988;46(1):1-20*
5. Bach FH, Robson SC, Ferran C, Winkler H, Millan MT, Stuhlmeier KM, Vanhove B, Blakely ML, van der Werf WJ, Hofer E, et al. Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. *Immunol Rev 1994;141:5-30*
6. Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC. Delayed xenograft rejection. *Immunol Today 1996;17(8):384-379*
7. Bach FH. Xenotransplantation: Problems and Prospects. *Annu Rev Med 1998;49:301-310*
8. Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W, Jolley WB. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA 1985;254(23):3321-3329*
9. Bannett AD, McAlack RF, Raja R, Baquero A, Morris M. Experiences with known ABO-mismatched renal transplants. *Transplant Proc 1987;19(6):4543-4546*
10. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J 1967;41(48):1271-1274*

11. Barnard CN, Wolpowitz A, Losman JG. Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass. *S Afr Med J* **1977**;17(26):1035-1038
12. Berthold H, Stroehmann I. Therapie mit Immunsuppressiva. In: *Berthold (Ed): Klinikleitfaden Arzneimitteltherapie. Urban & Fischer, München* **1999**;919-953
13. Bhatti FN, Schmoeckel M, Zaidi A, Cozzi E, Chavez G, Goddard M, Dunning JJ. Three-month survival of hDAF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplant Proc* **1999**;31(1):958
14. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cell. *Nature* **1953**;172:603-606
15. Blakely ML, Van der Werf WJ, Berndt MC, Dalmaso AP, Bach FH, Hancock WW. Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* **1994**;58(10):1059-1066
16. Brenner P, Schmoeckel M, Wimmer C, Eder V, Rucker A, Felbinger T, Uchita S, Hinz M, Brandl U, Meiser B, Reichenspurner H, Hammer C, Reichart B. Mean Xenograft Survival of 14.6 Days in a Small Group of hDAF-transgenic Pig Hearts transplanted Orthotopically in Baboons. *Transplant Proc* **2005**;37(1):472-476
17. Calne RY. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc* **1970**;2:550-556
18. Calne RY, White DJ, Rolles K, Smith DP, Herbertson BM. Prolonged survival of pig orthotopic heart grafts treated with cyclosporin A. *Lancet* **1978**;3(8075):1183-1185
19. Carrel A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Med* **1902**;98:858
20. Carrel A. The surgery of blood vessels. *Bull John Hopkins Hosp* **1907**;56:92-96

21. Chapman LE, Folks TM, Salomon DR, Patterson AP, Eggerman TE, Noguchi PD. Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N Engl J Med* **1995**;333(22):1498-1501
22. Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, Wise Y, Liu Y, Xiang Y, Copeman L, Liu W, Jevnikar A, Wall W, Cooper DK, Murase N, Dai Y, Wang W, Xiong Y, White DJ, Zhong R. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* **2005**;11(12):1295-1298
23. Chopek MW, Simmons RL, Platt JL. ABO incompatible renal transplantation: initial immunopathologic evaluation. *Transplant Proc* **1987**;19(6):4553-4557
24. Cooley DA, Hallman GL, Bloodwell RD, Nora JJ, Leachman RD. Human heart transplantation. Experience with twelve cases. *Am J Cardiol* **1968**;22(6):804-812
25. Cooper DK, Human PA, Lexer G, Rose AG, Rees J, Keraan M, Du Toit E. Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon. *J Heart Transplant* **1988**;7(3):238-246
26. Cooper DKC, Ye Y, Rolf LL, Zhudi N. The pig as potential organ donor for man. In: Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG (eds.): *Xenotransplantation. The transplantation of organs and tissues between species*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. **1991**;481-500
27. Cooper DKC, Koren E, Oriol R. Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunol Rev* **1994**;141:31-58
28. Cozzi E, White DJ. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* **1995**;1(9):964-966
29. Czaplicki J, Blonska B, Religa Z. The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human. *J Heart Lung Transplant* **1992**;11(2):393-397

30. Dorling A, Riesbeck K, Warrens A, Lechler R. Clinical xenotransplantation of solid organs. *Lancet* **1997**;349(9055):867-871
31. Dorling A. Are anti-endothelial cell antibodies a pre-requisite for the acute vascular rejection of xenografts? *Xenotransplantation* **2003**;10(1):16-23
32. Eckhardt AE, Goldstein IJ. Isolation and characterization of a family of alpha-D-galactosyl-containing glycopeptides from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochemistry* **1983**;22(23):5290-5297
33. Eiseman B, Liem DS, Raffucci F. Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure. *Ann Surg* **1965**;162:329-345
34. Ezzelarab M, Ayares D, Cooper DK. Carbohydrates in xenotransplantation. *Immunol Cell Biol* **2005**;83(4):396-404
35. Fryer JP, Blondin B, Stadler C, Ivancic D, Rattner U, Kaplan B, Kaufman D, Abecassis M, Stuart F, Anderson B. Inhibition of human serum mediated lysis of porcine endothelial cells using a novel peptide which blocks C1Q binding to xenoantibody. *Transplant Proc* **1997**;29(1-2):883
36. Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1-3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**;84(5):1369-1373
37. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* **1988**;263(33):17755-17762
38. Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* **1993**;14(10):480-482
39. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat* **1943**;77:299-310

40. Good AH, Cooper DK, Malcolm AJ, Ippolito RM, Koren E, Neethling FA, Ye Y, Zuhdi N, Lamontagne LR. Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: Implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc* **1992**;24(2):559-562
41. Goodman DJ, Von Albertini M, Willson A, Millan MT, Bach FH. Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells. *Transplant* **1996**;61(5):763-771
42. Hammer C, Hingerle M. Development of preformed natural antibodies in gnotobiotic dogs and pigs, impact of food antigens on antibody specificity. *Transplant Proc* **1992**;24(2):707-709
43. Hardy JD, Kurrus FD, Chavez CM, Neely WA, Eraslan S, Turner MD, Fabian LW, Labecki TD. Heart transplantation in man: Developmental studies an report of a case. *JAMA* **1964**;188:1132-1140
44. Hume DM, Gayle WE, Williams GM. Cross circulation of patients in hepatic coma with baboon partners having human blood. *Surg Gynecol Obstet* **1969**;128(3):495-517
45. Jaboulay M. Greffe de rein au pli du conde par sondunes arterielles et veneuses. *Bulletin du Lyon Med* **1906**;67:572-578
46. Johnston PS, Wang MW, Lim SM, Wright LJ, White DJ. Discordant xenograft rejection in an antibody-free model. *Transplant* **1992**;54(4):573-576
47. Kalter SS. The nonhuman primate as potential organ donor for man: virological considerations. In: Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG (eds.): *Xenotransplantation. The transplantation of organs and tissues between spezies*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. **1991**;457
48. Kaplon RJ, Michler RE, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Platt JL. Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts. *Transplant* **1995**;59(1):1-6

49. Kennedy I. Xenotransplantation: ethical acceptability. *Transplant Proc* **1997**;29(6):2729-2730
50. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Peterson VP, Fjeldborg G. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with preexisting humoral antibodies against donor cells. *Lancet* **1966**;2(7465):662-665
51. Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, Rose AG, Hancock WW, Ye Y, Niekrasz M, Kosanke S, Wright LJ, White DJ, Cooper DK. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation* **1997**;64(9):1255-1261
52. Lachmann PJ. The control of homologous lysis. *Immunol Today* **1991**;12(9):312-315
53. Lambrigts D, Sachs DH, Cooper DK. Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation* **1998**;66(5):547-561
54. Langford GA, Yannoutsos N, Cozzi E, Lancaster R, Elsome K, Chen P, Richards A, White DJ. Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. *Transplant Proc* **1994**;26(3):1400-1401
55. Lawson JH, Platt JL. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation* **1996**;62(3):303-310
56. Lederer SR, Schneeberger H, Albert E, Johnson JP, Gruber R, Land W, Burkhardt K, Hillebrand G, Feucht HE. Early renal graft dysfunction. The role of preformed antibodies to DR-typed lymphoblastoid cell lines. *Transplant* **1996**;61(2):313-319
57. Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RM 3rd, Matas AJ. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* **1993**;55(4):857-865

58. Leventhal JR, John R, Fryer JP, Witson JC, Derlich JM, Remiszewski J, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM 3rd. Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. *Transplant* **1995**;59(2):294-300
59. Lexer G, Cooper DK, Rose AG, Wicomb WN, Rees J, Keraan M, Du Toit E. Hyperacute rejection in a discordant (pig to baboon) cardiac xenograft model. *J Heart Transplant* **1986**;5(6):411-418
60. Lin SS, Holzkecht ZE, Parker W, Lindman BJ, Platt JL. Porcine endothelial cell membrane antigens recognized by human and baboon xenoreactive antibodies during organ perfusion. *Transplant Proc* **1996**;28(2):607
61. Lin SS, Kooyman DL, Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Lawson JH, Hoopes CW, Gullotto C, Li L, Birch P, Davis RD, Diamond LE, Logan JS, Platt JL. The Role of natural anti-Gal a 1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of pig-to-baboon cardiac xenotransplants. *Transplant Immunol* **1997**;5(3):212-218
62. 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(8):1745-1756
63. Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP. Control of the complement system. *Adv Immunol* **1996**;61:201-283
64. Lower RR, Shumway NE. Studies on orthotopic homotransplantation of the canine heart. *Surg Forum* **1960**;11:18-21
65. Magee JC, Platt JL, Oldham KT, Guice KS. Oxidant stress increases susceptibility of porcine endothelial cells to injury by xenoreactive antibody and complement. *Transplant Proc* **1994**;26(3):1170
66. Mann FC, Priestley JT, Markowitz J, Yater WM. Transplantation of the intact mammalian heart. *Arch Surg* **1933**;26:219-224

67. Marion P. Les transplantations cardiaques et les transplantations hépatiques. *Lyon Med* **1969**;222:585
68. McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, Platt JL. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* **1995**;1(5):423-427
69. McCurry KR, Parker W, Cotterell AH, Weidner BC, Linn SS, Daniels LJ, Holzknicht ZE, Byrne GW, Diamonds LE, Logan JS, Platt JL. Humoral response in pig-to-baboon cardiac transplantation. *Hum Immunol* **1997**;58(2):91-95
70. McKane W, Lee J, Preston R, Hacking A, Simpson P, Lynds S, Goldberg L, Cairns T, Taube D. Polymorphism in the human anti-pig natural antibody repertoire: implications for antigen-specific immunoadsorption. *Transplant* **1998**;66(5):626-633
71. Millan MT, Geczy C, Stuhlmeier KM, Goodman DJ, Ferran C, Bach FH. Human monocytes activate porcine endothelial cells, resulting in increased E-selectin, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, and plasminogen activator inhibitor-type-1 expression. *Transplant* **1997**;63(3):421-429
72. Minanov OP, Itescu S, Neethling FA, Morgenthau AS, Kwiatkowski P, Cooper DK, Michler RE. Anti-GaL IgG antibodies in sera of newborn humans and baboons and its significance in pig xenotransplantation. *Transplant* **1997**;63(2):182-186
73. Minanov OP, Artrip JH, Szabolcs M, Kwiatkowski PA, Galili U, Itescu S, Michler RE. Triple immunosuppression reduces mononuclear cell infiltration and prolongs graft life in pig-to-newborn baboon cardiac xenotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* **1998**;115(5):998-1006
74. 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**;44(6):825-830

75. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* **1987**;79(1):124-130
76. Morgan BP. Complement regulatory molecules: application to therapy and transplantation. *Immunol Today* **1995**;16(6):257-259
77. Müller-Werdan U, Klein D, Zander M, Werdan K, Hammer C. Beating neonatal rat cardiomyocytes as a model to study the role of xenoreactive natural antibodies in xenotransplantation. *Transplant* **1994**;58(12):1403-1409
78. Murray JE, Merrill JP and Harrison JH. Renal Homotransplantation in Identical Twins. *Surg Forum* **1955**;6:432
79. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* **1969**;57(2):225-229
80. Palmer A, Taube D, Welsh K, Bewick M, Gjorstrup P, Thick M. Removal of anti-HLA antibodies by extracorporeal immunoabsorption to enable renal transplantation. *Lancet* **1989**;1(8628):10-12
81. Palmetshofer A, Galili U, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH. Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type I activation. *Transplantation* **1998a**;65(6):844-853
82. Palmetshofer A, Galili U, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH. Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type II activation. *Transplantation* **1998b**;65(7):971-978
83. Parker W, Lundberg-Swanson K, Holzknacht ZE, Lateef J, Washburn SA, Braedehoeft SJ, Platt JL. Isohemagglutinins and xenoreactive antibodies: members of a distinct family of natural antibodies. *Hum Immunol* **1996**;45(2):94-104

84. Parker W, Yu PB, Holzknicht ZE, Lundberg K, Buckley RH, Platt JL. Specificity and function of "natural" antibodies in immunodeficient subjects: clues to B cell lineage and development. *J Clin Immunol* **1997**;17(4):331-321
85. Pino-Chavez G. Differentiating Acute Humoral from Acute Cellular Rejection Histopathologically. *Graft* **2001**;4(1):60-62
86. Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, Oegema TR Jr, Bach FH, Dalmaso AP. Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J Exp Med* **1990**;171(4):1363-1368
87. Platt JL, Vercellotti GM, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM, Najarian JS, Bach FH. Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol Today* **1990**;11(12):450-456
88. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplant* **1991**;52(2):214-220
89. Pruitt SK, Baldwin WM 3rd, Marsh HC Jr, Lin SS, Yeh CG, Bollinger RR. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute xenograft rejection. *Transplantation* **1991**;52(5):868-873
90. Reemtsma K, Mc Cracken BH, Schlegel JU, Pearl MA, Pearce CW, DeWitt CW, Smith PE, Hewitt RL, Creech OJ. Renal heterotransplantation in man. *Ann Surg* **1964**;160:384-410
91. Rood PPM, Hara H, Busch JL, Ezzelarab M, Zhu X, Ball S, Ayares D, Awwad M, Cooper DK. Incidence and cytotoxicity of antibodies in cynomolgus monkeys directed to nonGal antigens, and their relevance for experimental models. *Transpl Int* **2006**;19(2):158-165

92. Rose AG, Cooper DK, Human PA, Reichenspurner H, Reichart B. Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts. *J Heart Lung Transplant* **1991**;10(2):223-234
93. Rose AG, Cooper DKC. A Histopathologic Grading System of Hyperacute (Humoral, Antibody-mediated) Cardiac Xenograft and Allograft Rejection. *J Heart Lung Transplant* **1996**;15(8):804-817
94. Rose AG, Cooper DKC. Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection. *Xenotransplant* **2000**;7(1):31-41
95. Saadi S, Ihrcke NS, Platt JL. Endothelial cell shape and hyperacute rejection. *Transplant Proc* **1994**;26(3):1149
96. Saadi S, Platt JL. Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J Exp Med* **1995a**;181(1):21-31
97. Saadi S, Holzknacht RA, Patte CP, Stern DM, Platt JL. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med* **1995b**;181(6):1807-1814
98. Sadeghi AM, Robbins RC, Smith CR, Kurlansky PA, Michler RE, Reemtsma K, Rose EA. Cardiac xenotransplantation in primates. *J Thorac Cardiovasc Surg* **1987**;93(6):809-814
99. Scheringa M, Schraa EO, Bouwman E, van Dijk H, Melief MJ, Ijzermans JN, Marquet RL. Prolongation of survival of guinea pig heart grafts in cobra venom factor-treated rats by splenectomy. No additional effect of cyclosporine. *Transplant* **1995**;60(11):1350-1353
100. Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone MA Jr, Loskutoff DJ. Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem* **1988**;263(12):5797-5803

101. Schmoeckel M, Bhatti FN, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MJ, Pino-Chavez G, Goddard M, Warner RG, Langford GA, Dunning JJ, Wallwork J, White DJ. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplant* **1998**;65(12):1570-1577
102. Schneider KM. Plasmapheresis and immunoabsorption: different techniques and their current role in medical therapy. *Kidn Int Suppl* **1998**;64:61-65
103. Schuurman HJ, Pino-Chavez G, Phillips MJ, Thomas L, White DJG, Cozzi E. Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors. *Transplant* **2002**;73(7):1146-1151
104. Schwartz R, Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* **1959**;183(4676):1682-1683
105. Squinto SP, Fodor WL. Engineering of xenografts to provide organs for human transplantation. In: Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG (eds.): *Xenotransplantation. The transplantation of organs and tissues between species*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. **1997**;659-664
106. Starzl TE, Marchino TL, Peters GN et al. Renal heterotransplantation from baboon-to-man: experience with six cases. *Transplantation* **1964**;2:752-776
107. Stoffel W, Demant T. Selective removal of apolipoprotein B-containing serum lipoproteins from blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**;78(1):611-615
108. Suckfüll MM, Pieske O, Mudsam M, Babic R, Hammer C. The contribution of endothelial cells to hyperacute rejection in xenogeneic perfused working hearts. *Transplant* **1994**;57(2):262-267
109. Taniguchi S, Neethling FA, Korchagina EY, Bovin N, Ye Y, Kobayashi T, Niekrasz M, Li S, Koren E, Oriol R, Cooper DK. In vivo immunoabsorption of antipig antibodies in baboons using a specific Gal(alpha)1-3Gal column. *Transplant* **1996**;62(10):1379-1384

110. van Overdam KA, Verbakel CA, Kouwenhoven EA, van Rooijen N, de Bruin RW, IJzermans JN, Marquet RL. Negligible role for NK cells and macrophages in delayed xenograft rejection. *Transplant Int* **2000**;13(Suppl 1):504-507
111. Waterworth PD, Dunning J, Tolan M, Cozzi E, Langford G, Chavez G, White D, Wallwork J. Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant* **1998**;17(12):1201-1207
112. White DJG. HDAF transgenic pig Organs: Are they concordant for human transplantation? *Xenotransplant* **1996**;4:50
113. Xu H, Edwards NM, Chen JM, Kwiatkowski P, Rosenberg SE, Michler RE. Newborn baboon serum lacks natural anti-pig xenoantibody. *Transplant* **1995**;59(8):1189-1194
114. Xu Y, Lorf T, Sablinski T, Gianello P, Bailin M, Monroy R, Kozlowski T, Awward M, Cooper DKC, Sachs DH. Removal of antiporcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by a aGalal-3Galbl-4bGlc-X immunoaffinity column. *Transplant* **1998**;65(2):172-179
115. Ye Y, Neethling FA, Niekrasz M, Koren G, Merhav H, Kosanke S, Oriol R, Cooper DKC. Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts. *Transplant* **1994**;58(3):330-337
116. Zhao Z, Termignon JL, Cardoso J, Chéreau C, Gautreau C, Calmus Y, Houssin D, Weill B. Hyperacute xenograft rejection in the swine-to-human donor-recipient combination. In vitro analysis of complement activation. *Transplant* **1994**;57(2):245-249
117. Zhu A. Identification of non-alphaGal xenoantigens on porcine red blood cells. *Transplant Proc* **2000**;32(5):851-854
118. Zhu A, Hurst R. Anti-N-glycolylneuraminic acid identified in healthy human serum. *Xenotransplant* **2002**;9(6):376-381

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

#	Nummer des Versuchstieres
1:n	Eins zu n (Titerstufe)
ACT	Gerinnungszeit (<i>activated clotting time</i>)
ADA	Adsorptions-Desorptions Einheit
Ak	Antikörper
a-pXNA	Anti-Schwein-Antikörper
AVR	akut vaskuläre Abstoßung (<i>acute vacular rejection</i>)
C	Komplementsystem
Ch	Charrière
CVF	Cobra Venom Faktor
CyA	Cyclosporin A
CyP	Cyclophosphamid
d	Tag
DXR	verzögerte Abstoßung (<i>delayed xenograft rejection</i>)
EC	Endothelzelle
EK	Erythrozytenkonzentrat
EvG	Elastica-van-Gieson Färbung
F	French
Gal-/-	Gal Knock out
HE	Hämatoxilin/ Eosinfärbung
HAR	hyperakute Abstoßung (<i>hyperacute rejection</i>)
hDAF	human decay acceleratng Factor; CD55
HLM	Herz-Lungen Maschine
HMG	Herzmuskelgewebe
HMZ	Herzmuskelzellen
HTx	Herztransplantation
hXHTx	heterotope xenogene Herztransplantation
IA	Immunadsorption
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

IL	Interleukin
IS	Immunsuppression
KG	Körpergewicht
LR	Landrasse Schwein
MAC	Membran Angriffskomplex; C5b-9 (<i>membran attack complex</i>)
MCP	membran cofactor protein, CD64
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOV	Multiorganversagen
MPA	Mykophenolatsäure
NK	Natürliche Killer Zelle
oXHTx	ortothope xenogene Herztransplantation
Pav	Pavian
PERV	porcine endogene Retroviren
PLT	Thrombozyten (<i>platelets</i>)
pOP	postoperativer Tag
RBC	Erythrozyten
RCA	Regulator der Komplementaktivierung
Rx	Abstoßung (<i>rejection</i>)
TF	Thromboplastin (<i>tissue factor</i>)
TM	Thrombomodulin
t-PA	Gewebsplasminogen-Aktivator (<i>tissue plasminogen activator</i>)
Tx	Transplantation
VCI	Vena cava inferior
XNA	xenoreaktiver natürlicher Antikörper
XTx	Xenotransplantation
α Gal	Galactose- α (1,3) Galactose

SI –Einheiten sowie gängige medizinische Abkürzungen werden hier nicht aufgeführt

7.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

<i>Abb. 1.1:</i>	<i>Klassischer und Alternativer Weg der Komplementkaskade</i>	<i>11</i>
<i>Abb. 1.2:</i>	<i>Schematische Darstellung der HAR</i>	<i>12</i>
<i>Abb. 1.3:</i>	<i>Schematische Darstellung der AVR</i>	<i>16</i>
<i>Abb. 2.1:</i>	<i>Anti-Schwein Antikörper Hämagglutinationstest</i>	<i>26</i>
<i>Abb. 2.2:</i>	<i>Intraoperativer Aufbau der Immunadsorption</i>	<i>29</i>
<i>Abb. 2.3:</i>	<i>Standardisierte Histologiegewinnung</i>	<i>31</i>
<i>Abb. 3.1:</i>	<i>Makro- und Mikroskopie einer HAR</i>	<i>34</i>
<i>Abb. 3.2:</i>	<i>Antikörper- und Komplementverlauf der Gruppe LR-h</i>	<i>36</i>
<i>Abb. 3.3:</i>	<i>Herzenzymverlauf der Gruppe LR-h</i>	<i>37</i>
<i>Abb. 3.4:</i>	<i>Histologie einer AVR</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 3.5:</i>	<i>Antikörper- und Komplementverlauf der Gruppe LR-o</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 3.6:</i>	<i>Herzenzymverlauf der Gruppe LR-o</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 3.7:</i>	<i>Histologie einer HAR im Vergleich mit normalem Gewebe</i>	<i>43</i>
<i>Abb. 3.8:</i>	<i>Antikörper- und Komplementverlauf der Gruppe DAF-h</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 3.9:</i>	<i>Herzenzymverlauf der Gruppe DAF-h</i>	<i>47</i>
<i>Abb. 3.10:</i>	<i>Pathologische Befunde einer AVR in der Elektronenmikroskopie</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 3.11:</i>	<i>Mikro- und Makroskopie einer AVR eines hDAF-Herzens</i>	<i>50</i>
<i>Abb. 3.12:</i>	<i>Magenulkus (Pav 20)</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 3.13:</i>	<i>Antikörper- und Komplementverlauf der Gruppe DAF-o</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 3.14:</i>	<i>Herzenzymverlauf der Gruppe DAF-o</i>	<i>54</i>
<i>Abb. 3.15:</i>	<i>Immunhistochemie Pav 17</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 3.16:</i>	<i>Immunhistochemischer DAF-Nachweis</i>	<i>57</i>
<i>Abb. 4.1:</i>	<i>Immunhistochemischer Nachweis einer HAR</i>	<i>58</i>
<i>Abb. 4.2:</i>	<i>Elektronenmikroskopie einer Abstoßung</i>	<i>64</i>
<i>Abb. 4.3:</i>	<i>Einteilung der AVR nach Dorling</i>	<i>68</i>
<i>Abb. 4.4:</i>	<i>Berni</i>	<i>70</i>

Tabellen:

<i>Tab. 3.1:</i>	<i>Versuchsdaten der Gruppe LR-h</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 3.2:</i>	<i>Semiquantitative Auswertung der histologischen Ergebnisse LR-h</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 3.3:</i>	<i>Versuchsdaten der Gruppe LR-o</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 3.4:</i>	<i>Histologische Befunde der Gruppe LR-o</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 3.5:</i>	<i>Verlaufsparameter der Gruppe DAF-h</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 3.6:</i>	<i>Histologische Befunde der Gruppe DAF-h</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 3.7:</i>	<i>Verlaufsparameter der Gruppe DAF-o</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 3.8:</i>	<i>Histologische Befunde der Gruppe DAF-o</i>	<i>55</i>
<i>Tab. 4.1:</i>	<i>Einteilung der HAR nach Rose</i>	<i>59</i>

7.3. Publikationen

Originalarbeiten

Guba M and Rentsch M, **Wimmer CD**, Uemueksuez A, Illner WD, Schönermarck U, Land WG, Jauch KW, Arbogast H. Calcineurin-inhibitor avoidance in Renal Allograft Recipients using ATG and Basiliximab combined with Mycophenolate Mofetil.

Transpl Int. 2008 Feb 16; [Epub ahead of print]

Wimmer CD, Rentsch M, Crispin A, Illner WD, Arbogast H, Graeb C, Jauch KW, Guba M. The janus face of immunosuppression - de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich.

Kidney Int. 2007 Jun;71(12):1271-1278. Epub 2007 Feb 28.

Fertmann JM and **Wimmer CD**, Arbogast HP, Illner WD, Tarabichi A, Calasan I, Dieterle C, Land W, Jauch KW, Hoffmann JN. Single-shot antithrombin in human pancreas-kidney transplantation: reduction of reperfusion pancreatitis and prevention of graft thrombosis.

Transpl Int. 2006 Jun;19(6):458-465.

Arbogast H, Hueckelheim H, Schneeberger H, Illner WD, Tarabichi A, Fertmann J, **Wimmer CD**, Hillebrand GF, Mistry-Burchardi N, Thomae R, Acikgoz A, Land W. A calcineurin antagonist-free induction/maintenance strategy for immunosuppression in elderly recipients of renal allografts from elderly cadaver donors: long-term results from a prospective single centre trial. *Clin Transplant.* 2005 Jun;19(3):309-315.

Brenner P, Schmoeckel M, **Wimmer C**, Rucker A, Eder V, Uchita S, Brandl U, Hinz M, Felbinger T, Meiser B, Hammer C, Reichenspurner H, Reichart B. Combination of hDAF-transgenic pig hearts and immunoabsorption in heterotopic xenotransplantation of immunosuppressed baboons. *Transplant Proc.* 2005 Jan-Feb;37(1):483-486.

Brenner P, Schmoeckel M, **Wimmer C**, Eder V, Rucker A, Felbinger T, Uchita S, Hinz M, Brandl U, Meiser B, Reichenspurner H, Hammer C, Reichart B. Mean xenograft survival of 14.6 days in a small group of hDAF-transgenic pig hearts transplanted orthotopically into baboons. *Transplant Proc.* 2005 Jan-Feb;37(1):472-476.

Uchita S, Thein E, Huber H, **Wimmer C**, Kur F, Brenner P, Hammer C. Porcine heart xenograft function and hyperacute rejection: the role of thrombin inhibition.

Transplant Proc. 2001 Feb-Mar;33(1-2):729-31.

Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, **Wimmer C**, Rucker A, Eder V, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Mueller-Hoecker J, Hammer C, Reichart B. Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons using immunoabsorption of antibodies and complement factors.

Transpl Int. 2000;13 Suppl 1:508-517.

Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, **Wimmer C**, Rucker A, Eder V, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Mueller-Hoecker J, Hammer C, Reichart B. IG-Therasorb immunoapheresis in orthotopic xenotransplantation of baboons with landrace pig hearts.

Transplantation. 2000;69:208-214.

Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Felbinger T, Hinz M, Eder V, Rucker A, **Wimmer C**, Uchita S, Kriegeskorte S, Meiser B, Müller-Höcker J, Seidel D, Hammer C, Reichart B. Technique of immunoapheresis in heterotopic and orthotopic xenotransplantation of pig hearts into cynomolgus and rhesus monkeys. *Transplant Proc.* 2000;32:1087-1088.

Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Rucker A, **Wimmer C**, Eder V, Hinz M, Hammer C, Reichart B. Technique of Ig-Therasorb immunoabsorption for prevention of hyperacute xenograft rejection in a baboon model with orthotopic xenotransplantation of the pig hearts. *Langenbecks Arch Chir.* 1999;1:977-980.

7.4. Dank

Der erster Dank gilt meinen lieben Eltern für die rückhaltlose Unterstützung während meines schulischen und universitären Werdegangs.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. med. Bruno Reichart für die Möglichkeit dieser Forschungsarbeit sowie für die Überlassung des Themas.

Ebenso Herrn PD Dr. med. Paolo Brenner für die Betreuung dieser Arbeit, für die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Durchsicht der Manuskripte.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c.mult. Konrad Messmer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Chir. Forschung wie auch Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Claus Hammer für die immer wieder ermutigende und freundliche Begleitung unseres Forschungsvorhabens. Selber Dank gebührt allen Mitarbeitern des ICF, besonders Frau Gudrun Höbel, Silvia Münzing, Elke Rentsch, Annemarie Almeling und Herrn Dr. Jürgen Peters für so manche Rettung.

Den Herren Prof. Dr. med. Michael Schmoeckel und Prof. Dr. med. Hermann Reichenspurner für ihre unerschöpfliche Hilfe und Unterstützung, ebenso Herrn PD Dr. med. Thomas W. Felbinger, ohne dessen Einsatz und Wissen die Durchführung der herzchirurgischen Narkosen nicht machbar gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker und Frau Dr. Gilda Pino-Chavez für die Begutachtung der histologischen Befunde, besonders Herrn Prof. Müller-Höcker für die Durchführung der Elektronenmikroskopie und teilweise Anfertigung der Histologien.

Besonderer Dank gilt meinen „Mitreibern“ Veronika Eder, Alex Rucker, Harald Huber, Dr. Michael Hinz, Sven Kriegeskorte sowie Herrn Shunji Uchita MD für Ihre unermüdliche Hilfe.

Zu guter Letzt danke ich meiner geliebten Frau für ihre ermutigende Unterstützung und Hilfe, womit diese Arbeit endlich abgeschlossen wurde.

7.5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	WIMMER Cosmas Damian
Geburtstag	27. Mai 1974
Geburtsort	Griesbach im Rottal
Eltern	WIMMER Peter, Dr. jur. † und Rosemarie, geb. Hauer
Familienstand	verheiratet, WIMMER Ramona, geb. Schütz

Schulische und Universitäre Ausbildung

1980-1984	Grundschule, Pfarrkirchen
1984-1993	Humanistisches Gymnasium der Benediktinerabtei Ettal
9/93 – 9/94	Freiwilliges Soziales Jahr, Kreiskrankenhaus Pfarrkirchen
ab 5/1995	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
9/1997	Physikum
9/1998	Erstes Staatsexamen
4/2001	Zweites Staatsexamen
5/2002	Drittes Staatsexamen

Praktisches Jahr

4-8/2001	Chirurgie: Chirurgische Klinik der LMU, Klinikum Grosshadern
8-12/2001	Wahlfach Orthopädie: Orthopädische Klinik der LMU, Grosshadern
12/01 – 3/02	Innere Medizin: Medizinische Klinik- Innenstadt, Klinik der LMU

Berufliches

10/02 - 03/04	Arzt im Praktikum in der Abteilung für Transplantationschirurgie, Chirurgische Klinik Großhadern, Klinikum der LMU München
seit 04/04	Wissenschaftlicher Assistent der Chirurgie bei Prof. Dr. med. K-W Jauch an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern, LMU München
02/ 06-01/07	Abordnung Chirurgische Klinik Memmingen