

**Immunadsorption bei der heterotopen und orthotopen  
Xenotransplantation von Pavianen, Cynomolgus- und  
Rhesusaffen mit Landrasse- und hDAF-transgenen  
Schweineherzen**

Veronika Eder



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

**Immunadsorption bei der heterotopen und orthotopen  
Xenotransplantation von Pavianen, Cynomolgus- und Rhesusaffen  
mit Landrasse- und hDAF-transgenen Schweineherzen**

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

vorgelegt von  
Veronika Eder  
aus  
München  
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 1. Berichterstatter:                                | Prof. Dr. med. Bruno Reichart        |
| 2. Berichterstatter:                                | Prof. Dr. med. Michael Fischereder   |
| Mitberichterstatter:                                | Prof. Dr. med. Rudolf Wank           |
|   | PD Dr. med. Christiane J. Bruns      |
|   | Prof. Dr. med. Hans-Gustav Klobeck   |
| Mitbetreuung durch den<br>promovierten Mitarbeiter: | PD Dr. med. Paolo Brenner            |
| Dekan:  | Prof. Dr. med. Dr. h. c. Klaus Peter |
| Tag der mündlichen Prüfung:                         | 02.12.2004                           |

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	1
1.1.	XENOTRANSPLANTATION.....	1
1.2.	HISTORISCHE ENTWICKLUNG.....	3
1.3.	HYPERAKUTE ABSTOSSUNG.....	4
1.4.	AKUTE VASKULÄRE ABSTOSSUNG.....	8
1.5.	AKKOMODATION UND ZELLULÄRE ABSTOSSUNG.....	10
1.6.	STRATEGIEN ZUR VERMEIDUNG DER XENOTRANSPLANTATABSTOSSUNG.....	12
1.6.1.	<i>Immunsuppression und toleranzinduzierende Maßnahmen</i> .....	12
1.6.2.	<i>Hemmung des Komplementsystems</i> .....	13
1.6.3.	<i>Entfernung xenoreaktiver Antikörper</i> .....	14
1.6.4.	<i>Modifikation des Spenders</i> .....	18
<b>2.</b>	<b>ZIELE DER VORLIEGENDEN UNTERSUCHUNG</b> .....	22
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b> .....	23
3.1.	GENEHMIGUNG.....	23
3.2.	TIERE.....	23
3.3.	SPENDEROPERATION.....	25
3.4.	EMPFÄNGEROPERATION.....	26
3.5.	PERIOPERATIVE IMMUNADSORPTION.....	27
3.5.1.	<i>Prinzip der Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen</i> .....	27
3.5.2.	<i>Technische Durchführung der Immunadsorption</i> .....	28
3.5.3.	<i>Immunadsorptionsbehandlung der Empfänger</i> .....	30
3.6.	POSTOPERATIVES MANAGEMENT UND IMMUNSUPPRESSION.....	32
3.7.	PARAMETER.....	33
3.7.1.	<i>Messprotokoll</i> .....	33
3.7.2.	<i>Messmethoden</i> .....	34
3.7.2.1.	<i>Immunglobuline und Komplementfaktoren</i> .....	34
3.7.2.2.	<i>Anti-Pig-Antikörpertiter</i> .....	35
3.7.2.3.	<i>Blutbild</i> .....	36
3.7.2.4.	<i>Kreatinkinase-MB Masse</i> .....	36
3.7.2.5.	<i>Gerinnungszeit</i> .....	37
3.8.	HISTOLOGIE UND ABSTOSSUNGSKRITERIEN.....	37

3.9.	STATISTISCHE METHODEN.....	38
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	40
4.1.	EFFIZIENZ UND AUSWIRKUNGEN DER IMMUNADSORPTIONSBEHANDLUNGEN.....	40
4.1.1.	<i>Durchführung der präoperativen Immunadsorptionsbehandlung</i> .....	40
4.1.2.	<i>Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem</i> .....	42
4.1.3.	<i>Beeinflussung der hämatologischen Parameter</i> .....	44
4.1.4.	<i>Reduktion des Anti-Pig-Antikörpertiters</i> .....	45
4.1.5.	<i>Reduktion von Immunglobulinen</i> .....	47
4.1.6.	<i>Reduktion von Komplementfaktoren</i> .....	49
4.2.	TRANSPLANTATÜBERLEBEN UND HISTOLOGIE.....	50
4.3.	TRANSPLANTATION UND POSTOPERATIVER VERLAUF.....	53
4.3.1.	<i>Vorstudien mit Cynomolgus- und Rhesusaffen</i> .....	53
4.3.2.	<i>Vorstudien mit Pavianen</i> .....	57
4.3.3.	<i>Langzeitstudien: hXHTx mit Landrasseschweineherzen</i> .....	62
4.3.4.	<i>Langzeitstudien: hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen</i> .....	69
4.3.5.	<i>Langzeitstudien: oXHTx</i> .....	74
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	77
5.1.	KLINISCHE ERFAHRUNGEN MIT IG-THERASORB <sup>®</sup> -IMMUNADSORPTION .....	77
5.2.	IMMUNADSORPTION IM XENOTRANSPLANTATIONSMODELL .....	82
5.3.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	85
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	95
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	96
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b> .....	119
8.1.	MASSEINHEITEN UND ABKÜRZUNGEN.....	119
8.2.	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	123
8.3.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	126
8.4.	DANKSAGUNG.....	133
8.5.	LEBENS LAUF.....	134

# 1. Einleitung

## 1.1. Xenotransplantation

Die Allotransplantation, also die Transplantation von menschlichen Organen, hat in den letzten Jahrzehnten zunehmend Erfolge verzeichnet und sich als klinische Therapiemethode etabliert. So hat auch die Verpflanzung menschlicher Herzen seit Jahren einen wichtigen Stellenwert bei der Behandlung schwerer chronischer Herzkrankheiten im Endstadium, wie z.B. koronarer Herzkrankheit oder Kardiomyopathie (92).

Die Überlebenszeit und auch die Lebensqualität von Herzpatienten kann entscheidend verbessert werden. Dies hat jedoch auch einen stetig steigenden Bedarf an Spenderherzen zur Folge. Gleichzeitig bleibt aber die Zahl der verfügbaren Spenderorgane gleich oder geht sogar zurück, sowohl bedingt durch einen Mangel an geeigneten Spendern als auch durch die viel zu geringe Bereitschaft der Bevölkerung zur Organspende. Inzwischen kann nur noch ein Bruchteil der Patienten auf den Wartelisten ein geeignetes Organ erhalten (70). Jährlich steigt die Diskrepanz zwischen der Zahl der verfügbaren Organe und der Anzahl wartender Empfänger um 10 bis 15 % an (43). 2001 standen 11500 Patienten auf der Warteliste von Eurotransplant bei nur 3233 postmortalen Organspenden (lt. Deutsche Stiftung Organtransplantation).

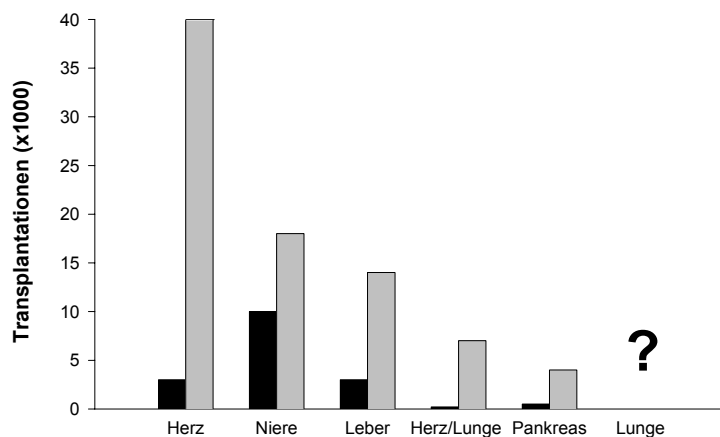


Abb. 1.1.: Der Mangel an Organen für Transplantationen. Schwarze Balken = Anzahl der jährlich in den USA durchgeführten Transplantationen. Graue Balken = Zahl von Transplantationen, die durchgeführt würden, wenn genügend Spenderorgane vorhanden wären (Evans 1991; 71).

Deshalb wird schon lange nach möglichen Alternativen zur allogenen Transplantation gesucht. Ein Ansatz, den Mangel an Spenderorganen zu verringern, wäre die Verpflanzung tierischer Organe auf den Menschen, Xenotransplantation (XT) genannt. Die XT hätte den entscheidenden Vorteil, dass in fast unbegrenztem Ausmaß Spenderorgane zur Verfügung stünden und jeder dafür in Frage kommende Patient ein Organ erhalten könnte. Man könnte Transplantationen über längere Zeiträume planen und Organe ohne Ischämiezeit transplantieren, da die Spender vor Ort vorhanden wären. Strittige Diskussionen um die Hirntoddiagnostik würden sich erübrigen und nicht zuletzt könnte damit der illegale Handel mit menschlichen Organen unterbunden werden.

Aufgrund der nahen phylogenetischen Verwandtschaft sind als Spendertiere zunächst Primaten in Betracht zu ziehen. Aus immunologischer Sicht stieße man hier auf die geringsten Schwierigkeiten und die Anatomie und Physiologie von Primatenorganen entspricht weitgehend den Verhältnissen beim Menschen. Jedoch stehen Menschenaffen alle unter Artenschutz und selbst ein ausgewachsener männlicher Pavian erreicht nur ein Gewicht von 35 kg und hat damit immer noch viel zu kleine Organe im Vergleich zum erwachsenen Menschen. Auch die Aufzucht eigens zu Transplantationszwecken brächte keine wesentliche Verbesserung, da immer nur wenige Jungtiere geboren werden und sie erst nach Jahren ausgewachsen sind. Die Gefahr der Übertragung viraler Infektionen ist ebenfalls sehr hoch. Menschenaffen sind Überträger vieler Zoonosen, die auch dem Menschen gefährlich werden können (28). Zudem ist die Verwendung von Primaten als Organspender wegen ihrer Ähnlichkeit mit dem Menschen ethisch äußerst fragwürdig und wird deshalb weitgehend abgelehnt.

Das Hausschwein ist trotz der entfernten Verwandtschaft als geeigneter anzusehen. Es zeichnet sich durch eine hohe Nachkommenschaft bei kurzer Tragezeit aus, ist einfach und kostengünstig zu halten und überall verfügbar. Die kurze Generationszeit erleichtert zudem die genetische Manipulation des Schweinegenoms. Die Größe der Organe eines ausgewachsenen Schweins entspricht in etwa den Verhältnissen beim Menschen. Vor allem „einfache“ Organe wie das Herz zeigen keine relevanten Unterschiede im Stoffwechsel und so dürfte es keine großen Probleme bei der Anpassung an den menschlichen Organismus geben (42, 180). Die Übertragung klinisch relevanter Zoonosen ist geringer als bei Primaten (74), es besteht jedoch die Gefahr der Übertragung von PERV (*porcine endogenous retroviruses*), die in die DNA von Schweinezellen integriert sind (226). Es wurde *in vitro* eine Infektion humaner Zellen durch PERV beobachtet (137, 157), jedoch gibt es bislang keine Hinweise auf eine *in vivo*-Transmission bei Menschen, deren Blutkreislauf in Kontakt mit



lebendem Gewebe vom Schwein kam (91, 151, 156). Ein Restrisiko ist jedoch nicht auszuschließen und es gibt inzwischen Überlegungen, erregerefreie Schweinestämme zu züchten.

Aufgrund der entscheidenden Vorteile von Schweinen als Organspender konzentriert man sich in der experimentellen Xenotransplantationsforschung inzwischen fast ausschließlich darauf, die Transplantation von Schweineorganen auf den Menschen zu ermöglichen. Allerdings wird ein Schweineorgan bei der Verpflanzung in einen Menschen oder Primaten hyperakut, d.h. innerhalb weniger Minuten, abgestoßen, da das Schwein große immunologische Unterschiede zu Menschen und Affen aufweist. Durch die Fortschritte in der Aufdeckung der immunologischen Grundlagen der Xenotransplantatabstoßung und die Entwicklung neuer Medikamente und Therapieformen bieten sich jedoch viel versprechende Ansätze zur Abstoßungstherapie.

## **1.2. Historische Entwicklung**

Bereits vor über hundert Jahren wurden erste Tierversuche zur Transplantation vaskularisierter Organe durchgeführt. Man transplantierte sowohl zwischen Mitgliedern der selben Spezies als auch zwischen verschiedenen Spezies. Nachdem man die chirurgischen Techniken zur Durchführung einer Transplantation optimiert hatte, zeigte sich jedoch, dass das Transplantat entweder gar nicht funktionierte oder ein Versagen nach Stunden bis Tagen unvermeidlich war (27, 209). Die immunologische Basis der Transplantatabstoßung war noch nicht bekannt und es gab keine Möglichkeiten, eine Immunantwort zu unterbinden. Die erste bekannte XT beim Menschen wurde 1894 beschrieben, als einem Kind Pankreasgewebe vom Schaf transplantiert wurde (218). Princeteau (166), Jaboulay (96), Unger (210) und Neuhof (144) berichteten in den Jahren 1905-1923 über weitere Transplantationen von Nieren oder Teilen von Nieren verschiedener Tiere in Menschen, aber ohne oder mit nur kurzzeitigem Erfolg.

Die Einführung immunsuppressiver Medikamente in den 1960er Jahren ermöglichte erstmals die klinische Allotransplantation. Die großen Erfolge bei der allogenen Nierentransplantation riefen eine stark steigende Nachfrage nach Organen hervor, die durch das Angebot bei weitem nicht gedeckt werden konnte. Dies erzeugte wiederum ein verstärktes Interesse an der XT. Man konzentrierte sich zunächst auf die klinische Transplantation tierischer Organe auf den Menschen, während experimentelle Untersuchungen mit nichtmenschlichen Primaten als Empfänger vor den 1990er Jahren nur vereinzelt beschrieben worden sind (115).

Hardy et al. (89) führten die erste XT eines Herzens und die erste Herztransplantation beim Menschen überhaupt im Januar 1964 durch. Das transplantierte Schimpansenherz war zu klein und konnte keine adäquate Pumpleistung erbringen. Der Empfänger starb nach einer Stunde. 1968 transplantierten Ross (29) und Cooley (34) Schweine- bzw. Schafherzen menschlichen Empfängern mit Herzkrankheiten im Endstadium. Beide Transplantate unterlagen einer hyperakuten Abstoßungsreaktion. Mit der heterotopen Transplantation eines Pavian- und darauf eines Schimpansenherzen bei dem gleichen Patienten erreichten Barnard et al. (13) eine Überlebenszeit von vier Tagen, dann versagte das eigene Herz des Patienten. Bailey et al. (9) transplantierten einem menschlichen Neugeborenen mit hypoplastischem linken Ventrikel (Baby Fae) ein Pavianherz, das zwanzig Tage lang arbeitete, bis das Kind an Multiorganversagen starb. Histologische Untersuchungen wiesen auf einen humoralen Abstoßungsprozess im Transplantat hin.

In jüngerer Zeit wurde von Czaplicki et al. (52) einem Patienten mit Marfan-Syndrom ein Schweineherz transplantiert. Das Blut des Empfängers wurde vor der Transplantation über einen extrakorporalen Kreislauf durch ein Schweineherz perfundiert, um präformierte xenoreaktive Antikörper zu entfernen. Der Patient überlebte 24 Stunden. Die wichtigsten Beiträge zur klinischen Xenotransplantation von Herzen sind in Tabelle 1.1. aufgelistet.

<b>Autor (Ref.)</b>	<b>Jahr</b>	<b>Spender</b>	<b>Transplantation</b>	<b>Überlebenszeit</b>
Hardy et al. (89)	1964	Schimpanse	Orthotop	Keine Transplantatfunktion
Ross et al. (29)	1968	Schwein	Orthotop	Keine Transplantatfunktion
Cooley et al. (34)	1968	Schaf	Orthotop	Keine Transplantatfunktion
Barnard et al. (13)	1977	Schimpanse	Heterotop	4 Tage
		Pavian	Heterotop	Keine Transplantatfunktion
Bailey et al. (9)	1984	Pavian	Orthotop	20 Tage
Czaplicki et al. (52)	1992	Schwein	Orthotop	24 Stunden

*Tab. 1.1.: Veröffentlichte Berichte von klinischen Xenotransplantationen von Herzen.*

### **1.3. Hyperakute Abstoßung**

1970 schlussfolgerte Calne, dass es zwei verschiedene Arten von XT gibt, die sich durch die Art und den zeitlichen Verlauf der Abstoßungsreaktion unterscheiden (24). Zeigte sich innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Transplantation von Organen zwischen entfernt verwandten Spezies eine heftige Abstoßungsreaktion, genannt hyperakute Abstoßung (HAR), die schließlich zum irreversiblen Funktionsverlust des Transplantats führte (158), so nannte

man diese Spezieskombinationen diskordante XT. Dieses Phänomen unterschied sich von der langsam verlaufenden vaskulären und zellulären Abstoßung, die bei Transplantationen zwischen nahe verwandten Spezies (z.B. Schimpanse-Mensch) beobachtet wurde und innerhalb von Tagen oder Wochen zum Transplantatversagen führte (159). Diese Spender-Empfänger-Kombinationen wurden konkordant genannt.

Die hyperakute Abstoßung (HAR) wird durch xenoreaktive Antikörper, Endothelzellaktivierung und die Aktivierung und Ablagerung von Komplement verursacht (55, 58, 117, 148, 164). Die schnelle Kinetik der HAR, die innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden abläuft, lässt darauf schließen, dass die Immunantwort durch bereits beim Empfänger vorhandene, also präformierte, Antikörper hervorgerufen wird. Diese Antikörper werden, wie auch die Agglutinine des AB0- Systems, als „natürliche“ Antikörper bereits kurze Zeit nach der Geburt als Reaktion auf die Kohlenhydratantigene von Darmbakterien gebildet (79). Die HAR ist mit der Abstoßung von AB0-inkompatiblen Allotransplantaten oder der Transplantatabstoßung bei hochsensibilisierten Allotransplantatempfängern vergleichbar, wo ebenfalls präformierte Antikörper die Hauptursache der Abstoßung darstellen.

Etwa 80 % der natürlichen Antikörper von Menschen und Primaten, die bei der Xenotransplantatabstoßung eine Rolle spielen, also „xenoreaktiv“ sind, wurden als spezifisch charakterisiert für ein Kohlenhydrat, das endständig das Disaccharid Galactose- $\alpha$ (1-3)-Galactose aufweist (38, 85). Allerdings bilden nur Menschen, Primaten und Altweltaffen diese  $\alpha$ 1-3Gal-Antikörper, da ihnen das Enzym  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase, das die 1,3-Galactosylbindung knüpft, fehlt und sie deshalb das Antigen nicht besitzen (77, 78, 184). Alle anderen Säugetierspezies weisen das Enzym auf. Sie exprimieren eine endständige Galactose- $\alpha$ (1-3)-Galactose auf ihren Zelloberflächen und entwickeln daher keine Antikörper gegen dieses Epitop. Bei diesen Spezies werden  $\alpha$ 1-3Gal-Reste in großer Zahl auf den Endothelzelloberflächen der Blutgefäße von Organen wie Herz, Lunge, Leber, Niere und Pankreas exprimiert (147).

Die Kombination von Spezies, die beide keine  $\alpha$ 1-3Gal-Epitope besitzen (z.B. Primat-Mensch), oder von Spezies, bei denen in beiden Fällen  $\alpha$ 1-3Gal-Reste exprimiert werden (z.B. Meerschweinchen-Ratte), resultiert also nicht in einer HAR, sie ist konkordant. Dagegen führt die Übertragung von Organen zwischen diskordanten Spezies, also von einer Spezies, bei der die  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase aktiv ist (z.B. Schwein) auf eine Spezies mit präformierten  $\alpha$ 1-3Gal-Antikörpern (z.B. Primat), zu einer HAR. Eine Ausnahme bilden hier neugeborene Empfänger, die noch keine Anti- $\alpha$ Gal-Antikörper besitzen (100, 136). Bei der HAR sind

ausschließlich oder zu einem großen Teil präformierte xenoreaktive Antikörper der IgM-Klasse involviert (117, 152).

Eine wichtige Komponente der HAR diskordanter Xenotransplantate ist die Aktivierung des klassischen Komplementweges (55). Die Bindung xenoreaktiver Antikörper an das Oberflächenantigen führt zu einer Aktivierung der Serinesterase C1rs, die der Reihe nach mit den nächsten zwei Komponenten des klassischen Pfades reagiert; C4 und C2. Aus der Aktivierung von C4 resultiert die Anlagerung und kovalente Bindung des C4-Fragments an benachbarte Zelloberflächen, daraufhin die Bindung von C2 an C4b, die Spaltung von C2 durch zusätzliche C1s-Moleküle und die Formierung der membrangebundenen C3-Konvertase (C4b2a). Die Komplementkaskade setzt sich mit der Spaltung von C3 fort, wodurch der Entzündungsmediator C3a und die C5-Konvertase (C4b2a3b) gebildet werden. Durch die Aktivierung von C5 wird das Anaphylatoxin C5a freigesetzt und C5 mit C6 und C7 zusammengelagert, um den membranattackierenden Komplex (MAC) zu bilden, der zur Zerstörung der fremden Endothelzellen führt.

Nach der Aktivierung kann die Komplementkaskade durch verschiedene membranständige Faktoren reguliert werden. DAF (*decay accelerating factor*, CD55) ist ein integrales Membranprotein, das den Abbau der C3-Konvertase beschleunigt. MCP (*membrane cofactor protein*, CD46) fungiert als Kofaktor für die Inaktivierung von C3b. CD59 (Protectin) verhindert die Formierung des MAC, indem es die Bindung von C9 an C8 blockiert. CR-1 (*complement receptor-1*) besitzt zerfallsbeschleunigende Wirkung sowohl für die C3- als auch für die C5-Konvertase. Diese Proteine haben auch eine hemmende Wirkung auf die entsprechenden Stufen des alternativen Komplementweges (130). Die Komplementregulationsproteine sind speziesspezifisch, d.h. die z.B. auf einem Schweineorgan exprimierten Faktoren können das Komplementsystem von Menschen oder Primaten nicht effektiv kontrollieren (3, 174).

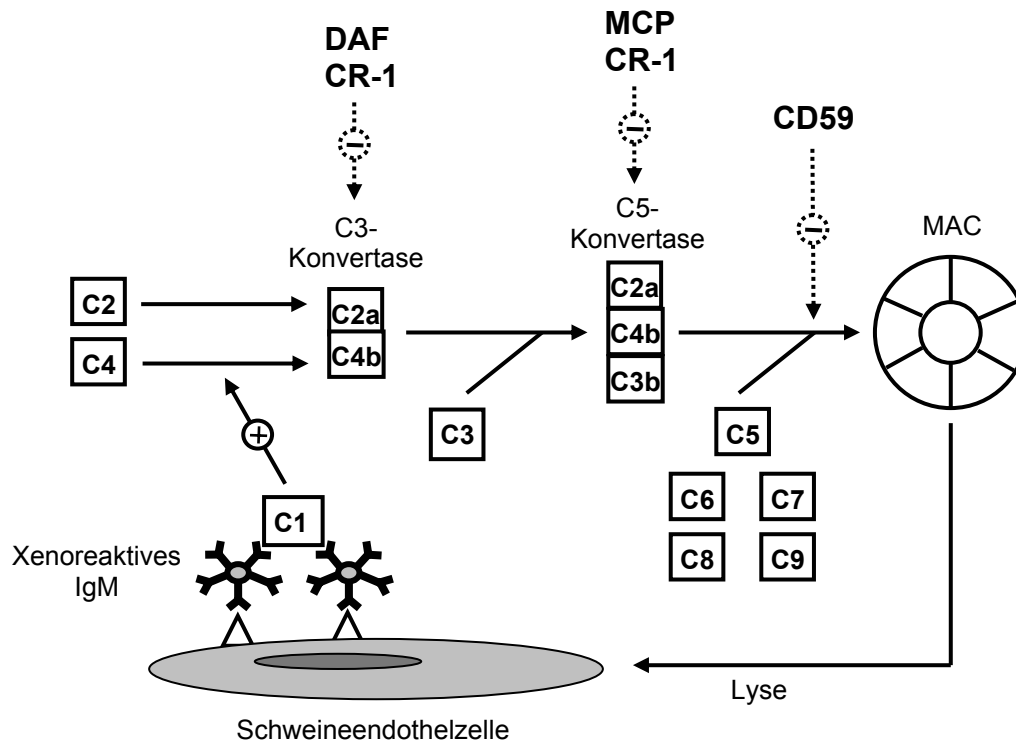


Abb. 1.2.: Aktivierung und Regulation des klassischen Komplementweges.

Die Aktivierung des alternativen Komplementweges erfolgt antikörperunabhängig durch fremde Polysaccharide und mikrobielle Oberflächen. Das Ausmaß der Beteiligung des alternativen Weges ist bei der HAR abhängig von der Spezieskombination. Er spielt jedoch bei der Abstoßung von Schwein-zu-Primat-Transplantaten lediglich eine untergeordnete Rolle (51).

Nach der Aktivierung des Komplementsystems induzieren die Anaphylatoxine C3a und C5a sowie Histamin und Serotonin die Bildung von Zytokinen, die zusammen mit Ablagerungen von Antikörpern und Komplement zur Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen führen (5). Dabei kommt es zur Verlagerung von Adhäsionsmolekülen an die Endothelzelloberflächen und zur Leukozytenadhäsion (82, 160). Zytokine, Antikörper- und Komplementablagerungen verursachen eine Kontraktion und Retraktion der Endothelzellen und damit die Bildung interzellulärer Spalten und die Exposition der darunterliegenden Basalmembran (177) sowie den Verlust von Heparansulfat (162), Antithrombin III (199) und Ekto-ADPase (47, 173). Dies führt zur Bildung einer prokoagulatorischen Oberfläche, die Plättchenaggregation und Fibrinablagerungen begünstigt (93). Durch den Kontakt mit der extrazellulären Matrix und mit C3a und C5a werden Plättchen aktiviert.

Es entstehen Mikrothromben, interstitielle Hämorrhagien und Ödeme (8, 67). Kurze Zeit nach Reperfusionbeginn verfärbt sich das Transplantat dunkelrot oder schwärzlich und die Funktion verschlechtert sich rapide. Die HAR kann durch die Entfernung präformierter Antikörper oder durch eine Hemmung des Komplementsystems vermieden werden (73, 121, 122, 189).

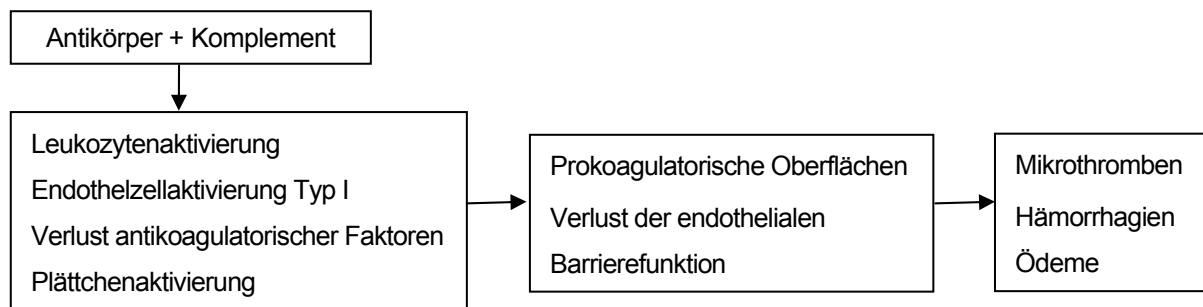


Abb. 1.3.: Pathogenese der hyperakuten Xenotransplantatabstoßung. Die ablaufende Reaktion führt innerhalb von Minuten bis Stunden zur HAR und damit zum irreversiblen Funktionsverlust des Transplantats.

#### 1.4. Akute vaskuläre Abstoßung

Kann die HAR vermieden werden, so unterliegen diskordante wie auch konkordante Xenotransplantate innerhalb der nächsten Tage bis Wochen der akuten vaskulären oder humoralen Abstoßung (AVR), auch *delayed xenograft rejection* (verzögerte Xenotransplantatabstoßung) genannt (7, 82). Während in die HAR eine Proteinsynthese-unabhängige Endothelzellaktivierung (Typ I) involviert ist, wird die AVR durch eine Typ II-Endothelzellaktivierung verursacht, die in der Induktion von Genen und Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und prokoagulatorischen Faktoren resultiert (26, 165). Die Typ II-Endothelzellaktivierung wird einerseits als zellvermittelt angesehen, andererseits als Folge fortschreitender Antikörper- und Komplementablagerungen (35) bzw. als persistierender Status nach einer Typ I-Aktivierung. Das wirft die Frage auf, ob die AVR als eigenständiger Abstoßungstyp oder als artifiziell verzögerte oder prolongierte Form einer HAR zu sehen ist. Die AVR weist jedoch histologische Unterschiede zur HAR auf und ist auch bei konkordanten XT zu beobachten, die keiner HAR unterliegen.

Zum Zeitpunkt der Entwicklung einer AVR akkumulieren xenoreaktive Antikörper im Transplantat (46, 134). Werden die Antikörper nach der XT wiederholt entfernt, kann eine AVR vermieden werden (123, 124). Unter Immunsuppression (IS) sind die neu gebildeten Antikörper ebenfalls zu einem großen Teil für Gal $\alpha$ 1-3Gal spezifisch (110). Anders als bei

der HAR sind jedoch IgG-Antikörper genauso wie IgM-Antikörper involviert, da in den Tagen nach der Transplantation ein Klassenwechsel von IgM nach IgG stattfindet (46, 59, 179). Weiterhin kommt es zu einer Aktivierung des klassischen Komplementweges (127). Auch bei der AVR erfolgt im Schwein-zu-Primat-Modell die Aktivierung der Komplementkaskade antikörpervermittelt (134, 220).

Es gibt Hinweise darauf, dass auch zellvermittelte Mechanismen mit der AVR assoziiert sind, die mit ursächlich sind für die Endothelzellaktivierung Typ II (87) und die Infiltration von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten/Makrophagen in das Transplantat (95). NK-Zellen können antikörperunabhängig xenogene Epitope erkennen (94) und Endothelien zerstören (86). Zusätzlich zu den antikörperunabhängigen Mechanismen kommt es aber auch zu einer antikörpergebundenen zellvermittelten Zytotoxizität mit Beteiligung von NK-Zellen und Makrophagen (125). Die Rolle von NK-Zellen und Makrophagen bei der AVR wird gegenwärtig kontrovers diskutiert (211). Es ist noch unklar, ob zellvermittelte Mechanismen eine Komponente der AVR darstellen oder nur eine inflammatorische Reaktion auf die Gewebeschädigung repräsentieren. Im Vergleich zu akuten Allotransplantatabstoßung finden sich weniger zelluläre Infiltrationen und diese Zellen werden bei der AVR in variabler Ausprägung gesehen (25).

Durch die Endothelzellaktivierung (141) und die gestörte Balance gerinnungsregulierender Faktoren entsteht ein prokoagulatorisches Milieu, das zu intravaskulärer Koagulation führt, einem Hauptcharakteristikum der AVR (99). Die genetische Inkompatibilität membranständiger gerinnungshemmender Faktoren resultiert in einer noch weiter gesteigerten Gerinnungsneigung. Zytokine und prokoagulatorische Faktoren aktivieren Plättchen und verursachen eine Entzündungsreaktion (7).

Die AVR ist histologisch charakterisiert durch fokale Nekrosen, disseminierte intravasale Koagulation, interstitielle Hämorrhagien und vaskuläre Ödeme. Der Prozess verläuft langsamer als bei der HAR und ist bei frühzeitiger Therapie, z.B. Erhöhung der immunsuppressiven Dosis (2), reversibel.

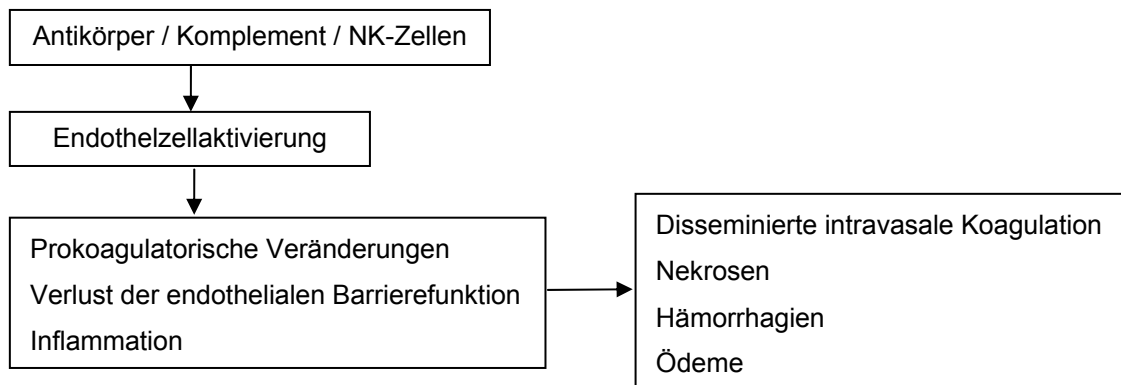


Abb. 1.4.: Pathogenese der akuten vaskulären Xenotransplantatabstoßung. Die AVR tritt Tage bis Wochen nach der Transplantation auf und ist unter Umständen reversibel.

### 1.5. Akkomodation und zelluläre Abstoßung

Es kommt nach der Vermeidung oder erfolgreichen Therapie einer AVR entweder zur Akkomodation oder zu zellulären, chronischen Abstoßungsreaktionen, die wahrscheinlich mit dem Verlauf bei Allotransplantationen vergleichbar sind. Eine chronische Abstoßung kann sich auch nach einer Phase der Akkomodation entwickeln. Jedoch konnten bisher aufgrund der kurzen Überlebenszeiten bei diskordanten XT nur selten chronische Abstoßungsprozesse beobachtet werden.

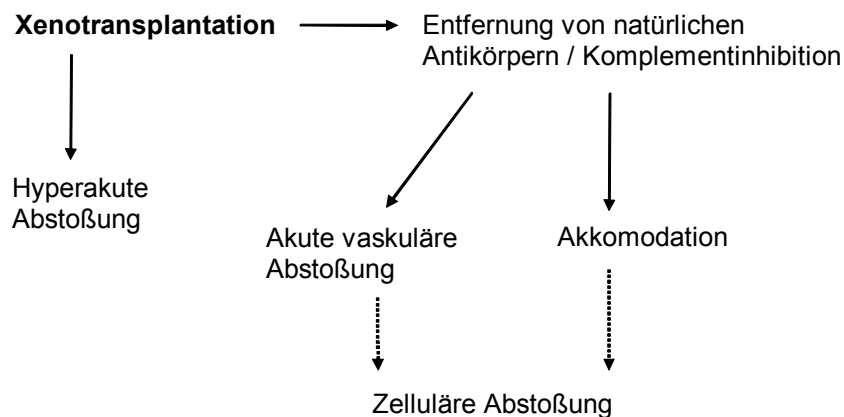


Abb. 1.5.: Mögliche Resultate diskordanter Xenotransplantationen. Die Entfernung von natürlichen Antikörpern und/oder die Hemmung des Komplementsystems verhindert die hyperakute Abstoßung, was die Entwicklung einer akuten vaskulären Abstoßung oder Akkomodation zur Folge hat.

Die Akkomodation (Anpassung) ist definiert als das Überleben und Funktionieren des Transplantates trotz Rückkehr der Antikörper nach vorübergehender Depletion, auch bei Vorhandensein eines funktionierenden Komplementsystems (4). Sie wurde erstmals bei AB0-



inkompatiblen Allotransplantaten beschrieben (10). Mögliche Ursachen können qualitative Änderungen in der Antigenexpression der Endothelzellen nach längerem Kontakt mit zirkulierenden Antikörpern sein (32). Auch könnte eine adaptive Fähigkeit der aktivierten Endothelzellen eine Rolle spielen, die sie ein begrenztes Maß an antikörpervermittelter Schädigung tolerieren lässt (68). Im Schwein-Primaten-Modell ist die Entwicklung der Akkomodation nach Antikörperdepletion oder Komplementinhibition mehrfach beschrieben worden (73, 123, 189).

Über die zelluläre Immunantwort auf Xenotransplantate ist wenig bekannt. Die teils widersprüchlichen Resultate von *in vitro*-Studien sind nicht generell auf die Situation *in vivo* übertragbar und vermutlich spielt auch die Wahl der Spezieskombination eine Rolle. Die Beobachtungen stützen sich vor allem auf konkordante Modelle kleiner Säuger. Es findet ein Prozess ähnlich der chronischen Allotransplantatabstoßung statt. Die Gewebe zeigen interstitielle Fibrosen, Intimaverdickung und eine Infiltration mit MHC-Klasse II-positiven und CD4-positiven Makrophagen (31, 97).

Es ist bekannt, dass CD4-positive Zellen eine große Rolle bei der xenogenen Abstoßung spielen, aber nicht die gleiche wie bei der Allotransplantatabstoßung (140). Die speziesspezifischen Unterschiede im Aufbau der MHC-Moleküle führen vermutlich nicht wie bei Allotransplantaten zu einer direkten Erkennung des fremden Gewebes über dessen MHC-Moleküle (139, 219), sondern zu einer indirekten T-Zell-Aktivierung über antigenpräsentierende Zellen (65). Von Makrophagen und NK-Zellen aktiviert können CD4-positive T-Zellen bei Mäusen eine schnelle Abstoßung von Schweine-Pankreasgewebe herbeiführen (225). Bei avaskulär transplantierten Geweben, wie Pankreasinseln, scheint die zelluläre Abstoßung mehr im Vordergrund zu stehen und sie unterliegen keiner HAR (60). Knorpel vom Schwein, transplantiert in Cynomolgusaffen, zeigte ebenfalls ausgeprägte Infiltrationen von Makrophagen. Wurden die  $\alpha$ Gal-Epitope des Knorpels zuvor enzymatisch entfernt, waren der Grad der Infiltration und der Antikörperanstieg beim Empfänger wesentlich geringer (201). Das lässt vermuten, dass auch chronische zelluläre Reaktionen antikörpervermittelt stattfinden und genetische Inkompatibilitäten einen gewissen Schutz vor zellulären Abstoßungsreaktionen bieten, während Xenotransplantate auf humoraler Ebene hoch immunogen sind.

## **1.6. Strategien zur Vermeidung der Xenotransplantatabstoßung**

### **1.6.1. Immunsuppression und toleranzinduzierende Maßnahmen**

Zur Vermeidung einer HAR testete man im klinischen und im experimentellen Xenotransplantationsmodell zunächst die Wirkung verschiedener aus der Allotransplantation bekannter Immunsuppressiva in Mono- oder Kombinationstherapie. Azathioprin und Deoxyspergualin hemmen vorrangig T-Lymphozyten und haben damit wenig Einfluss auf die Antikörperproduktion. Glucocorticoide, FK 506 (Tacrolimus) und Cyclosporin A wirken fast ausschließlich auf T-Zellen. Methotrexat wirkt dagegen vor allem gegen antikörperproduzierende B-Zellen. Mycophenolat Mofetil hemmt die Proliferation aktivierter T- und B-Lymphozyten und damit die Antikörperproduktion, auch im Xenotransplantationsmodell (72). Cyclophosphamid, ein alkylierendes Zytostatikum, wirkt zytotoxisch auf T- und B-Lymphozyten und damit auf die zelluläre und humorale Immunantwort. Es ist in hohen Dosen das potenteste Mittel zur Vermeidung einer xenogenen AVR (215) und hemmt die Produktion xenoreaktiver Antikörper (116). Es wird aber meist nur als Induktionstherapie bzw. intermittierend verabreicht, da es bei längerfristiger Anwendung in hoher Dosierung toxisch wirkt.

Es konnte mit Immunsuppression (IS) alleine keine signifikant verlängerte Überlebenszeit und kein ausreichender Schutz vor einer HAR bei adulten Tieren festgestellt werden (39, 73, 122), mit Ausnahme einer Studie von Zaidi et al. (227), die ein Transplantatüberleben von Schweinenieren von bis zu 30 Tagen bei Cynomolgusaffen beschrieben, die mit einer Kombination von Cyclophosphamid, Cyclosporin A und Corticosteroiden behandelt worden waren. Jedoch überlebten auch heterotop transplantierte Wildtyp-Herzen ohne IS bei Cynomolgen bis zu 4 Tage und wurden nur teilweise hyperakut abgestoßen (189), was die Eignung dieses Modells zur Untersuchung der HAR fraglich erscheinen lässt.

Jedoch kann durch IS eine AVR unter Umständen vermieden oder rückgängig gemacht werden (2, 116, 215). Die momentan im diskordanten Modell erfolgreichste Kombination aus Immunsuppressiva besteht aus Cyclosporin A, Cyclophosphamid, Corticosteroiden und evtl. Mycophenolat Mofetil (s. Tab. 1.3.).

Durch die Erzeugung eines Chimärismus aus Spender- und Empfängerknorpelmark kann eine Toleranz von T- und B-Zellen gegenüber den Antigenen des Transplantates und eine Inhibition der zellulären Abstoßung erreicht werden (110). Im Gegensatz zu Allotransplantationen, bei denen die Transplantate nach Induktion eines lymphohämatopoetischen Chimärismus ohne IS jahrelang überlebten (101), wurden bei

diskordanten XT in Kombination mit IS und Antikörperdepletion jedoch nur Überlebenszeiten von maximal 15 Tagen erreicht (111, 178, 179).

Eine Splenektomie des Empfängers wird von vielen Arbeitsgruppen befürwortet, der Nutzen ist jedoch nicht erwiesen. In Studien mit unbehandelten Empfängern konnte keine verlängerte Überlebenszeit erreicht werden, wenn eine Splenektomie durchgeführt wurde (39, 106). In Kombination mit IS (FK 506) zeigte sich eine Woche nach Splenektomie keine Änderung des präoperativen Komplement- und Antikörperspiegels (75, 179). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass bei splenektomierten Tieren die Antikörpertiter nach ihrer Depletion langsamer ansteigen (110).

### **1.6.2. Hemmung des Komplementsystems**

Die Entfernung oder Inhibition von Komplementfaktoren ist eine effektive Methode, um eine HAR zu verhindern. Vor der Transplantation verabreichtes CVF (*cobra venom factor*) aktiviert die Komplementkaskade und verbraucht damit die Körperspeicher an Komplementfaktoren, so dass nach Kontakt des Blutkreislaufs mit dem Xenotransplantat keine weitere Komplementaktivierung stattfinden kann (105). In Kombination mit IS und Plasmaaustausch wurde eine Überlebenszeit heterotop transplantierte Schweineherzen bei Pavianen von bis zu 17 Tagen erreicht (121). Mit IS und CVF überlebten die Herzen bis zu 25 Tage. Allerdings wurde über eine gesteigerte Neigung zu Infektionen berichtet (106). Die Überlebenszeit diskordanter Xenotransplantate wurde mit komplementhemmenden, synthetischen Medikamenten wie FUT-175 und K76COOH nur um Stunden verlängert, da diese Agenzien sich als nicht ausreichend wirksam erwiesen (104, 179). Durch die kontinuierliche Infusion humanen IgGs verlängerte sich die Überlebenszeit von Schweineherzen um bis zu 10 Tage (128). Die Wirkung des Immunglobulins besteht vermutlich in der Bindung und Neutralisation von C3b, C4b und C1q (15).

Es wurden schließlich eine Reihe rekombinanter Komplementregulationsproteine hergestellt, unter anderem sCR-1 (*soluble complement receptor-1*), eine lösliche Form von humanem CR-1, einem integralen Membranprotein, das die C3- und die C5-Konvertase hemmt. sCR-1 ist ein potenter Komplementinhibitor und verhindert bei diskordanten XT eine HAR. Eine einzelne Dosis verlängerte die Überlebenszeit von Schweineherzen bei unbehandelten Cynomolgusaffen um 48-90 Stunden (168). Die kontinuierliche Infusion von sCR-1 hatte ein Transplantatüberleben von 5 und 7 Tagen zur Folge (167). Mit IS (Cyclosporin, Cyclophosphamid und Steroide) und kontinuierlicher sCR-1-Infusion überlebten die

Transplantate 21 und 31 Tage (58). Ein weiteres Tier erhielt neben IS zweimal täglich eine sCR-1-Gabe bis zum 21. postoperativen Tag. Das Transplantat arbeitete 42 Tage lang (57). Mit einer Einzeldosis CAB-2.0, einem löslichen chimären Protein aus den komplementhemmenden Faktoren hDAF und hMCP, konnte das Transplantatüberleben von Herzen ohne IS auf 7 Stunden bis 4,5 Tage verlängert werden und bei mehrfachen Gaben auf 4 Tage. Kontrollherzen arbeiteten durchschnittlich 1,26 Stunden (183). Weitere Ansätze sind die Verwendung von Compstatin (C3-bindendes Peptid), das die Aktivierung von C3 hemmt (182), und von C1-Inhibitor, der aktiviertes C1r und C1s und damit den klassischen Komplementweg blockiert (54, 212).

### **1.6.3. Entfernung xenoreaktiver Antikörper**

Da xenoreaktive Antikörper die Hauptursache der HAR darstellen, werden diese in vielen Studien bereits vor der Transplantation entfernt, um eine Schädigung des Xenotransplantates zu vermeiden. Zunächst wurden xenoreaktive Antikörper entweder mittels Plasmapherese (Plasmaaustausch) oder durch Organperfusion eliminiert. Bei der Plasmapherese wird das Plasma des Empfängers größtenteils entfernt und durch kolloidosmotische Lösungen und aufbereitete Plasmaprodukte ersetzt. Alexandre et al. (2) konnten damit die Überlebenszeit von Schweinenieren bei immunsupprimierten Pavianen auf bis zu 23 Tage verlängern. Da jedoch bei der Plasmapherese sämtliche Plasmaproteine, auch die Gerinnungsfaktoren, entfernt werden, kann es zu schweren Blutungen kommen. Ersatzprodukte für Gerinnungsfaktoren bergen die Gefahr von darin enthaltenen xenoreaktiven Antikörpern und allergischen Reaktionen.

Die Organperfusion ist eine selektivere, aber aufwendige Methode. Die Entfernung von xenoreaktiven Antikörpern wird durch die Zirkulation von Empfängerblut oder -plasma durch ein zuvor explantiertes Organ des Spenders wie z.B. Niere, Milz, Lunge oder Leber erreicht. Das Organ wird an einen extrakorporalen Kreislauf des Empfängers angeschlossen und für 30-60 Min. laufend mit dessen Blut perfundiert. Xenoreaktive Antikörper binden dabei an die Epitope des fremden Organs. Dadurch konnte im experimentellen Modell eine HAR verhindert werden und mit IS überlebten Schweineorgane bis zu 8 Tage (39, 73, 178). Mit zusätzlichen Maßnahmen wie Bestrahlung und xenogener Knochenmarktransplantation oder Hemmung des Komplementsystems arbeiteten die Transplantate maximal 15 Tage (111, 178, 179). Jugendliche Paviane mit orthotop transplantierten Schweineherzen überlebten nach einer Organperfusion und totaler Lymphbestrahlung bis zu 19 Tage (220). Doch auch die Organperfusion hat Nebenwirkungen. Da im perfundierten Organ eine Abstoßungsreaktion

abläuft, werden im Empfängerblut die Gerinnungs- und die Komplementkaskade aktiviert. Es kommt zu Blutdruckabfall und einem Verbrauch von Thrombozyten. Die Durchführung ist zudem aufwendig und setzt eine sterile Handhabung sowie evtl. die Bereitstellung eines zweiten, größeren Spendertieres voraus, um ein zur Perfusion geeignetes Organ zur Verfügung zu haben.

Mit beiden Methoden konnten xenoreaktive Antikörper vollständig oder fast gänzlich entfernt werden. Jedoch wurde nach Plasmaaustausch ein wesentlich schnellerer Wiederanstieg beobachtet als nach Organperfusion (73).

Eine interessante Alternative zu Organperfusion und Plasmaaustausch ist die Immunadsorption (IA). Es wird das gesamte Immunglobulin entfernt und damit alle vorhandenen Typen xenoreaktiver, auch nicht  $\alpha$ Gal-spezifischer, Antikörper. Wie bei der Organperfusion wird das Empfängerblut in einem extrakorporalen Kreislauf behandelt, aber das Plasma wird hier durch eine Kartusche, die antikörperadsorbierende Substanzen enthält, geleitet. Es kommt nicht wie bei der Plasmapherese zum Verlust von Plasmaproteinen und Gerinnungsfaktoren und die IA ist wesentlich unkomplizierter durchzuführen als die Organperfusion (120).

Shapiro et al. (193) verwendeten in einem Schwein-zu-Hund-Nierentransplantationsmodell eine Staphylokokken-Protein A-Säule, die das gesamte IgG, vor allem die Subklassen 1, 2, und 4, adsorbiert. Die Zeit bis zum Einsetzen einer hyperakuten Abstoßungsreaktion konnte mit Protein-A-Adsorption verlängert werden, es zeigte sich jedoch in der Behandlungsgruppe eine signifikant höhere Morbidität und Mortalität.

Eine effektive Technologie zur Elimination von Immunglobulinen aller Subklassen ist die Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption. Es wird ein hoher Anteil des gesamten IgG, IgM und IgA entfernt (etwa 80-90 %) sowie Komplementfaktoren und zirkulierende Immunkomplexe. In Kombination mit immunsuppressiver Therapie führten Leventhal et al. (120) vor und nach der Transplantation von Schweinenieren wiederholte Behandlungen mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption durch. Eine HAR wurde verhindert und die Transplantate funktionierten 11 und 13 Tage lang. Heterotop transplantierte hDAF- und hCD59-transgene Schweineherzen überlebten bei Pavianen mit 2-3 Adsorptionsbehandlungen pro Woche bis zu 29 Tage und unterlagen in 5 von 6 Fällen nicht einer AVR, während Herzen ohne IA innerhalb von 5 Tagen versagten (124).

Es wurden schließlich spezielle Adsorptionssäulen zur selektiven Adsorption von  $\alpha$ 1-3Gal-Antikörpern entwickelt. Damit wurde bei immunsupprimierten Pavianen eine Überlebenszeit von heterotop transplantierten Schweineherzen von bis zu 5 Tagen erreicht (37). Nach  $\alpha$ Gal-

Antikörperadsorption oder Organperfusion überlebten Schweinenieren, die zusammen mit dem Knochenmark des Spenders transplantiert wurden, bei Cynomolgusaffen bis zu 15 Tage lang (178). Xu et al. (221) erreichten bei mit  $\alpha$ Gal-Adsorption und Organperfusion behandelten Cynomolgusaffen eine Überlebenszeit von Schweinenieren von 2-12 Tagen. Kozlowski et al. (111) berichteten von heterotop transplantierten Herzen und Nieren, die nach  $\alpha$ Gal-Adsorption oder Organperfusion und der Transplantation von Schweineknochenmark bei Pavianen 8 und 15 Tage bzw. 3-14 Tage arbeiteten. hDAF- und CD59-transgene Schweineherzen funktionierten mit  $\alpha$ Gal-Antikörperadsorption unter IS 9 bis 39 Tage lang (123). Kroshus et al. (113) zeigten, dass bei immunsupprimierten Pavianen nach selektiver Entfernung der natürlichen Antikörper durch Affinitätschromatographie ein orthotop transplantiertes Schweineherz 30 Stunden arbeitete und die Überlebenszeiten orthotoper CD59-transgener Herzen bis zu 10 Tage betragen.

Autor, Jahr (Ref.)	Spenderorgan	Empfänger [n]	IA	IS	Sonst. Therapie	Transplantatüberleben
Cooper/Lexer, 1987/1988 (39, 122)	Herz (heterotop)	Pavian [4]	/	/	/	4 min - 8 h
		Pavian [5]	/	CS, CyA	/	15 min - 5 d
		Pavian [7]	OP	/	/	6 h - 5 d
		Pavian [4]	OP	CS, CyA	/	8 h - 4 d
Alexandre, 1989 (2)	Niere	Pavian [5]	PP	AZT, CS, CyA	ATG	1-23 d
Fischel, 1992 (73)	Herz (heterotop)	Rhesus [1]	/	/	/	2 h
		Rhesus [3]	PP	/	/	< 12 h
		Rhesus [3]	OP	/	/	< 3,3 d
		Rhesus [1]	OP	AZT, CS, CyA	ALG	< 5 d
		Rhesus [1]	PP + OP	AZT, CS, CyA	ALG	8 d
Roslin, 1992 (176)	Herz (heterotop)	Pavian [1]	OP	CS, CyA	/	1 d
		Pavian [3]	OP	CS, CyA	TLI	6, 8, 15 d
Leventhal, 1994 (121)	Herz (heterotop)	Pavian [2]	PP	DSG	/	37, 52 h
		Pavian [2]	PP	CyA, DSG	ALG, CVF	8; 17,5 d
Fukushima, 1994 (75)	Herz (orthotop)	Pavian [4]	$\pm$ OP	CyA, DSG	FUT-175	$\emptyset$ 9,8 h
		Pavian [8]	OP $\pm$ PP	CyA, DSG	FUT-175	$\emptyset$ 6,3 d; < 16 d
Sablinski, 1995 (179)	Niere	Cynomolgus [2]	$\pm$ OP	/	/	0 d, 5 d
		Cynomolgus [6]	OP	$\pm$ IgM-AK	ATG, KMTx, TI, WBI	1-9 d
		Cynomolgus [8]	OP	CyA, IgM-AK	ATG, KMTx, TI, WBI	0-13 d
Leventhal, 1995 (120)	Niere	Pavian [2]	Ig-Therasorb <sup>®</sup>	CyP, DSG	ALG	11, 13 d
Cooper, 1996 (37)	Herz (heterotop)	Pavian [2]	$\alpha$ Gal-IA	CS, CyA, CyP	/	10 min, 5 d
Sablinski, 1997 (178)	Niere	Cynomolgus [3]	OP/ $\alpha$ Gal-IA	CS, CyA, DSG	/	7-8 d
		Cynomolgus [8]	OP/ $\alpha$ Gal-IA	CS, CyA, DSG	$\pm$ ATG, KMTx, $\pm$ TI, WBI	2-15 d
Matsumiya, 1997 (131)	Herz (orthotop)	Pavian [8]	OP	FK506, MTX/ CyA, DSG	FUT -175 $\pm$ ATG	4-14 d
Kroshus, 1997 (113)	Herz (orthotop, hCD59-transgen)	Pavian [4]	nAK-Adsorption	CS, CyA, MTX	/	$\leq$ 10 d
	Herz (orthotop / heterotop)	Pavian [2]	nAK-Adsorption	CS, CyA, MTX	/	30 h, 5 d

./..

Xu, 1998 (220)	Herz (orthotop)	Pavian [3]	OP	CyA, MTX	TLI	< 19 d
Xu, 1998 (221)	Niere	Cynomolgus [6] Cynomolgus [4]	OP $\alpha$ Gal-IA	/ /	/ /	4-12 d 2-10 d
Lin, 1998 (124)	Herz (heterotop, hDAF-, hCD59- transgen)	Pavian [6]	Ig- Therasorb <sup>®</sup>	CS, CyA, CyP	/	1-29 d
		Pavian [5]	/	CS, CyA, CyP	/	1-5 d
Kozlowski, 1999 (111)	Niere	Pavian [5]	OP/ $\alpha$ Gal-IA	CyA, DSG, $\pm$ MMF	ATG, KMTx, TI, WBI	3-14 d
	Herz (heterotop)	Pavian [2]	OP/ $\alpha$ Gal-IA	CyA, DSG, $\pm$ MMF	ATG, KMTx, TI, WBI	8, 15 d
Lin, 2000 (123)	Herz (heterotop, hDAF-, hCD59- transgen)	Pavian [4]	$\alpha$ Gal-IA	CS, CyA, CyP	/	9-39 d
		Pavian [5]	/	CS, CyA, CyP	/	4 h- 10 d

Tab. 1.2.: Xenotransplantationen von Schweineorganen bei Primaten nach der Depletion xenoreaktiver Antikörper des Empfängers.  $\emptyset$  = Durchschnittliche Überlebenszeit;  $\alpha$ Gal-IA = Adsorption von  $\alpha$ 1-3Gal-Antikörpern; ALG = Antilymphozytenglobulin; ATG = Antithymozytenglobulin; AZT = Azathioprin; CS = Corticosteroide; CVF = cobra venom factor; CyA = Cyclosporin A; CyP = Cyclophosphamid; DSG = 15-Deoxyspergualin; FK506 = Tacrolimus; IgM-AK = monoklonaler Antikörper gegen humanes IgM; Ig-Therasorb<sup>®</sup> = Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunsorption; KMTx = xenogene Knochenmarktransplantation; MMF = Mycophenolat Mofetil; MTX = Methotrexat; nAK = natürliche Antikörper; OP = Organperfusion; PP = Plasmapherese; TI = Thymusbestrahlung; TLI = Totale Lymphbestrahlung; WBI = Ganzkörperbestrahlung.

Als Alternative zur Entfernung xenoreaktiver Antikörper mittels Adsorption in einem extrakorporalen Kreislauf besteht die Möglichkeit, durch die intravenöse Applikation von spezifischen Antigenen die vorhandenen Antikörper im Blutkreislauf zu binden und damit zu neutralisieren. Erstmals wurde die Methode von Cooper et al. (40, 41) erfolgreich im AB0-inkompatiblen Allotransplantationsmodell angewendet.

Ye et al. (222, 223) testeten verschiedene Oligosaccharide zur Adsorption von  $\alpha$ Gal-Antikörpern. Hohe Dosen von Melibiose und Arabinogalactan reduzierten die Zytotoxizität von Pavianserum und verhinderten nach der Transplantation eines Schweineherzens eine HAR für 12 Stunden. Der Pavian starb jedoch an den toxischen Effekten der Kohlenhydratinfusion. Kontinuierliche Infusionen von  $\alpha$ Gal-Trisaccharid oder -Penta-saccharid verhinderten eine HAR heterotop transplantiertter Schweineherzen für 4-5 Stunden (197). Sobald die Infusionen gestoppt wurden, kam es jedoch zu einer Verschlechterung der Herzfunktion und zur Abstoßung. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Infusion von  $\alpha$ Gal-Disaccharid und -Trisaccharid erreicht (175). Durch die Gefahr toxischer Wirkungen und den nur kurzzeitigen Effekt ist die Anwendbarkeit dieser Methode beschränkt.

#### 1.6.4. Modifikation des Spenders

Die HAR diskordanter Xenotransplantate geht mit einer massiven Komplementaktivierung einher. Da die Regulierung der Komplementkaskade durch speziesspezifische Proteine erfolgt, können die Komplementregulatoren auf den Endothelzellen von Schweineorganen nach einer Transplantation in Primaten oder Menschen das Komplementsystem des Empfängers nicht effektiv hemmen (88). Es wurden deshalb Schweine gezüchtet, die humane Komplementregulationsproteine wie DAF (CD55), CD59 oder MCP (*membrane cofactor protein*, CD46) exprimieren.

Die Generierung hDAF-transgener Schweine ist von White et al. beschrieben worden (50, 217). Die Verwendung von hDAF-exprimierenden Schweineorganen durch diese Arbeitsgruppe resultierte in einem Überleben heterotoper Herztransplantate bei immunsupprimierten Pavianen von 10 bis 99 Tagen und damit in der längsten bisher beschriebenen Überlebenszeit diskordanter Xenotransplantate. Die mediane Überlebenszeit betrug 26 Tage (16). In weiteren Studien überlebten heterotope hDAF-transgene Transplantate bei Cynomolgusaffen mit IS bis zu 62 Tage (189). Bei immunsupprimierten Pavianen konnte durch orthotop transplantierte hDAF-Herzen für bis zu 9 Tage eine adäquate Kreislauffunktion aufrechterhalten werden (188, 189, 216). Bei dem gleichen Modell wurde von einer anderen Gruppe mit 39 Tagen die längste bisher bekannte Überlebenszeit eines orthotop transplantierten Herzens bei diskordanten XT erreicht (213). HDAF-transgene Schweinenieren, in Cynomolgusaffen transplantiert, arbeiteten bis zu 78 Tage (49, 227). Eine HAR wurde bei hDAF-transgenen XT vermieden, jedoch unterlag ein Teil der Transplantate einer antikörpervermittelten AVR.

Heterotop transplantierte Schweineherzen, die hDAF und hCD59 gleichzeitig exprimierten, arbeiteten bei immunsupprimierten Pavianen mehr als 5 Tage (30, 133, 134). In Kombination mit Immunadsorption wurden Überlebenszeiten von bis zu 29 Tagen erreicht (123, 124) sowie bei orthotop transplantierten Herzen von bis zu 10 Tagen (113).

MCP-transgene Herzen überlebten nach heterotoper Transplantation bei Pavianen bis zu 23 Tage und unterlagen dann einer AVR (1, 62). Eine Überlebenszeit von bis zu 24 Stunden wurde für transgene Schweinelungen berichtet (53, 145, 224).



Autor, Jahr (Ref.)	Spenderorgan	Transgene/s CRP	Empfänger [n]	IS	Sonst. Therapie	Transplantat-überleben [n]
McCurry, 1995 (133, 134)	Herz (heterotop)	hDAF, hCD59	Pavian [3]	AZT, CyA, CyP	OP	4, 11, 30 h
Kroshus, 1997 (113)	Herz (orthotop)	hCD59	Pavian [4]	CS, CyA, MTX	nAK-Adsorption	≤ 10 d
	Herz (orthotop / heterotop)	/	Pavian [2]	CS, CyA, MTX	nAK-Adsorption	30 h, 5 d
Lin, 1998 (124)	Herz (heterotop)	hDAF, hCD59	Pavian [6]	CS, CyA, CyP	Ig-Therasorb®	1-29 d
Schmoeckel, 1998 (188, 189, 216)	Herz (orthotop)	hDAF	Pavian [10]	CS, CyA, CyP	/	6 h – 9 d
Zaidi, 1998 (227)	Niere	hDAF	Cynomolgus [6]	CS, CyA, CyP	/	Ø 30 (6-35) d
		/	Cynomolgus [6]	CS, CyA, CyP	/	Ø 6,5 (0-30) d
Chen, 1999 (30)	Herz (heterotop)	hDAF, hCD59	Pavian [4]	CS, CyA, MMF	/	3,5 - 5,4 d
		/	Pavian [4]	CS, CyA, MMF	/	20-80 min
		hDAF, hCD59	Pavian [5]	CS, CyA, CyP	/	1-5 d
Bhatti, 1999 (16)	Herz (heterotop)	hDAF	Pavian [9]	CS, CyA, CyP, MMF	/	10-99 d
		/	Pavian [5]	CS, CyA, CyP, MMF	/	0-10 d
Schmoeckel, 1999 (189)	Herz (heterotop)	hDAF	Cynomolgus [8]	/	/	Ø 5,1 (4-5,3) d
		hDAF	Cynomolgus [10]	CS, CyA, CyP	/	Ø 40 (bis 62) d
Lin, 2000 (123)	Herz (heterotop)	hDAF, hCD59	Pavian [4]	CS, CyA, CyP	αGal-IA	9-39 d
		hDAF, hCD59	Pavian [5]	CS, CyA, CyP	/	4 h- 10 d
Cozzi, 2000 (49)	Niere	hDAF	Cynomolgus [9]	CS, CyA, CyP	/	5-78 d
		/	Cynomolgus [5]	CS, CyA, CyP	/	0 d [4] 30 d [1]
Vial, 2000 (213)	Herz (orthotop)	hDAF	Pavian [1]	CS, CyA, CyP, MMF	/	39 d
Diamond, 2001 (62)	Herz (heterotop)	hMCP	Pavian [3]	CS, CyA, CyP	/	3, 12, 23 d

Tab. 1.3.: Xenotransplantationen bei Primaten unter Verwendung von transgenen Schweineorganen. CRP = Komplementregulationsprotein; hCD59 = human CD59; hDAF = human decay accelerating factor; hMCP = human membrane cofactor protein; weitere Abkürzungen s. Tab. 1.2.

Neben einer transgenen Komplementhemmung gibt es auch Ansätze, die antigenen Strukturen oder andere an der Abstoßung beteiligte Faktoren beim Spender durch genetische Manipulation auszuschalten. Bei Mäusen und Schweinen konnte die αGal-Expression durch Überexprimierung von humaner α-1,2-Fucosyltransferase (H-Transferase) unterdrückt werden (33, 149). Alleine oder in Kombination mit transgener CD59-Expression erwiesen sich Endothelzellen dieser Schweine *in vitro* als resistenter gegen humane Serumzytotoxizität (44, 45). Die Transplantation von Schweinenieren, die gleichzeitig für H-Transferase, hDAF und

hCD59 transgen waren, in Paviane führte nicht zu einer HAR, die Tiere entwickelten jedoch eine Koagulopathie. Die Expression von H-Transferase war nur schwach und resultierte nicht in einer Reduktion von  $\alpha$ Gal-Antikörpern beim Empfänger (40).

Zunächst gelang es bei Mäusen, das  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase-Gen ganz auszuschalten (196, 205).  $\alpha$ Gal-*knock out*-Mäuse sind gesund und fortpflanzungsfähig, sie exprimieren jedoch auf ihren Endothelzellen andere Epitope, gegen die xenoreaktive Antikörper gerichtet sind (36). Lebensfähige Schweine, bei denen das  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase-Gen gänzlich ausgeschaltet ist, konnten bisher nicht generiert werden, dagegen aber Schweine, bei denen ein Allel des Gens inaktiv ist (170, 194). Die Züchtung von Schweinefibroblasten, bei denen beide Allele ausgeschaltet sind, gelang *in vitro*, diese exprimierten allerdings immer noch geringe Mengen des Epitops (194).

Die Generierung von MHC-transgenen Schweinen mit dem Ziel, eine Toleranz humaner Immunzellen gegenüber Schweinezellen zu erzeugen, ist ebenfalls gelungen (118).

Um die Thromboseentwicklung bei der AVR im Spenderorgan zu verringern, verwendeten Meyer et al. (135) Nieren von Schweinen mit homozygotem von-Willebrand-Syndrom. Den Schweinen fehlte der von-Willebrand-Faktor, der auf aktivierten Endothelzellen zu finden ist und Plättchen an das Endothel bindet, fast vollständig. Nach vorheriger Behandlung der Empfänger (Paviane) mit Organperfusion konnte jedoch keine signifikant verlängerte Transplantatüberlebenszeit in Vergleich zu Wildtyp-Nieren festgestellt werden.

Es gibt auch Ansätze, die Endothelzellaktivierung Typ II, die bei der AVR auftritt, mittels einer Hemmung von NF- $\kappa$ B zu regulieren. NF- $\kappa$ B fördert die Transkription und Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und anderen Faktoren, die bei der Endothelzellaktivierung involviert sind. NF- $\kappa$ B ist im Zytoplasma an I- $\kappa$ B gebunden und wird freigesetzt, sobald die Endothelzelle über Interleukin-1 aktiviert wird. Durch Überexpression von I- $\kappa$ B wird die Aktivität von NF- $\kappa$ B gehemmt. Die Induktion von I- $\kappa$ B ist der Wirkungsmechanismus von Glucocorticoiden, sie kann aber auch lokal durch Insertion eines transgenen I- $\kappa$ B-Konstruktes in Verbindung mit einem gewebespezifischen Promoter erreicht werden (6). An Kleintiermodellen wurden bereits Versuche unternommen, durch genetische Manipulation den NF- $\kappa$ B-Pfad zu hemmen (202), bei Schweinen liegen jedoch noch keine Ergebnisse vor.

Die Beeinflussung der  $\alpha$ Gal-Expression des Spenderorgans unmittelbar vor der Transplantation ist ein weiterer Ansatz zur Spendermodifikation. Nach einer vierstündigen Ischämiezeit des Spenderherzens wurden positive Resultate im *ex vivo*-Modell erreicht, vermutlich weil es durch die Ischämie zu einer teilweisen Ablösung der xenoreaktiven

Epitope kam (20). Die enzymatische Entfernung von  $\alpha$ Gal-Epitopen vor der Transplantation zeigte kurzzeitige Erfolge. Die Epitope wurden jedoch bereits nach einem Tag wieder nachgebildet (126).

	<b>Präformierte xenoreaktive Antikörper</b>	<b>Komplement-system</b>	<b>Neubildung xenoreaktiver Antikörper</b>	<b>Zelluläre Immunantwort</b>
<b>HAR</b>	Antikörper-Entfernung (PP, OP, IA)	Komplement-Hemmung		
<b>AVR</b>			AK-Entfernung Immunsuppression Toleranzinduktion	Immunsuppression Toleranzinduktion
<b>Zelluläre Abstoßung</b>				Immunsuppression Toleranzinduktion ?
<b><u>Modifikation des Spenders:</u></b>		Transgene Komplement-regulations-faktoren		
	Genetische Manipulation der Antigenexpression			
	Genetische Manipulation der Endothelzellaktivierung / Gerinnungshemmung			

Abb. 1.6.: Therapeutische Ansätze zur Vermeidung der diskordanten Xenotransplantatabstoßung. AK = Antikörper; IA = Immunadsorption; PP = Plasmapherese; OP = Organperfusion.

## **2. Ziele der vorliegenden Untersuchung**

Der zunehmenden Verknappung von Spenderorganen begegnete man bereits mit verschiedenen Ansätzen experimenteller Xenotransplantationsforschung. Mittlerweile ist es möglich, im Schwein-Primat-Modell ein Überleben der Transplantate über mehrere Wochen zu erreichen. Trotz der erzielten Fortschritte ist die Xenotransplantation jedoch noch sehr weit entfernt von einer mit der Allotransplantation vergleichbaren Einführung in der Klinik.

Deshalb müssen weiterhin Strategien zur dauerhaften Prävention der diskordanten Xenotransplantatabstoßung erarbeitet werden und Therapieformen zur Verfügung stehen, die in hohem Maße Erfolg versprechend sind. Daneben stellt sich aber auch die Frage, welche der experimentellen therapeutischen Ansätze bei einer zukünftigen klinischen Anwendung für den Patienten zumutbar und ohne gravierende Nebenwirkungen wären.

An der Herzchirurgischen Klinik der Universität München wurde deshalb ein Primatenmodell zur heterotopen und orthotopen, d.h. lebenserhaltenden, Transplantation von Schweineherzen erarbeitet, um Strategien zur Vermeidung und Therapie der Xenotransplantatabstoßung zu evaluieren. Insbesondere die Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption sollte in Kombination mit Immunsuppression sowie erstmals mit hDAF-transgenen Schweineherzen als Möglichkeit zur Therapie der hyperakuten und akut vaskulären Xenotransplantatabstoßung untersucht werden, da sie bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen bereits regelmäßig und mit geringen Nebenwirkungen eingesetzt wird sowie hocheffektiv die für die Xenotransplantatabstoßung relevanten Antikörper eliminiert.

Wir führten zunächst zeitlich begrenzte Vorstudien mit Immunadsorptionsbehandlungen bei Cynomolgusaffen, Rhesusaffen und Pavianen durch, die orthotop und heterotop mit Landrasseschweineherzen transplantiert wurden, um die Technik und Effizienz der Immunadsorption im Modell einer hyperakuten Abstoßung zu untersuchen sowie die Durchführbarkeit einer Behandlung von kleinen Primaten für eine eventuelle spätere Anwendung bei Kleinkindern.

Die darauf folgenden Langzeitstudien wurden als Überlebensmodelle konzipiert, in denen eine möglichst lange Überlebenszeit des Transplantats bei humanen Bedingungen für das Tier erreicht werden sollte. Orthotop und heterotop transplantierte, immunsupprimierte Tiere wurden mit Immunadsorption behandelt. Teilweise wurden hDAF-transgene Schweineherzen verwendet. Durch die Langzeitbeobachtung sollten die Auswirkungen von Immunadsorption und hDAF-transgenen Schweineherzen auf die Entwicklung einer hyperakuten und akut vaskulären Abstoßung untersucht werden.

### **3. Methoden**

#### **3.1. Genehmigung**

Anträge zur Durchführung der Versuchsvorhaben wurden der Regierung von Oberbayern vorgelegt und genehmigt, sowohl für Vorstudien zur Technik der Immunadsorption bei heterotoper und orthotoper xenogener Herztransplantation mit Landrasseschweineherzen bei Cynomolgusaffen, Rhesusaffen und Pavianen, als auch für Langzeitversuche zur orthotopen und heterotopen Xenotransplantation bei Pavianen mit perioperativer Immunadsorption und Landrasse- bzw. hDAF-transgenen Schweineherzen. Die entsprechenden Tierversuchsantragsnummern lauten: 211-2521.3-37/97 (Vorstudien mit Cynomolgusaffen), 211-2531.3-3/98 (Vorstudien mit Pavianen) und 211-2531-17/98 (Langzeitstudien).

#### **3.2. Tiere**

Cynomolgus- und Rhesusaffen (*Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*) wurden uns vom GSF-Forschungszentrum Neuherberg zur Verfügung gestellt. Die Paviane (*Papio anubis*, Alter etwa 4-6 Jahre) waren Resttiere einer stabilen Herde und wurden von der Fa. Werner Bode erworben. Nach einer gründlichen Untersuchung auf humanpathogene Erreger wurden sie an das Institut für Chirurgische Forschung geliefert. Die Landrasseschweine stammten aus einer landwirtschaftlichen Zucht des Lehr- und Versuchsgutes der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim. Bei den hDAF-transgenen Schweinen handelte es sich um speziell für Xenotransplantationen gezüchtete Tiere (Fa. Imutran, Projekt-Licence Nr. PPL 80/00735). Sie wurden 2-3 Tage vor der Operation an das Institut geliefert, wo sie unter S1-Sicherheitsbedingungen entsprechend den Voraussetzungen der Gentechnik-Sicherheitsverordnung vom 20.06.1990 untergebracht waren.

Für die Xenotransplantationen von Cynomolgus- und Rhesusaffen wurden bei heterotopen Transplantationen (hXHTx) einige Tage alte Ferkel mit einem Gewicht zwischen 2,2 und 4,2 kg verwendet und bei orthotopen Transplantationen (oXHTx) Ferkel mit einem Gewicht zwischen 3,5 und 4,5 kg.

Bei Pavianen verwendeten wir für die hXHTx Schweine mit einem Gewicht zwischen 3,6 und 9,2 kg und für die oXHTx Schweine mit 12,5 bis 16 kg.

<b>Landrasseschweine:</b>	Lehr- und Versuchsgut der Ludwig-Maximilians-Universität, Oberschleißheim
<b>hDAF-transgene Schweine:</b>	Firma Imutran/Novartis AG, Cambridge, UK
<b>Cynomolgus- und Rhesusaffen:</b>	GSF- Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg bei München
<b>Paviane:</b>	Firma Werner Bode, Bentheim

Tab. 3.1.: Bezugsquellen der Tiere.

Die Vorstudien (Kurzzeitversuche) wurden unter Verwendung von Landrasseschweineherzen durchgeführt.

Wir führten bei zwei Cynomolgusaffen (4,3 und 6,4 kg) oXHTx nach Immunadsorption (IA) sowie bei einem Cynomolgus- und zwei Rhesusaffen (4,5 bis 10,5 kg) hXHTx nach IA durch. Zum Vergleich wurden vier hXHTx mit Cynomolgusaffen (2,6 bis 4,3 kg) ohne IA vorgenommen. Zwei dieser Versuche konnten jedoch aus technischen Gründen nicht zu Ende geführt werden (technische Probleme, massive intraoperative Blutungen). Sie konnten deshalb nicht ausgewertet werden und werden in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

Außerdem transplantierten wir im Rahmen der Vorstudien drei Paviane (17 bis 25,8 kg) orthotop nach IA und einen Pavian (16,9 kg) orthotop ohne IA.

Nach erfolgreicher Transplantation und einer Beobachtungszeit von maximal 24 Stunden in Narkose wurden diese Versuche terminiert.

	<b>hXHTx</b>	<b>oXHTx</b>	<b>hXHTx</b>	<b>oXHTx</b>
<b>Cynomolgus-/Rhesusaffen (n)</b>	1	2	4*	
<b>Paviane (n)</b>		3		1
	<b>Mit IA</b>		<b>Ohne IA</b>	

Tab. 3.2.: Übersicht über die Vorstudien. \*) 2 dieser Versuche (hXHTx ohne IA) wurden wegen technischen Versagens aus der Auswertung ausgeschlossen.

Für die Langzeitversuche verwendeten wir ausschließlich Paviane. 9 Tiere (10,5 bis 25,1 kg) wurden heterotop transplantiert und 8 davon mit IA behandelt. 4 der Tiere erhielten hDAF-transgene Schweineherzen. Ein Pavian, mit einem Landrasseschweineherz transplantiert, erhielt keine Behandlung mit IA und diente somit als Kontrolle.

Weitere 4 Paviane (19 bis 20,5 kg) transplantierten wir orthotop mit Landrasseschweineherzen und IA.

Die Endpunkte der Versuche stellten hier eine manifeste, irreversible Abstoßung des Transplantats (Abstoßungskriterien: s. Abschnitt 3.8.) oder ein unzumutbares Leiden des Empfängertieres dar. Nach Versuchsende wurden die Tiere eingeschläfert.

	<b>hXHTx</b>	<b>oXHTx</b>	<b>hXHTx</b>
<b>Landrasseschweineherzen (n)</b>	4	4	1
<b>hDAF-transgene Herzen (n)</b>	4		
	<b>Mit IA</b>		<b>Ohne IA</b>

Tab. 3.3.: Übersicht über die Langzeitstudien mit Pavianen.

### 3.3. Spenderoperation

Nach Prämedikation mit Ketamin (Ketanest<sup>®</sup>, Parke-Davis, Berlin; 20 mg/kg) und Azaperon (Stresnil<sup>®</sup>, Janssen-Cilag, Neuss; 4-8 mg/kg) intramuskulär wurden die Schweine tracheotomiert und an die maschinelle Beatmung angeschlossen (Beatmung mit einem 1:1-Gemisch von N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> und 1-2 % Isoflurane, Isoflurane-Lilly<sup>®</sup>, Lilly, Bad Homburg). Anschließend wurden 0,6 bis 1 mg Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>, Roche, Grenzach) und 0,1 bis 0,2 mg Pancuroniumbromid (Pancuronium<sup>®</sup>, Astra Zeneca, Plankstadt) pro kg Körpergewicht über einen großlumigen Venenkatheter verabreicht sowie insgesamt bis zu 0,01 mg Fentanyl/kg (Fentanyl Janssen<sup>®</sup>, Janssen-Cilag, Neuss).

Nach medianer Sternotomie, longitudinaler Eröffnung des Perikards und Präparation der großen Gefäße wurde das Schwein mit 400 I.E. Heparin/kg (Heparin-Natrium Braun, B. Braun, Melsungen) vollständig heparinisiert und eine Kardioplegiekanüle in die Aortenwurzel gelegt. Nach Abklemmen der Aorta ascendens wurde 4 °C kalte Kardioplegie-Lösung (Celsior<sup>®</sup>) in die Aortenwurzel infundiert und zugleich extern mit 4 °C kalter Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, B. Braun, Melsungen) gekühlt, bis die Herzaktion sistierte. Gleichzeitig wurden die Venae cavae superior und inferior abgeklemmt, die V. cava inferior durchtrennt und das linke Herzohr eröffnet, um das Herz von Druck zu entlasten.

Sollte das Herz heterotop (abdominell) transplantiert werden, folgte die Entnahme als Herz-Lungen-Block mit anschließender Ligatur der Lungengefäße und der oberen und unteren Hohlvene sowie die Schaffung eines künstlichen Vorhofseptumdefektes.

Für eine orthotope Transplantation wurde das Herz entweder einzeln oder bei kleinen Spendertieren als Herz-Lungen-Block explantiert. Die V. cava superior wurde übernäht und der rechte Vorhof von der V. cava inferior ausgehend eröffnet. Die linke Vorhofwand wurde im Bereich zwischen den Lungenvenen exzidiert, um eine passende Vorhofgröße zu schaffen.

Das explantierte Herz wurde bis zur Implantation bei 4 °C in Eiswasser gelagert.

### **3.4. Empfängeroperation**

Die Affen wurden mit Xylazin (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen; 2-4 mg/kg) und Ketamin (20 mg/kg) i.m. prämediziert. Zur Narkoseeinleitung erhielten sie Fentanyl (0,02 mg/kg), Midazolam (0,33 mg/kg) und Pancuronium (0,1 mg/kg) über einen periphervenösen Zugang. Danach erfolgte die Anlage eines Blasenkatheters und die endotracheale Intubation mit anschließender maschineller Beatmung. Die Narkose wurde mit einem N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>-Gemisch von 2:1 und 0,2-0,8 % Isoflurane sowie Bolusgaben von 0,01 bis 0,02 mg Fentanyl/kg aufrechterhalten.

Ein arterieller Zugang wurde zur invasiven Blutdruckmessung in die A. femoralis und ein großlumiger Zentralvenenkatheter in die V. femoralis eingelegt. Es wurde kontinuierlich ein EKG abgeleitet. Blutdruck, Puls, Blutgaswerte, Hämoglobin- und Elektrolytkonzentrationen wurden in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

Bei der hXHTx erfolgte eine mediane Laparotomie und anschließend die Präparation der Aorta und der V. cava inferior distal der Nierengefäße. Nach partiellem Ausklemmen und Längsinzision wurde die V. cava inferior End-zu-Seit mit dem Truncus pulmonalis des Spenderherzens anastomosiert. Anschließend wurde die Aorta abdominalis ausgeklemmt, längsinzidiert und mit der Spenderaorta verbunden. Zuletzt wurde eine Anastomose zwischen dem rechten Herzohr und der rechten V. iliaca communis angelegt, um den rechten Ventrikel zu entlasten. Vor dem Öffnen der Klemmen wurde 1 mg/kg Methylprednisolon (Urbason<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn, Peapack, NJ, USA) intravenös verabreicht.

Die orthotope Implantation des Spenderherzens erfolgte nach der Technik von Lower und Shumway, die auch bei der allogenen Herztransplantation des Menschen angewendet wird. Nach medianer Sternotomie und Eröffnung des Perikards erhielten die Empfänger 400 I.E. Heparin/kg. Anschließend wurde die Aorta kanüliert und über den rechten Vorhof zwei getrennte Kanülen in die V. cava superior und inferior eingelegt. Nach Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine explantierte man an totalen Bypass (d.h. nach dem Anschlingen und der Okklusion beider Hohlvenen und dem Abklemmen der Aorta) das Herz des Empfängers durch Abtrennen der Vorhöfe nahe der Klappenebene und Durchtrennen von Aorta und A. pulmonalis. Zunächst wurde der linke Vorhof des Spenderherzens eingenäht. Es folgte der rechte Vorhof, dann die End-zu-End-Anastomosierung des Truncus pulmonalis und die der Spender- und Empfängeraorta. 30 Min. vor Beginn der Reperfusion des Spenderherzens wurde Methylprednisolon (1 mg/kg) i.v. verabreicht.



Nach dem Wiederherstellen des partiellen Bypass (Wiedereröffnung von Hohlvenen und Aorta) und einer Reperfusionzeit von 60 bis 120 Min. wurde die extrakorporale Zirkulation beendet.

### 3.5. Perioperative Immunadsorption

#### 3.5.1. Prinzip der Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen

Bei der antikörperbasierten Immunadsorption mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen (Baxter Therasorb Medizinische Systeme GmbH, Unterschleißheim) werden als Ligand Immunglobuline eingesetzt, die gegen die  $\kappa$ - und  $\lambda$ - Leichtketten sowie gegen die schweren Ketten humaner Immunglobuline gerichtet sind. Diese werden aus dem Serum sensibilisierter Schafe gewonnen und anschließend mit ihrem F<sub>c</sub>-Teil durch die Zyanbromid-Methode irreversibel an die kugelförmige Trägersubstanz Sepharose CL-4b gebunden. Durch ihre immunologische Spezifität für die F<sub>c</sub>- und F<sub>ab</sub>- Teile humaner Immunglobuline können alle IgG-Klassen sowie IgA und IgM eliminiert werden, aber auch Immunglobulinfragmente und zirkulierende Immunkomplexe. Dieser Antikörper-Sepharose-Komplex befindet sich als Suspension in einem sterilen Glasgehäuse, durch welches das Plasma nach der Separation von den Blutzellen geleitet wird.

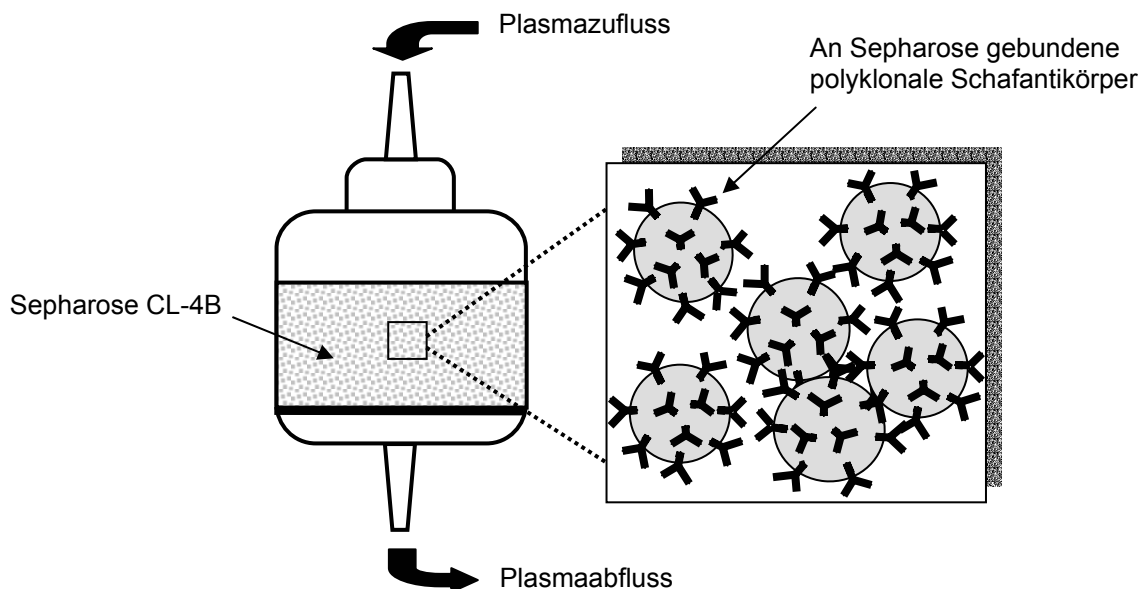


Abb. 3.1.: Schematische Darstellung einer Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säule.

### **3.5.2. Technische Durchführung der Immunadsorption**

Zur Immunadsorption wurden zwei Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen parallel verwendet. Sie wurden uns von der Firma Baxter Therasorb in gebrauchtem Zustand zur Verfügung gestellt. Die Säulen können 40-100 mal wieder verwendet werden und wurden zwischen den Behandlungen unter regelmäßiger Sterilkontrolle bei 2-8°C im Kühlschrank gelagert. Vor der Benutzung wurden die Säulen mit 2000 ml 0,9-%iger NaCl-Lösung (Baxter Therasorb Medizinische Systeme GmbH, Unterschleißheim) gespült.

Wir verwendeten eine automatische Adsorptions-Desorptions-Einheit (ADA) der Firma Medicap, Ulrichstein, mit zwei vorgeschalteten Pumpeinheiten BM11 und EP12 (Firma Dialysetechnik, Ettlingen). Nach dem Einspannen in die Maschinen wurden der zuführende und der rückführende Blutschlauch der BM11 und das Schlauchsystem von EP12 und ADA mit 0,9-%iger NaCl-Lösung unter Zusatz von 5000 I.E. Heparin (Heparin-Natrium Braun, B. Braun, Melsungen) gefüllt (alle Schlauchsysteme von der Fa. Baxter Therasorb Medizinische Systeme GmbH, Unterschleißheim).

Das venöse heparinisierte Blut wurde zunächst über das zuführende Schlauchsystem der BM11 geleitet. Mit einem Plasmafilter (Hemaplex 0,2 m<sup>2</sup>, Dideco SpA., Mirandola, Italien) wurde das Plasma von den Blutzellen getrennt und über die Plasmapumpe EP12 an die Adsorptionseinheit (ADA) weitergeleitet. Über einen Drucksensor wurden die Rollerpumpe und damit der Blutfluss und der Druck im Schlauchsystem automatisch geregelt. Alternativ konnte die Regelung der Rollerpumpen auch manuell durchgeführt werden.

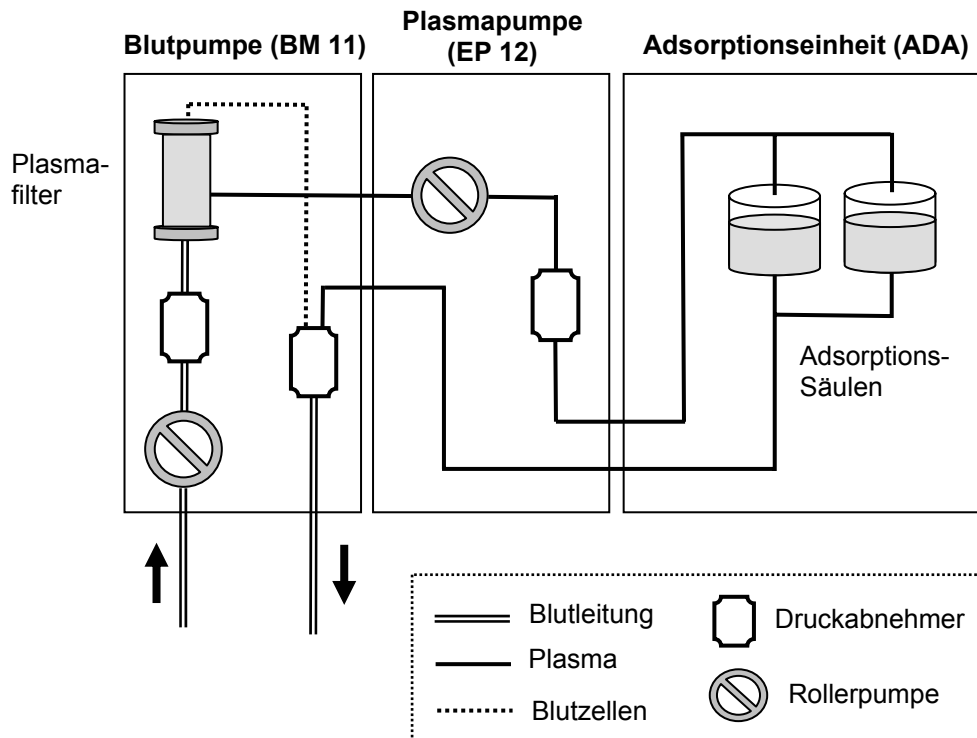


Abb. 3.2.: Flussschema BM 11 und EP 12.

Sobald die Primärsysteme mit genügend Blut bzw. Plasma gefüllt waren, wurde die ADA-Einheit an das System angeschlossen. Die erste Säule wurde bei einer Plasmaflussrate von 20 ml/min mit etwa 300 ml Plasma beladen. War diese Säule gefüllt (= 1. Zyklus), wurde das Plasma auf die zweite Säule umgeleitet, während die erste Säule regeneriert wurde. Nach dem vollständigen Beladen der zweiten Säule (= 2. Zyklus) wurde diese wiederum regeneriert. Jede Säule wurde nach der Regeneration sofort wieder verwendet, so dass während einer Behandlung beliebig viele Adsorptionszyklen durchgeführt werden konnten. Beladung und Regeneration wurden von der ADA-Einheit nach Voreinstellung automatisch durchgeführt.

Um eine Säule zu regenerieren, wurde diese zunächst mit 0,9-%iger NaCl-Lösung gespült, um sie von Restplasma zu reinigen. Danach wurden mit 1000 ml 0,2-molarer Glycin-HCl-Pufferlösung die adsorbierten Immunglobuline von ihrem Liganden abgelöst und zur Neutralisierung des sauren pH-Wertes mit 1000 ml PBS-Pufferlösung (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4) nachgespült. Um den PBS-Puffer zu entfernen, wurden nochmals 1000 ml NaCl-Lösung durch die Säule geleitet. (Alle Lösungen von der Fa. Baxter Therasorb Medizinische Systeme GmbH, Unterschleißheim). Anschließend erfolgte eine pH-Kontrolle.

Das gereinigte Plasma wurde nach der Adsorptionsbehandlung über ein 37°C warmes Wasserbad an die BM11 zurückgeführt und zusammen mit den Blutzellen über einen zweiten venösen Zugang laufend reinfundiert.

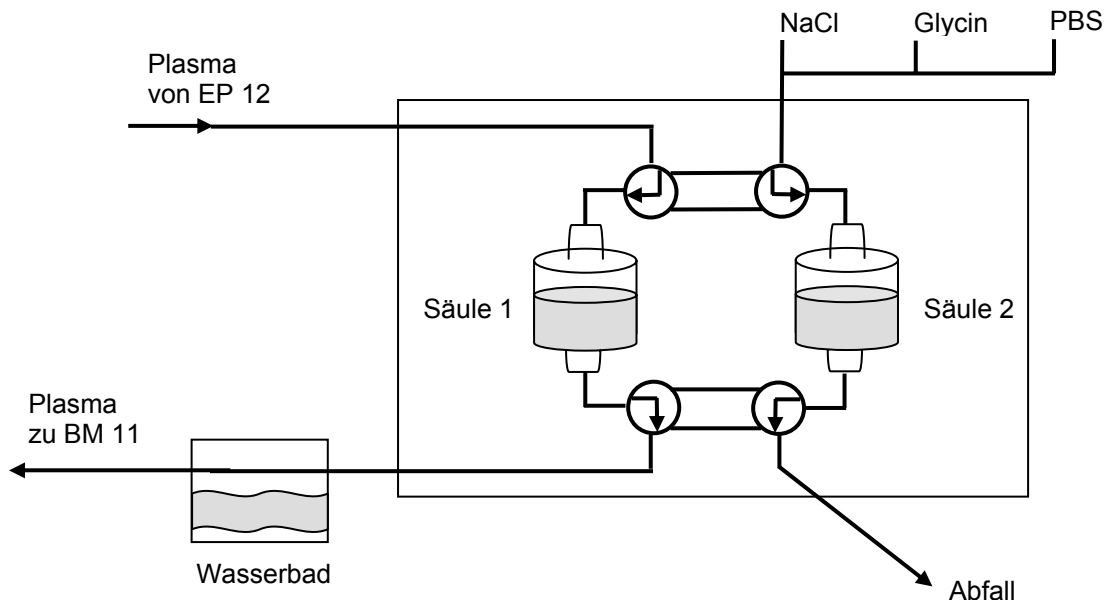


Abb. 3.3.: Flussschema ADA. Im Beispiel wird Säule 1 mit Plasma beladen, während Säule 2 regeneriert wird. Soll die erste Säule regeneriert werden, wird der Plasmafluss automatisch auf Säule 2 umgeleitet und der Spülfluss auf Säule 1.

Nach Beendigung der Behandlung wurde das noch in den Schläuchen von BM11 und EP12 enthaltene Plasma den Primaten reinfundiert. Die Säulen wurden zur Konservierung mit PBS-Azid-Lösung (0,01 % Natrium-Azid, Baxter Therasorb Medizinische Systeme GmbH, Unterschleißheim) gefüllt und im Kühlschrank gelagert.

### 3.5.3. Immunadsorptionsbehandlung der Empfänger

In den Vorstudien wurde die IA bei den oXHTx (2 Cynomolgusaffen und 3 Paviane) während des kardiopulmonalen Bypasses durchgeführt. Das zu behandelnde Blut wurde dabei aus dem Reservoir der Herz-Lungen-Maschine entnommen.

Bei hXHTx (1 Cynomolgus- und 2 Rhesusaffen) führten wir die IA nach Einleitung der Narkose und vor dem Hautschnitt durch. Das Blut wurde dabei aus dem proximalen Schenkel eines zweilumigen zentralvenösen Katheters (ZVK, 6-7 F, Baxter Corp., Deerfield, IL, USA) in der V. femoralis entnommen. Da für diese kleinen Affen (4,3 bis 10,5 kg) die extrakorporale Zirkulation einen erheblichen Volumenverlust bedeutet (bis zu 300 ml je Säule

und 250 ml zur Schlauchfüllung), wurde das Schlauchsystem hier zunächst mit 5-%igem Humanalbumin (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) gefüllt, das nach Starten der Pumpen dem Affen über den rückführenden Schlauch des Systems infundiert wurde. Zusätzlich wurden spezielle Kinderschlauchsets verwendet. Damit konnte das Schlauchvolumen auf 150 ml reduziert werden.

Soweit an der Herz-Lungen-Maschine nicht schon eine Antikoagulation bestand, erhielt jedes Tier vor Beginn der Behandlung 500 I.E. Heparin (Heparin-Natrium Braun, B. Braun, Melsungen) pro kg Körpergewicht i.v. Es wurden bei Cynomolgus- und Rhesusaffen je zwei Adsorptionszyklen durchgeführt (d.h. jede der zwei Säulen wurde einmal mit 300 ml Plasma beladen), und bei Pavianen 4 Zyklen.

Bei den langzeitüberlebenden Tieren führten wir sowohl bei hXHTx als auch bei oXHTx die Immunadsorptionsbehandlung vor dem Hautschnitt durch, da hier eine wesentlich höhere Zahl von Zyklen geplant war. Diese konnten aus zeitlichen Gründen nicht an der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt werden und dieses Verfahren hatte sich auch als praktikabler erwiesen. Die Blutentnahme und -rückgabe erfolgte über einen 7 F-ZVK, bei großen Affen auch über einen zweilumigen 10 F-Shaldon-Katheter (Gambro AB, Stockholm, Schweden).

Aufgrund der gewonnenen Erfahrungswerte aus den Vorstudien bestimmten wir vor der IA den Anti-Pig-Antikörpertiter (zur Bestimmung s. Kapitel 3.7.2.2.) und legten die Anzahl der Adsorptionszyklen ausgehend von der Höhe des Ausgangstiters fest. Nach der Behandlung sollte ein Zielwert von  $< 1:64$  erreicht sein.

Die Paviane wurden vor der Behandlung ebenfalls mit 500 I.E. Heparin/kg antikoaguliert. Bei der längeren Behandlungsdauer (bis zu 4 Stunden) wurden nach Kontrolle der Gerinnungszeit (ACT) bei Bedarf 100 I.E./kg nachgegeben. Das Priming des Systems erfolgte ebenfalls mit 5-%igem Humanalbumin.

Bei einem Pavian (#13, hXHTx mit Landrasseschweineherz) wurde am 11. postoperativen Tag eine zweite Immunapheresebehandlung durchgeführt.

Die Behandlungen erfolgten unter engmaschiger Überwachung des Blutdrucks. Hypotone Phasen wurden durch Volumensubstitution (Elektrolytlösungen und 5-%iges Humanalbumin) und durch die Gabe von Noradrenalin (Arterenol<sup>®</sup>, Hoechst Marion Roussel, Frankfurt/Main) ausgeglichen. Nach dem Ende der IA wurde Furosemid (Furosemid-Ratiopharm<sup>®</sup>, Ratiopharm, Ulm) gegeben. Die Antikoagulation wurde nach der IA bzw. nach dem kardiopulmonalen Bypass mit Protamin (Protamin-HCl Roche<sup>®</sup>, Roche, Grenzach; 1 ml pro 1000 I.E. Heparin) antagonisiert.

### 3.6. Postoperatives Management und Immunsuppression

Nach dem Ziehen aller Zugänge und Drainagen wurden die Affen sofort extubiert und in einen mit Wärmelampen und Sauerstoff ausgestatteten Käfig gebracht. In den ersten 24 Stunden nach der Operation wurden die Tiere mit EKG-Kontrolle überwacht.

Die Affen wurden zweimal täglich in Kurznarkose (Xylazin und Ketamin i.m.) zur Beurteilung des Allgemeinzustandes und auf Infektions- und Abstoßungszeichen hin untersucht. Es erfolgte die Ableitung eines EKGs und eine Ultraschalluntersuchung des transplantierten Herzens. Sie erhielten morgens und abends ein Antibiotikum, ein Analgetikum, Antiemetikum und eine Ulcusprophylaxe sowie beginnend mit dem Tag vor der Operation immunsuppressive Therapie. Die orale Medikation wurde per Magensonde und die parenteralen Medikamente wurden über einen periphervenösen Zugang verabreicht.

Die Immunsuppression wurde nach folgendem Schema gegeben:

#### Einen Tag vor der Operation (abends):

- Cyclophosphamid i.v. 40 mg/kg
- Mycophenolat Mofetil p.o. 70 mg/kg

#### Operationstag:

Morgens:

- Cyclophosphamid i.v. 20 mg/kg
- Mycophenolat Mofetil p.o. 70 mg/kg

30 Min. vor Reperfusion des Herzens:

- Methylprednisolon i.v. 1 mg/kg

Unmittelbar nach der Operation:

- Cyclosporin A i.m. 25 mg/kg

Abends:

- Mycophenolat Mofetil p.o. 70 mg/kg

#### Erster postoperativer Tag (morgens und abends):

- Cyclosporin A 2x tgl. p.o. 100 mg/kg
- Methylprednisolon 1x tgl. morgens p.o. 1 mg/kg
- Mycophenolat Mofetil 2x tgl. p.o. 70 mg/kg

### Zweiter postoperativer Tag und folgende Tage (morgens und abends):

- Cyclophosphamid i.v. 2x tgl. bis zu 20 mg/kg nach Leukozytenzahl (Zielwert: 1-3 G/l)
- Cyclosporin A 2x tgl p.o. nach Blutspiegel (Zielwert: 1500 ng/ml)
- Methylprednisolon 1x tgl. morgens p.o., bis 1 mg/kg, ausschleichende Dosierung
- Mycophenolat Mofetil 2x tgl. p.o. nach Blutspiegel (Zielwert: 3-6 µg/ml)

Beim Auftreten von Nebenwirkungen (Thrombozytopenie, Anämie, Diarrhoe, Ikterus, Kreatininanstieg) wurde die Dosis reduziert oder das Medikament passager pausiert.

Generikum	Handelsname	Hersteller
<b>Cyclophosphamid</b>	Endoxan injection®	Asta Medica, Frankfurt/Main
<b>Cyclosporin A</b>	<b>i.m.</b> Sandimmun Ciclosporin®	Sandoz Pharmaceutical, Basel, Schweiz
	<b>p.o.</b> Sandimmun Neoral®	Sandoz Pharmaceutical, Basel, Schweiz
<b>Methylprednisolon</b>	Urbason®	Pharmacia & Upjohn, Peapack, NJ, USA
<b>Mycophenolat Mofetil</b>	CellCept®	Roche Products, Basel, Schweiz

Tab. 3.4.: Handelsnamen und Hersteller der verwendeten Immunsuppressiva.

## 3.7. Parameter

### 3.7.1. Messprotokoll

Während der Immunadsorptionsbehandlungen wurden folgende Daten festgehalten:

Nach jedem Zyklus wurden die Flussraten und Schlauchdrücke von BM11, EP12 und ADA-System laut Anzeige im Display sowie die Zyklusdauer notiert. Die Gerinnungszeit (ACT) wurde nach Heparin-gabe und kurz vor der Behandlung, jeweils stündlich während der Behandlung und am Ende der Behandlung gemessen.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden Blutproben entnommen zur Bestimmung folgender Parameter: Anti-Pig-Antikörpertiter, IgG-, IgM-, IgA-, C3- und C4-Spiegel, Kreatinkinase-MB-Masse, Hämatokrit, Thrombozytenzahl und Leukozytenzahl.

Die Werte wurden vor und nach IA bestimmt. Zusätzlich wurde während der IA nach jeweils zwei Zyklen der Anti-Pig-Antikörpertiter als Effizienzkontrolle abgenommen. Bei Versuchen ohne IA wurde stattdessen ein einzelner präoperativer Wert der o.g. Parameter bestimmt.

Darüber hinaus wurden die Parameter bei den Vorstudien (Cynomolgus- und Rhesusaffen) 10 Min., 60 Min. und 120 Min. nach der Implantation des Spenderherzens und unmittelbar *post mortem* bestimmt. Bei den Vorstudien mit Pavianen und bei den Langzeitüberlebensstudien

erfolgte die Messung 30 Min., 90 Min., 180 Min. und 12 Stunden nach Reperfusionbeginn des Herzens bzw. vor Extubation oder *post mortem*.

Ab dem 1. postoperativen Tag wurden die Werte einmal täglich morgens bestimmt. Bei starker Anämie oder Thrombozytopenie wurden die Blutentnahmen für ein oder zwei Tage ausgesetzt.

Die Blutentnahmen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, mit handelsüblichen Entnahmesystemen (Sarstedt, Nümbrecht) oder Einmalspritzen (B. Braun, Melsungen).

### **3.7.2. Messmethoden**

#### **3.7.2.1. Immunglobuline und Komplementfaktoren**

Die Immunglobulin-Subklassen IgG, IgM und IgA sowie die Komplementfaktoren C3 und C4 wurden aus dem Serum mit dem Hitachi 737 Clinical Chemistry Analyser bestimmt (Immunologische Trübungstests).

Die Messung erfolgte turbidimetrisch, d.h. es wurde die Trübungszunahme  $\Delta E$  der Probe nach Bildung eines Immunkomplexes C aus dem gesuchten Substrat unbekannter Konzentration und einem Antikörper mit bekannter Konzentration gemessen. Aus den photometrischen Absorptionswerten  $E_1$  und  $E_2$  bei einer bestimmten Lichtwellenlänge vor und nach Zugabe des Antikörpers wurde  $\Delta E$  errechnet.

Es wurde gegen den Reagenzienleerwert (RLW) gemessen, also gegen  $E_1$  und  $E_2$  des nur mit NaCl-Lösung gefüllten Probengefäßes.

$$\Delta E = (E_{2 \text{ Probe}} - E_{1 \text{ Probe}}) - (E_{2 \text{ RLW}} - E_{1 \text{ RLW}})$$

Da  $\Delta E$  sich proportional zur Konzentration des Immunkomplexes [C] verhält, lässt sich anhand der Messergebnisse von Standardproben (Kalibratoren) eine Kurve erstellen, die [C] in Abhängigkeit zur Substratkonzentration wiedergibt (90). Durch logit/log-Transformation erhält man eine Gerade, aus der man die Substratkonzentrationen ablesen kann (192).



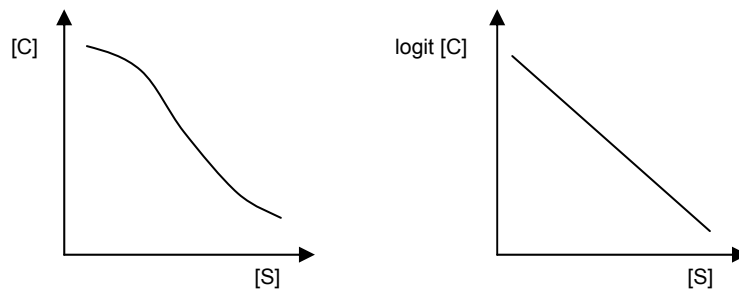


Abb. 3.4.: Heidelberg-Kendall-Kurve. Sie zeigt die Abhängigkeit der Konzentration des Endproduktes [C] von der Substratkonzentration [S] (links). Rechts die Kurve nach logit/log-Transformation. Dabei gilt:  $\text{logit } [C] = \ln [C] / 1 - [C]$ .

Die Tests wurden bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C durchgeführt. Zu 9-12 µl Serum (abhängig von der zu bestimmenden Substanz) wurden 750 µl 4,5-%iges Polyethylenglycol in Pufferlösung (Reagens 1 von Turbitex<sup>®</sup>, Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels) zur Reaktionsbeschleunigung zugefügt. Die Probe wurde 5 Min. lang bei 37 °C inkubiert und anschließend E<sub>1</sub> gemessen. Nach Zugabe von 150–300 µl Anti-Human-Antikörper gegen IgG, IgM, IgA, C3 oder C4 vom Kaninchen (Reagens 2, Turbitex<sup>®</sup>, Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels) und weiteren 5 Min. erfolgte die Messung von E<sub>2</sub>.

Die Extinktionsmessungen wurden absorptionsphotometrisch bei 340 nm Wellenlänge durchgeführt bzw. bei 600 nm für die IgA-Bestimmung (Einheit: g/l).

Die Durchführung der Messungen erfolgte am Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Universität München.

### 3.7.2.2. Anti-Pig-Antikörpertiter

Das Prinzip beruht auf der Agglutination von Schweineerythrozyten durch Antikörper im Serum des Empfängers. Dabei wird der Verdünnungsgrad des Serums bestimmt, bei dem gerade noch eine Agglutination der Erythrozyten feststellbar ist.

3 ml Vollblut des Empfängers wurden mit einer Serum-Monovette abgenommen und zunächst 8 Min. bei 2500 U/min zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde anschließend in ein Probenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert und komplementinaktiviert, d.h. 30 Min. bei 56°C inkubiert. Danach wurde eine geometrische Verdünnungsreihe des Serums hergestellt. Dazu wurden in elf weitere Probenröhrchen jeweils 100 µl PBS-Pufferlösung (Apotheke Klinikum Großhadern, München) vorgelegt. In das erste Röhrchen wurden 100 µl des Serums pipettiert, mit der PBS-Lösung vermischt, 100 µl davon wieder entnommen und in das zweite Röhrchen gegeben. Aus diesem wurden nach dem Mischen wiederum 100 µl in das dritte

Röhrchen gefüllt usw. Hierdurch ergab sich eine Verdünnungsreihe von 1:2, 1:4, 1:8, usw., bis 1:2048. Ein zwölftes Röhrchen wurde lediglich mit 200 µl PBS-Lösung gefüllt und diente als Kontrolle.

Zur Herstellung einer Schweineerythrozytensuspension wurden einem Spenderschwein 10 ml heparinisiertes Vollblut entnommen und 5 Min. bei 2500 U/min zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde verworfen und die Erythrozyten dreimal mit PBS-Lösung gewaschen. 150 µl der Erythrozyten wurden anschließend mit 50 ml PBS verdünnt. In jedes Röhrchen der Verdünnungsreihe des Empfängerserums wurden 100 µl Schweineerythrozytensuspension gegeben, mit dem Serum vermischt und anschließend 90 Min. bei 37 °C und 30 Min. bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Erythrozyten vorsichtig aufgeschüttelt und ein Teil der Lösung auf einem Objektträger verteilt. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Agglutination der Erythrozyten beurteilt. Die größte Verdünnung, bei der sich noch Aggregate bildeten, wurde als Anti-Pig-Antikörpertiter angegeben. Der Test wurde im Institut für Chirurgische Forschung der Universität München speziell für Xenotransplantationen entwickelt.

### **3.7.2.3. Blutbild**

Die hämatologischen Bestimmungen wurden aus EDTA-Vollblut mit einem Bayer Technikon H1E Hämatologie Analyser (Bayer Diagnostics, Fernwald) durchgeführt.

Der Hämatokrit wurde berechnet aus Erythrozytenzahl / mittleres Erythrozytenvolumen (MCV, *Mean cellular volume*) und in Prozent des Blutvolumens angegeben.

Die Thrombozytenzahl wurde durch elektrische Widerstandsmessung bestimmt (Einheit: G/l.).

Zur Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte nach Lyse der Erythrozyten die Fixation und Anfärbung der weißen Blutkörperchen, die mittels Streulichtmessung und Absorptionsmessung ausgezählt wurden (Einheit: G/l.).

Die hämatologischen Bestimmungen wurden am Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Universität München, durchgeführt.

### **3.7.2.4. Kreatinkinase-MB Masse**

Als Parameter für die Myokardschädigung wurde die Konzentration der Kreatinkinase-MB (CK-MB) Masse untersucht. Dieser Test erfasst nicht die Aktivität, sondern die Konzentration des Enzyms. Dadurch steigt die diagnostische Sensitivität und Spezifität (129). Die CK-MB

Masse wurde aus dem Serum mit einem Roche Cobas Zentrifugenanalyser mit passendem BCL-Kit durch einen Elektrochemilumineszenz-Test bestimmt (Einheit: ng/ml).

Die Durchführung der Messungen erfolgte am Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Universität München.

### **3.7.2.5. Gerinnungszeit**

Die Gerinnungszeit (*activated clotting time*, ACT) wurde als Kontrolle der Antikoagulation mit Heparin mit einem Hemochron Blood Coagulation Timer (Int. Technidyne Corp., Metuchen, NJ, USA) bestimmt. 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 Heparingabe sollte die Gerinnungszeit > 480 sec. betragen.

## **3.8. Histologie und Abstoßungskriterien**

Nach Versuchsende wurden aus dem linken und rechten Ventrikel und aus den Vorhöfen des Transplantates mehrere Proben entnommen und schockgefroren. Die Gewebeproben wurden mit einem Mikrotom in 4-6 Mikrometer dicke Schichten geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden mit Mayers Hämalaun und Eosin gefärbt (HE-Färbung).

Die histologischen Schnitte wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker, Pathologisches Institut der Universität München, ausgewertet.

Immunhistochemische Untersuchungen wurden ebenfalls durchgeführt, diese werden in der Arbeit von cand. med. C. Wimmer behandelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die histologischen Befunde als aussagekräftigeres Abstoßungskriterium herangezogen.

Eine manifeste Abstoßung wurde mit Hilfe der folgenden Kriterien definiert:

- (1). Indirekt sichtbarer Funktionsverlust des Transplantats (Herzinsuffizienzzeichen des Empfängers bei oXHTx, EKG-Abnormitäten, echokardiographisch eingeschränkte oder aufgehobene Motilität, verringerte Ejektions- und Verkürzungsfraktion).
- (2). Makroskopisch sichtbare dunkle Verfärbung, Thrombosierung, Hypo- oder Amotilität und Verhärtung des Transplantats (noch während der Operation *in situ* sichtbar oder Autopsiebefund *post mortem*).
- (3). Histologisch gesicherte HAR oder AVR.

(4). Als zusätzliches Kriterium für eine AVR ein Anstieg der Kreatinkinase-MB Masse, außer in den ersten 24 Stunden nach der Transplantation.

### **3.9. Statistische Methoden**

Die erhobenen Messparameter wurden mittels deskriptiver statistischer Verfahren untersucht und als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Der SEM-Wert wurde an Stelle der Standardabweichung benutzt, da es sich um kleine Fallzahlen mit großen Abweichungen vom Mittelwert handelte.

Zur Signifikanzanalyse wurden aufgrund der geringen Fallzahlen verteilungsfreie Verfahren verwendet. Um Messparameter gleicher Gruppen zu zwei verschiedenen Messzeitpunkten (verbundene Stichproben) auf Unterschiede hin zu analysieren, wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen angewendet. Der Test ist nicht geeignet für Fallzahlen  $n < 5$ .

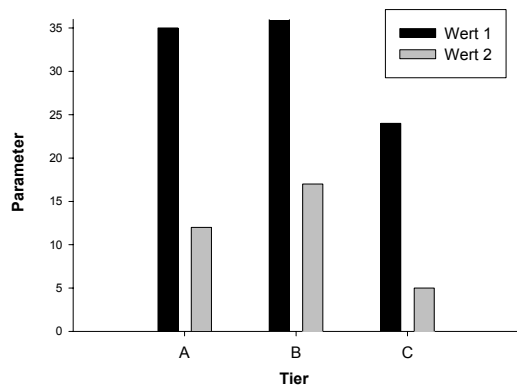
Zum Vergleich von Werten verschiedener Gruppen zum gleichen Zeitpunkt (unverbundene Stichproben) wurde der nicht parametrische U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon gewählt. Der Test kann nicht angewendet werden für Fallzahlen  $m, n < 3$  oder  $m < 5$  und  $n < 2$ .

Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

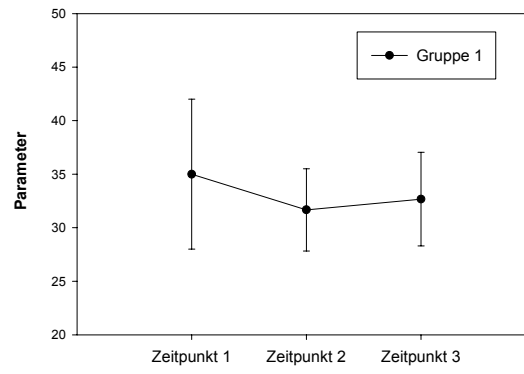
Die statistischen Methoden sind bei Sachs zusammengefasst (181).

Die Daten wurden graphisch als Säulendiagramme der Wertepaare oder bei mehr als zwei Messzeitpunkten als Kurven dargestellt. Wurden Mittelwerte dargestellt, so wurden diese mit dem SEM-Wert als senkrechtem Balken oberhalb und unterhalb des Wertes wiedergegeben (s. Abb. 3.5.).

Zur Datenauswertung wurde das Softwarepaket SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) verwendet.



Säulendiagramm



Kurvendiagramm

Abb. 3.5.: Verwendete graphische Darstellungen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Effizienz und Auswirkungen der Immunadsorptionsbehandlungen**

#### **4.1.1. Durchführung der präoperativen Immunadsorptionsbehandlung**

Bei den Behandlungen wurde der Plasmafluss auf die ADA-Einheit konstant bei Flussraten um 20 (15-25) ml/min gehalten. Die Blutflussrate von BM11 betrug durchschnittlich 70 (50-90) ml/min und die Plasmaflussrate von EP12 22 (20-24) ml/min. Bei Druckänderungen wurde der Durchfluss dementsprechend reguliert.

Der Schlauchdruck wurde am arteriellen (zuführenden) und am venösen (wegführenden) Schenkel der BM11 gemessen. Der arterielle Druck betrug zumeist 10-20 mmHg. Gelegentlich gab es Druckspitzen von bis zu 70 mmHg, die aber durch Reduktion der Flussrate ausgeglichen wurden. Der venöse Druck betrug zwischen -20 und 80 mmHg, bedingt durch die verschiedene Größe und Durchlässigkeit der venösen Zugänge und die Flussgeschwindigkeit.

Technische Schwierigkeiten traten in einem Fall auf, als der Plasmafilter wegen unzureichender Antikoagulation verstopfte und exzessiv hohe arterielle Drücke erzeugte. Das Problem wurde durch Heparin-gabe und Austausch des Filters während der Behandlung behoben. Nach langem Gebrauch sank die Adsorptionsrate eines Säulenpaares, d.h. es konnte zwischen den Zyklen keine ausreichende Antikörperreduktion mehr festgestellt werden, so dass dieses gegen ein neues Paar ausgetauscht wurde. Weiterhin traten hohe Schlauchdrücke und Druckschwankungen insbesondere bei der Behandlung kleiner Affen auf, die keinen großlumigen Zugang hatten. In diesen Fällen wurde die Steuerung der Roller-pumpen manuell durchgeführt und die Plasmaflussrate gesenkt, was die Einstellung stabiler Druckverhältnisse ermöglichte. Es konnten alle Behandlungen erfolgreich durchgeführt werden. Keine Behandlung musste abgebrochen werden.

Die Behandlung mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption wurde mit systemischer Antikoagulation lediglich mit Heparin durchgeführt, da die Verwendung von Natriumcitrat eine Hypokalzämie verursacht, die eine Abstoßung triggern kann. Die Gabe von 400-500 I.E. Heparin pro kg Körpergewicht war dabei für 2 Stunden Behandlungsdauer optimal.

<b>Tier</b>	<b>Gewicht (kg)</b>	<b>Heparin (I.E.)</b>	<b>ACT (sec)</b>
<b>Cynomolgus 1</b>	4,3	2.500	600
<b>Cynomolgus 3</b>	4,5	2.500	900
<b>Rhesus 1</b>	5,7	2.500	350
<b>Cynomolgus 2</b>	6,4	4.000	600
<b>Rhesus 2</b>	10,5	3.000	400
<b>Pavian 18</b>	14,5	11.000	465
<b>Pavian 19</b>	14,8	13.000	999
<b>Pavian 1</b>	17,0	10.000	400
<b>Pavian 21</b>	20,0	8.000	370
<b>Pavian 14</b>	25,1	10.000	999

*Tab. 4.1.: Dosierung der Antikoagulation mit Heparin zu Beginn der Behandlung und ACT (activated clotting time) nach Heparinegabe.*

Pro Zyklus wurden bei einer Zyklusdauer von etwa 15 Min. durchschnittlich 300 (250-350) ml Plasma behandelt. Teilweise ergaben sich längere Behandlungszeiten wegen Unterbrechungen oder technischer Probleme. Die längste Behandlung dauerte 4 Stunden 38 Min. bei 14 Zyklen. Cynomolgus- und Rhesusaffen (Cynomolgus 1, 2 und 3, Rhesus 1 und 2; 4,3 bis 10,5 kg) wurden mit 2 Zyklen IA behandelt. Die 3 Vorstudien mit Pavianen (Pavian 1, 2 und 4; 17 bis 25,8 kg) wurden mit jeweils 4 Zyklen IA durchgeführt. Bei den Langzeitstudien (12 Paviane, # 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19 und 21; mit 10,5 bis 25,1 kg) wurde die Zahl der Immunadsorptionszyklen an die Höhe des Anti-Pig-Antikörpertiters zu Beginn der Behandlung angepasst. Um den kritischen Wert von 1:64, der in den Vorstudien als Grenze zur Vermeidung einer HAR ermittelt worden war, zu unterschreiten, wurden in den Langzeitstudien in der Regel 3-4 Plasmavolumina der Affen behandelt. Es wurden durchschnittlich 9,7 (4 bis 14) Behandlungszyklen durchgeführt.

Tier	Zyklenzahl	Gewicht (kg)	Gesamtplasma des Affen (ml)	Behandelte Plasmavolumina des Affen
<b>Cynomolgus 1</b>	2	4,3	190	3,2
<b>Cynomolgus 2</b>	2	6,4	290	2,1
<b>Cynomolgus 3</b>	2	4,5	200	3,0
<b>Rhesus 1</b>	2	5,7	260	2,3
<b>Rhesus 2</b>	2	10,5	470	1,3
<b>Pavian 1</b>	4	17,0	590	2,0
<b>Pavian 2</b>	4	25,8	1160	1,0
<b>Pavian 4</b>	4	18,1	820	1,5
<b>Pavian 3</b>	4	20	900	1,3
<b>Pavian 5</b>	4	10,5	470	2,6
<b>Pavian 8</b>	4	18,5	830	1,5
<b>Pavian 19</b>	6	14,8	670	3,0
<b>Pavian 9</b>	10	20	900	3,3
<b>Pavian 18</b>	10	14,5	650	4,6
<b>Pavian 21</b>	10	20	900	3,3
<b>Pavian 13</b>	12	20,1	910	4,0
<b>Pavian 10</b>	14	19	860	4,9
<b>Pavian 11</b>	14	20,5	920	4,6
<b>Pavian 12</b>	14	20,4	920	4,6
<b>Pavian 14</b>	14	25,1	1130	3,7

Tab. 4.2.: Übersicht über die Immunadsorptionsbehandlungen. Das Gesamtplasma der Affen wurde anhand ihres Körpergewichts errechnet (40-50 ml Plasma pro kg Körpergewicht). Das behandelte Volumen (hier nicht angegeben) errechnet sich aus dem durchschnittlichen Volumen eines Zyklus (300 ml) x Zyklenzahl. Behandeltes Volumen / Gesamtplasma des Affen ergibt die Anzahl der behandelten Plasmavolumina des Affen.

#### 4.1.2. Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem

Der systolische Blutdruck der Paviane schwankte während der Immunadsorptionsbehandlung zwischen 100 und 120 mmHg (80-160 mmHg). Einige Tiere zeigten zu Beginn der Behandlung einen leichten Blutdruckabfall sowie einen Anstieg der Pulsfrequenz auf Werte zwischen 100 und 150/min. Ein Pavian entwickelte gegen Ende der Behandlung ventrikuläre Extrasystolen. Ein Teil der Tiere zeigte auch nach dem Beenden der IA eine hypotone Phase.



Blutdruckabfälle wurden zunächst durch Volumensubstitution ausgeglichen. Dabei erhielten die Paviane zusätzlich zum Priming-Volumen der ADA-Einheit (250 ml) im Verlauf der Behandlung zwischen 150 und 1400 ml Vollelektrolytlösung und/oder 5-%iges bzw. 20-%iges Humanalbumin. Ein Teil der Tiere benötigte während der Behandlung Katecholamine (Noradrenalin). Die Noradrenalingaben konnten aber nach Ende der Behandlung reduziert oder ganz ausgesetzt werden.

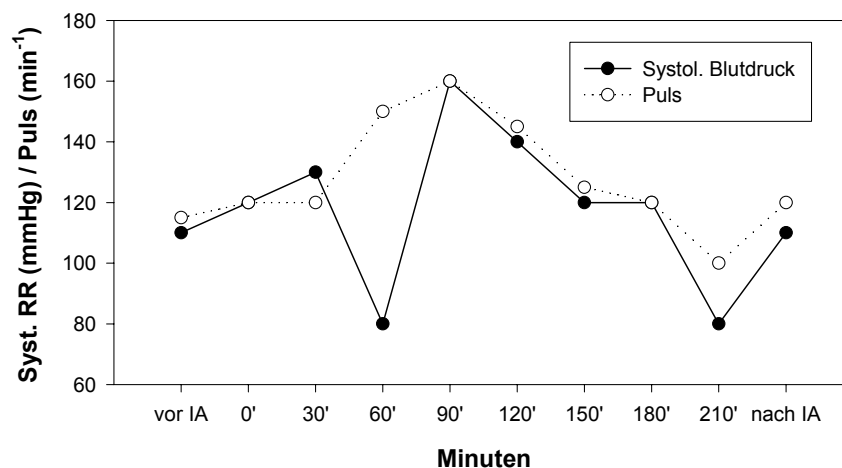


Abb. 4.1.: Puls und Blutdruck während einer präoperativen Immunadsorptionsbehandlung (Pavian 12). Das Tier benötigte während der Behandlung keine Katecholamine.

Die Durchführung der IA war bei den kleinen Affen mit mehr Problemen behaftet, da es durch den großen Anteil an Blutvolumen, der durch den extrakorporalen Kreislauf entzogen wurde, zu einer starken Hämodilution und zu Hypotonien kam. Durch die Substitution mit Humanalbumin und die Gabe von Noradrenalin konnten jedoch stabile Kreislaufverhältnisse aufrechterhalten werden. Es zeigten sich mehr hypotone Phasen als bei den größeren Pavianen mit minimalen systolischen Blutdruckwerten von 50 mmHg. Die IA wurde aber auch von den kleinen Affen gut toleriert. Die Noradrenalinindosis konnte nach der Behandlung in allen Fällen stark reduziert oder ausgesetzt werden.

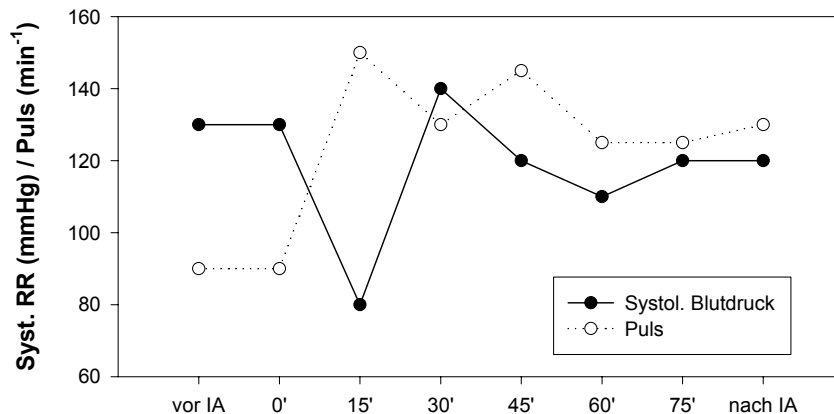


Abb. 4.2.: Puls und Blutdruck während einer Immunadsorptionsbehandlung bei einem kleinen Affen (Rhesus 1; 5,7 kg). Wegen eines kurzzeitigen Blutdruckabfalls wurden am Ende der Behandlung 100 µg Noradrenalin in mehreren Einzeldosen gegeben. Insgesamt benötigte der Affe während der Behandlung 128 µg Noradrenalin.

#### 4.1.3. Beeinflussung der hämatologischen Parameter

Bei den oXHTx von Cynomolgusaffen (n=2) kam es durch die IA und die gleichzeitige Herz-Lungen-Maschine zu einer Abnahme des Hämatokrit von  $35,7 \pm 0,5$  auf  $9,4 \pm 2,8$  %. Die Thrombozyten sanken von  $355,5 \pm 61,5$  auf  $74,5 \pm 1,5$  G/l und die Leukozyten von  $11,1 \pm 1,1$  auf  $2,8 \pm 1,2$  G/l.

Die IA führte bei heterotop transplantierten Cynomolgus- und Rhesusaffen (n=3) zu einem Absinken des Hämatokrit von  $41,6 \pm 3,3$  % auf  $27,4 \pm 0,3$  %. Die Thrombozyten wurden von durchschnittlich  $326 \pm 80$  G/l auf  $157,5 \pm 0,5$  G/l reduziert und die Leukozyten von  $5,7 \pm 0,6$  G/l auf  $1,9 \pm 1,1$  G/l.

In den Vorstudien mit Pavianen (oXHTx mit IA während der Herz-Lungen-Maschine; n=3) fiel der Hämatokrit durch die IA und die Herz-Lungen-Maschine von  $40,1 \pm 1,3$  % zu Beginn der Operation auf  $20,4 \pm 3,3$  % nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation. Die Plättchenzahlen sanken von  $250,3 \pm 32,2$  G/l auf  $96,3 \pm 25,8$  G/l und die weißen Blutkörperchen fielen von  $7,4 \pm 0,5$  G/l auf  $5,2 \pm 0,7$  G/l.

Bei den Langzeitstudien mit Pavianen (n=12) sank der Hämatokrit bei einem mittleren Ausgangswert von  $36,1 \pm 1,6$  % im Verlauf der IA signifikant um durchschnittlich 5,1 Prozentpunkte auf  $31,0 \pm 1,6$  %. Die Thrombozytenzahl wurde von  $254,2 \pm 23,3$  G/l auf  $156,6 \pm 9,0$  G/l signifikant reduziert. Der stärkste Thrombozytenabfall von 287 G/l auf 111 G/l

wurde bei Pavian 11 verzeichnet, entsprechend einer Reduktion um 61 %. Es kam zu einer signifikanten Verringerung der Leukozytenzahl von  $8,6 \pm 1,1$  G/l auf  $4,4 \pm 1,0$  G/l.

#### 4.1.4. Reduktion des Anti-Pig-Antikörpertiters

Cynomolgus- und Rhesusaffen (Vorstudien) wurden mit 2 Zyklen IA behandelt. Der Anti-Pig-Antikörpertiter sank dadurch von durchschnittlich  $1:129,6 \pm 1:96$  auf  $1:2,2 \pm 1:0,5$ .

In den Vorstudien mit Pavianen wurde der Titer durch 4 Zyklen IA von  $1:298,7 \pm 1:112,9$  auf  $1:42,7 \pm 1:10,7$  gesenkt. Bei den niedrigen Ausgangstitern (1:128 bis 1:512) konnte hier auch mit 4 Zyklen schon eine Reduktion auf Werte von 1:64 oder darunter erreicht werden.

	Cyn. 1	Cyn. 2	Cyn. 3	Rhes. 1	Rhes. 2	Pav. 1	Pav. 2	Pav. 4
<b>vor IA</b>	64	32	8	32	512	512	128	256
<b>nach IA</b>	2	4	1	2	2	64	32	32

Tab. 4.3.: Anti-Pig-Antikörpertiter vor und nach IA bei den Vorstudien (Cynomolgus- und Rhesusaffen: 2 Zyklen IA; Paviane: 4 Zyklen IA).

Bei den Langzeitstudien wurde der Titer durch  $9,7 \pm 1,2$  Zyklen präoperativer IA von  $1:692,4 \pm 1:180,8$  auf  $1:36,7 \pm 1:11,1$  signifikant gesenkt. Der Zielwert von  $<1:64$  konnte in drei Fällen nicht erreicht werden. Bei einem Tier (Pavian 8) wurden zu wenige Zyklen durchgeführt, so dass 4 Zyklen nur zu einer Reduktion von 1:512 auf 1:128 führten. Bei zwei Tieren (Pavian 10 und 19) mit einem Ausgangstiter von 1:1024 bzw. 1:128 wurde auch mit 14 bzw. 6 Zyklen nur ein Endwert von 1:64 erreicht.

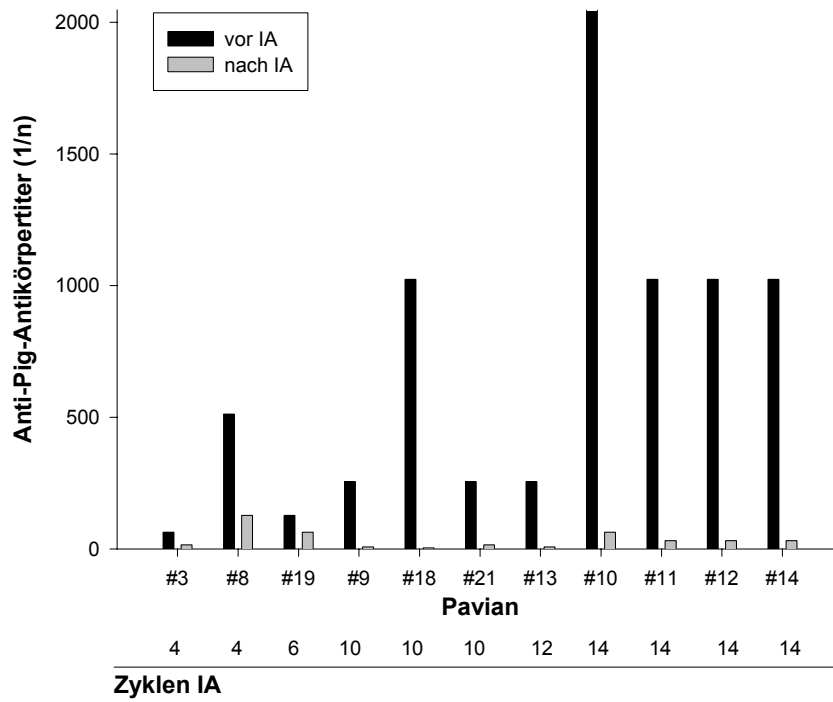


Abb. 4.3.: Reduktion des Anti-Pig-Antikörpertiters durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).

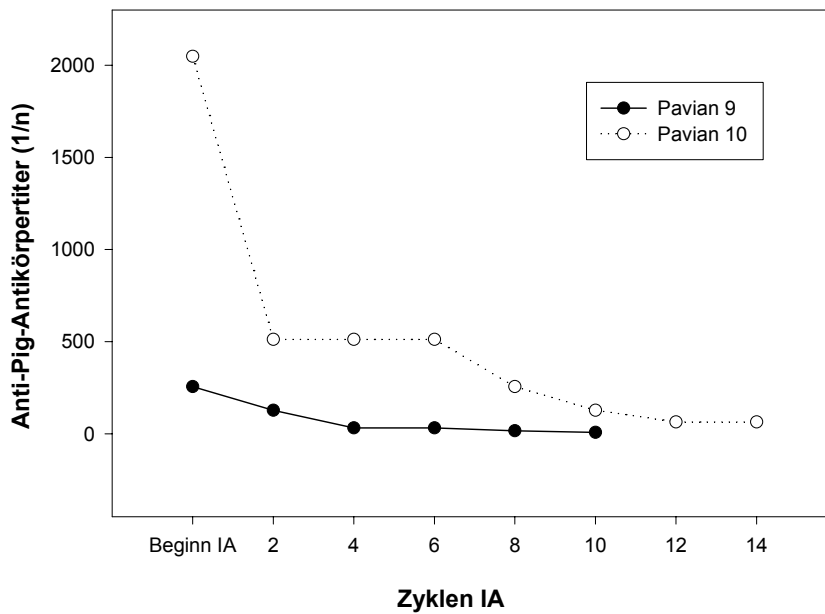


Abb. 4.4.: Anti-Pig-Antikörpertiter im Verlauf der Behandlung bei einem Pavian mit hohem und einem mit niedrigem Ausgangstiter.

#### 4.1.5. Reduktion von Immunglobulinen

Bei Cynomolgus- und Rhesusaffen sank IgG durch 2 Zyklen IA von durchschnittlich  $5,82 \pm 0,47$  g/l auf  $1,2 \pm 0,2$  g/l, IgM von  $0,54 \pm 0,2$  g/l auf  $0,08 \pm 0,02$  g/l und IgA von  $0,8 \pm 0,02$  g/l auf  $0,12 \pm 0,05$  g/l. Damit nahm IgG um 79 %, IgM um 85 % und IgA um 85 % ab.

Durch 4 Zyklen IA wurde bei den Vorstudien mit Pavianen eine Reduktion von IgG um durchschnittlich 85 % (von  $9,43 \pm 0,62$  g/l auf  $1,4 \pm 0,2$  g/l), von IgM um 83 % (von  $0,6 \pm 0,15$  g/l auf  $0,1 \pm 0$  g/l) und von IgA um 83 % (von  $1,0 \pm 0,32$  g/l auf  $0,17 \pm 0,07$  g/l) erreicht.

Bei den Langzeitstudien wurde der IgG-Wert durch die IA von  $9,66 \pm 0,5$  g/l auf  $1,0 \pm 0,38$  g/l gesenkt. IgM sank von  $0,72 \pm 0,14$  g/l auf  $0,16 \pm 0,07$  g/l und IgA von  $0,77 \pm 0,1$  g/l auf  $0,23 \pm 0,08$  g/l. IgG nahm somit um 90 %, IgM um 78 % und IgA um 70 % signifikant ab. Die Immunglobulinspiegel fielen nach 2 Zyklen stark ab, während nach 4 Zyklen nur noch geringe Unterschiede festzustellen waren.

Bei Pavian 8 ist durch die zu geringe Zyklenzahl nur eine Reduktion von IgG, IgM und IgA um etwa 50 % erreicht worden. Bei Pavian 21 nahm der Anti-Pig-Antikörpertiter zwar stark ab, die Immunglobulinspiegel sanken jedoch ebenfalls nur um etwa 50 %.

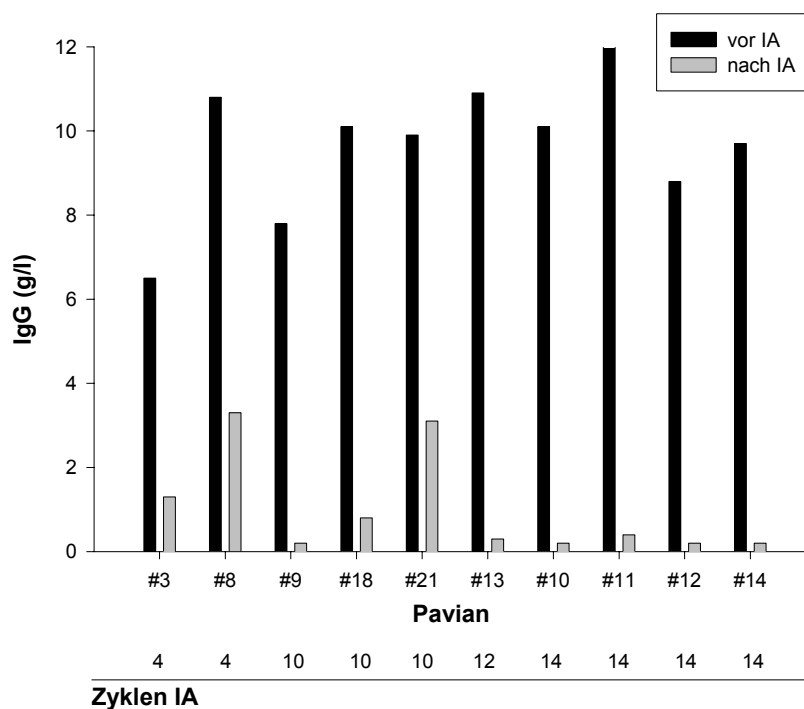


Abb. 4.5.: IgG-Reduktion durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).

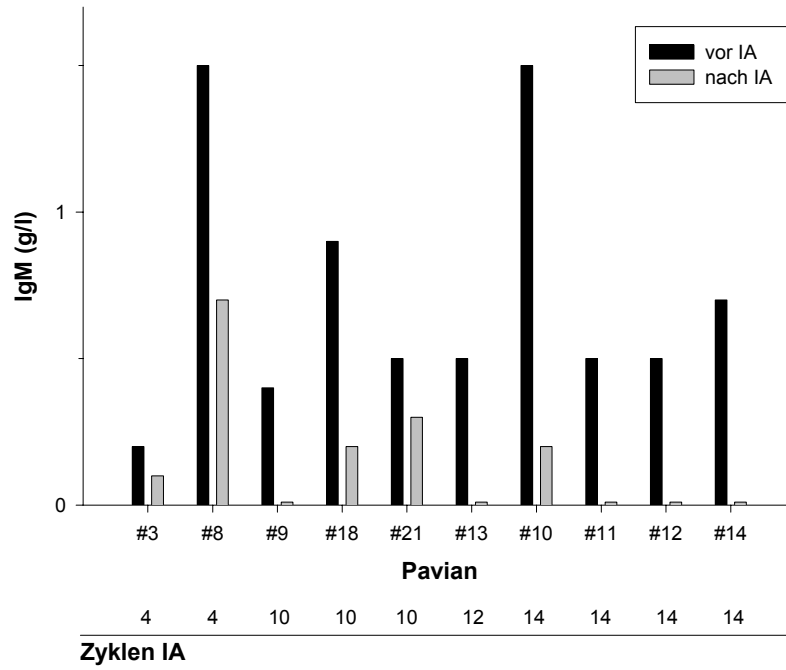


Abb. 4.6.: IgM-Reduktion durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).

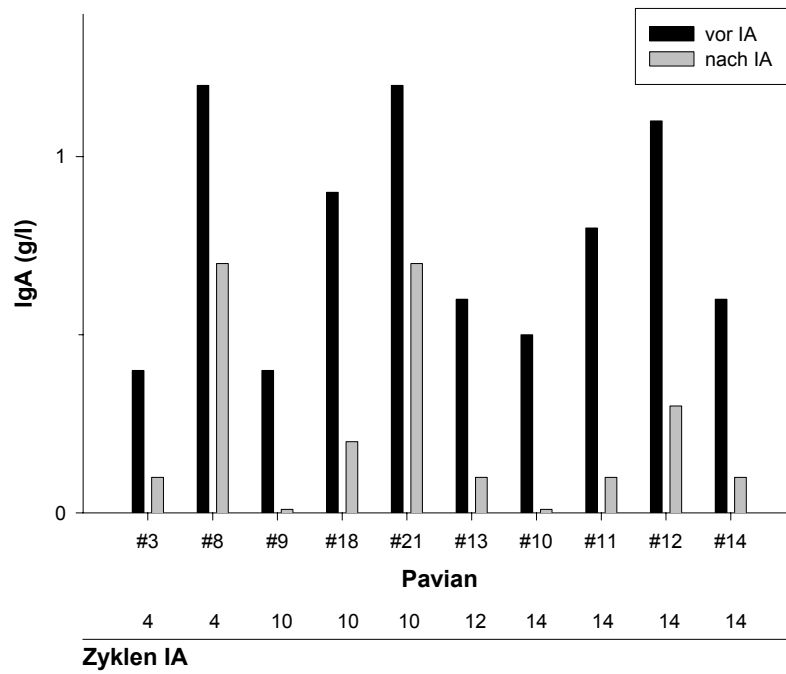


Abb.4.7.: IgA-Reduktion durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).

#### 4.1.6. Reduktion von Komplementfaktoren

Bei Cynomolgus- und Rhesusaffen wurde die C3-Konzentration von  $1,09 \pm 0,14$  g/l auf  $0,38 \pm 0,08$  g/l reduziert und C4 sank von  $0,19 \pm 0,03$  g/l auf  $0,07 \pm 0,02$  g/l. C3 nahm damit um 65 % und C4 um 63 % ab.

Bei den Vorstudien mit Pavianen sank der C3-Spiegel von  $1,27 \pm 0,23$  g/l auf  $0,42 \pm 0,11$  g/l und der C4-Spiegel von  $0,2 \pm 0,04$  g/l auf  $0,07 \pm 0,01$  g/l. Damit wurde C3 um 67 % und C4 um 65 % reduziert.

Bei den Langzeitstudien wurde der Komplementfaktor C3 von  $0,1 \pm 0,09$  g/l vor der IA auf  $0,47 \pm 0,05$  g/l nach IA signifikant gesenkt. Der C4-Spiegel sank von  $0,21 \pm 0,02$  g/l auf  $0,09 \pm 0,01$  g/l. Das entspricht einer Reduktion von C3 um 53 % und von C4 um 57 %.

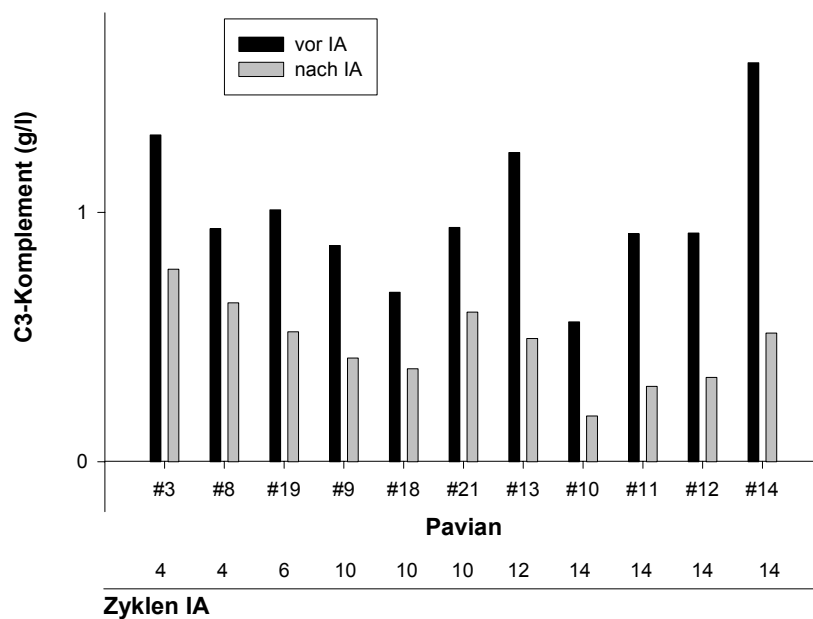


Abb. 4.8.: Reduktion von Komplementfaktor C3 durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).

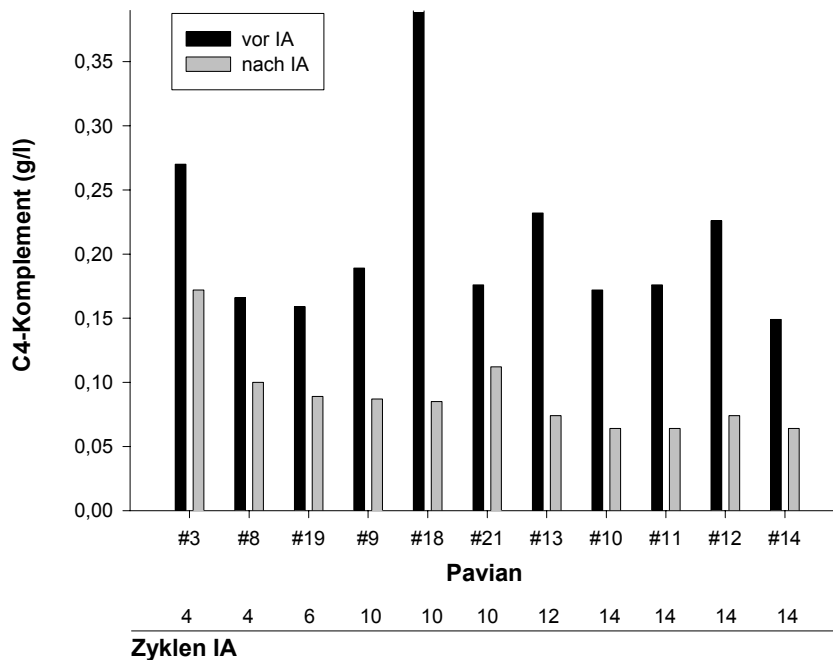


Abb. 4.9.: Reduktion von Komplementfaktor C4 durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).

## 4.2. Transplantatüberleben und Histologie

In den Vorstudien mit Cynomolgus- und Rhesusaffen zeigten sich bei den Tieren ohne IA mehr histologische Hinweise auf eine HAR, wie Nekrosen und Plättchenthromben, sowie vermehrt Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement im Transplantat. Jedoch konnte kein deutlicher Unterschied in der Überlebenszeit festgestellt werden, da die Versuche entweder terminiert wurden oder die Tiere aufgrund der massiven Hämodilution (Hämoglobin  $< 3$  g/dl) an Kreislaufversagen verstarben. Die Versuche waren bei den Tieren mit IA nach durchschnittlich  $136 \pm 18$  Min. beendet und bei den Tieren ohne IA nach  $103 \pm 48$  Min.

In den Vorstudien mit orthotop transplantierten Pavianen wurden die Versuche mit IA nach 100 Min. bzw. 11 und 21 Stunden terminiert, während das Transplantat von Pavian 6 (ohne IA) aufgrund einer massiven HAR nach 30 Min. versagte. Bei den Transplantatherzen der Tiere mit IA fand sich histologisch nahezu unauffälliges Gewebe mit nur minimalen Nekrosen, während bei Pavian 6 intravasale Thromben, transmurale Nekrosen und massive Hämorrhagien vorhanden waren.

In der Gruppe mit heterotop transplantierten Landrasseschweineherzen und IA (Langzeitstudien) wurde eines der Transplantate aufgrund einer insuffizienten Antikörper-Reduktion durch die IA nach einer Stunde hyperakut abgestoßen (Pavian 8). Makroskopisch



waren massive Hämorrhagien (bläulich-schwarze Verfärbung des Transplantats) sichtbar. Lichtmikroskopisch zeigten sich Mikrothromben, interstitielle Blutungen, Nekrosen und Ödeme. Ein weiterer Pavian (#3) zeigte nach 11,3 Tagen Überlebenszeit eine gute Transplantatfunktion und -morphologie. Der Affe musste wegen schwerer Medikamentennebenwirkungen (hämorrhagischer Pleuraerguss) eingeschläfert werden, ohne dass eine AVR festgestellt wurde. Der dritte Pavian (#5) verstarb nach 5,5 Stunden aufgrund einer massiven Blutung aus der Aorta abdominalis. Das Transplantatherz zeigte keine eindeutigen Abstoßungszeichen. Ein viertes Tier (Pavian 13), bei dem am 11. postoperativen Tag eine zweite Immunapheresebehandlung durchgeführt worden war, entwickelte am 15. Tag eine massive AVR. Als Kontrolle wurde Pavian 7 nicht mit IA behandelt. Dessen Transplantat unterlag nach 11,5 Stunden einer HAR.

Heterotope hDAF-transgene Transplantate arbeiteten im Langzeitversuch bei Pavianen (# 14, 18, 19 und 21) nach IA durchschnittlich  $5,0 \pm 1,3$  Tage. Bei allen vier Tieren waren Zeichen einer AVR vorhanden. Makroskopisch erschienen die Herzen dunkelrot und hart. Es waren Hämorrhagien und wandadhärente Thromben zu sehen. Das Herzgewicht hatte erheblich zugenommen. Lichtmikroskopisch zeigten sich ausgedehnte, zum Teil infarktartige hämorrhagische Nekrosen in beiden Ventrikeln mit Fibrin- und Plättchenthromben.

Bei den oXHTx von Landrasseschweineherzen (Pavian 9 bis 12, mit IA) überlebten die Tiere im Langzeitversuch durchschnittlich  $0,9 \pm 0,2$  Tage. Die Transplantatherzen zeigten diskrete Veränderungen wie Kontraktionsbanden der Herzmuskelzellen, Einzelzellnekrosen und Mikrothromben aus Plättchen, aber keine eindeutigen Abstoßungszeichen. Die Paviane verstarben an respiratorischer Insuffizienz (Lungenödem) und Organversagen.

### ***Vorstudien, Cynomolgus- und Rhesusaffen***

<b>Landrasseschweineherzen, keine Immunsuppression</b>		<b>Überlebenszeit</b>	<b>Abstoßung</b>
<b>Cynomolgus 1</b>	oXHTx mit IA	1 h 40 Min.	/
<b>Cynomolgus 2</b>	oXHTx mit IA	2 h 40 Min.	/
<b>Cynomolgus 3</b>	hXHTx mit IA	2 h 20 Min.	/
<b>Rhesus 1</b>	hXHTx mit IA	3 h 10 Min.	/
<b>Rhesus 2</b>	hXHTx mit IA	1 h 30 Min.	/
<b>Cynomolgus 5</b>	hXHTx ohne IA	2 h 30 Min.	HAR
<b>Cynomolgus 7</b>	hXHTx ohne IA	55 Min.	HAR

### ***Vorstudien, oXHTx mit Pavianen***

<b>Landrasseschweineherzen, keine Immunsuppression</b>		<b>Überlebenszeit</b>	<b>Abstoßung</b>
<b>Pavian 1</b>	mit IA	1 h 40 Min.	/
<b>Pavian 2</b>	mit IA	10 h 50 Min.	/
<b>Pavian 4</b>	mit IA	20 h 55 Min.	/
<b>Pavian 6</b>	ohne IA	1 h	HAR

### ***Langzeitstudien, hXHTx mit Pavianen (1)***

<b>Landrasseschweineherzen, mit Immunsuppression</b>		<b>Überlebenszeit</b>	<b>Abstoßung</b>
<b>Pavian 3</b>	mit IA	11,3 Tage	/
<b>Pavian 5</b>	mit IA	5,5 h	/
<b>Pavian 8</b>	mit IA	55 Min.	HAR
<b>Pavian 13</b>	mit IA	15,2 Tage	AVR
<b>Pavian 7</b>	ohne IA	11,5 h	HAR

./..

### **Langzeitstudien, hXHTx mit Pavianen (2)**

<b>hDAF-transgene Schweineherzen, mit Immunsuppression</b>		<b>Überlebenszeit</b>	<b>Abstoßung</b>
<b>Pavian 14</b>	mit IA	6,2 Tage	AVR
<b>Pavian 18</b>	mit IA	3,4 Tage	AVR
<b>Pavian 19</b>	mit IA	8 Tage	AVR
<b>Pavian 21</b>	mit IA	2,4 Tage	AVR

### **Langzeitstudien, oXHTx mit Pavianen**

<b>Landrasseschweineherzen, mit Immunsuppression</b>		<b>Überlebenszeit</b>	<b>Abstoßung</b>
<b>Pavian 9</b>	mit IA	1 Tag	/
<b>Pavian 10</b>	mit IA	5 h 35 Min.	/
<b>Pavian 11</b>	mit IA	1,2 Tage	/
<b>Pavian 12</b>	mit IA	23 h 20 Min.	/

Tab. 4.4.: Übersicht über die Versuchsgruppen mit Überlebenszeiten und Art der Abstoßungsreaktion. AVR = akute vaskuläre Abstoßung; HAR = hyperakute Abstoßung; hXHTx = heterotope Xenotransplantation; IA = Immunadsorption; oXHTx = orthotope Xenotransplantation.

## **4.3. Transplantation und postoperativer Verlauf**

### **4.3.1. Vorstudien mit Cynomolgus- und Rhesusaffen**

Es wurden zwei orthotope Transplantationen mit IA bei Cynomolgusaffen (#1 und 2) und drei heterotope Transplantationen mit IA bei Cynomolgus- bzw. Rhesusaffen (Cynomolgus 3, Rhesus 1 und 2) durchgeführt, sowie zwei heterotope Transplantationen ohne IA bei Cynomolgusaffen (#5 und 7).

Durch 2 Zyklen IA wurde der Anti-Pig-Antikörpertiter von  $1:129,6 \pm 1:96$  auf  $1:2,2 \pm 1:0,5$  gesenkt. Bei den Tieren ohne IA lag der Ausgangstiter bei  $1:384 \pm 1:128$ . Die Anti-Pig-Antikörpertiter waren 10 Min. nach der Implantation des Spenderherzens nach IA niedriger als bei den Tieren ohne IA ( $1:2,2 \pm 1:0,5$  mit IA und  $1:36 \pm 1:28$  ohne IA). Durch die Adsorption der Antikörper im Transplantat und die operationsbedingte Hämodilution sanken die Titer in beiden Gruppen später noch weiter ab.

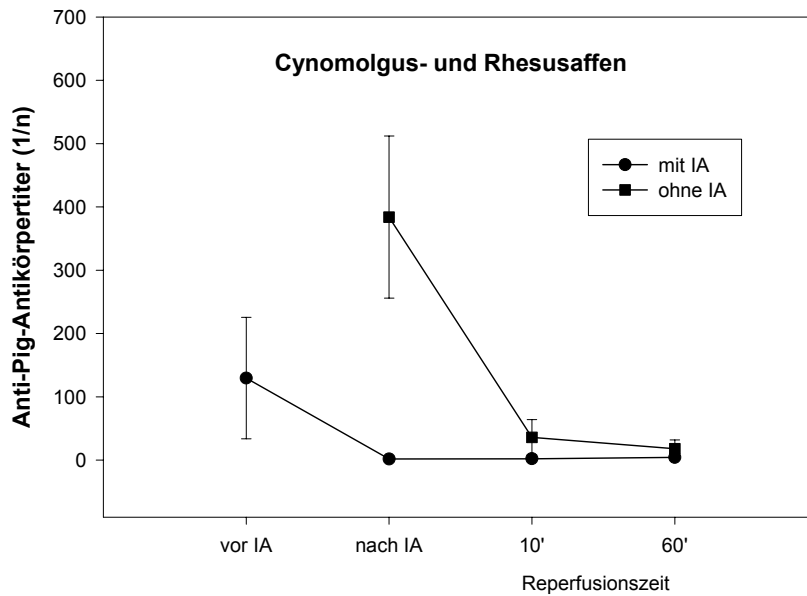


Abb. 4.10.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.

IgG wurde durch 2 Zyklen IA um 79 %, IgM um 85 % und IgA um 85 % reduziert. IgM und IgA fielen bei den Tieren mit IA postoperativ auf sehr niedrige Werte und waren zum Teil nicht mehr nachweisbar. In der Gruppe ohne IA sanken die Spiegel nach der Implantation des Spenderherzens im Vergleich zu den präoperativen Werten um 74 % (IgG), 77 % (IgM) und 46 % (IgA) ab. Die Spiegel blieben bei den Tieren ohne IA während der Transplantation auf etwas höherem Niveau im Vergleich zur Gruppe mit IA.

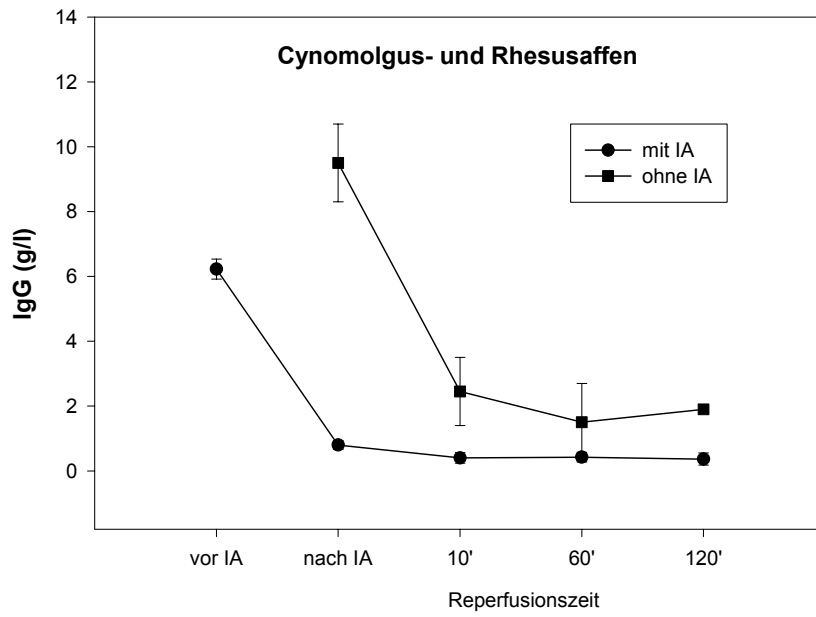


Abb. 4.11.: Verlauf des IgG-Spiegels bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.

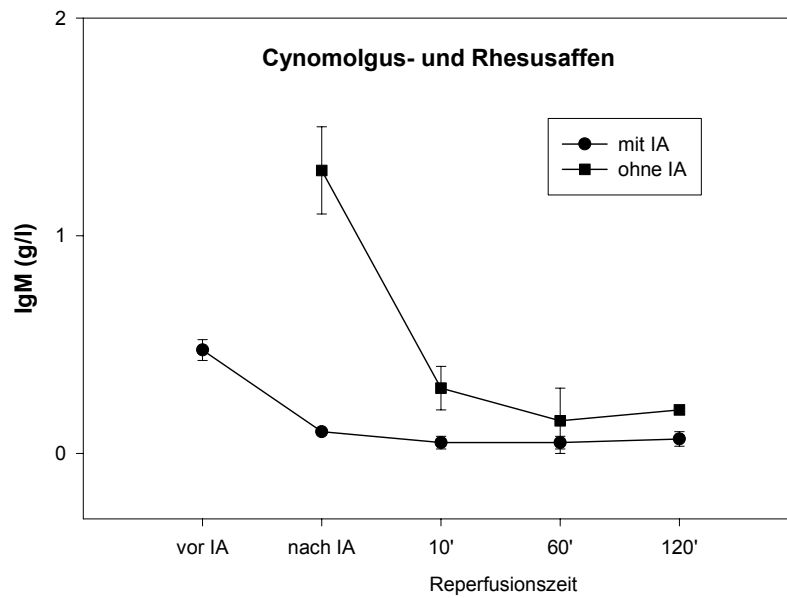


Abb. 4.12.: Verlauf des IgM-Spiegels bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.

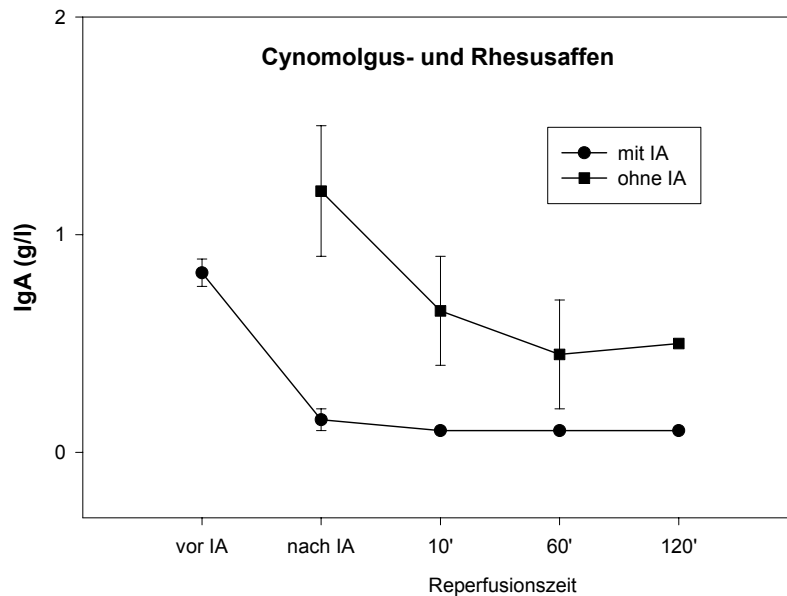


Abb. 4.13.: Verlauf des IgA-Spiegels bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.

Durch die IA wurde C3 um 65 % und C4 um 63 % reduziert. Ohne IA fiel C3 intraoperativ um 51 % und C4 um 61 % bis zum Zeitpunkt 10 Min. nach der Transplantation, dies bei gleich hohen Ausgangswerten wie in der Gruppe mit IA.

60 Min. nach Reperusionsbeginn zeigte sich eine erhebliche Varianz der Kreatinkinase-MB Masse-Werte. Insbesondere fällt ein massiver Anstieg bei Cynomolgus 5 (ohne IA, HAR) auf. Das Maximum wurde nach 60-120 Min. erreicht. Bei Rhesus 1 kam es erst nach 180 Min. zu einem deutlichen Anstieg der CK-MB Masse (auf 23,2 ng/ml).

<u>Kreatinkinase-MB Masse (ng/ml)</u>		<b>60' Reperfusion</b>
<u>oXHTx mit IA</u>	<b>Cyn. 1</b>	88,5
	<b>Cyn. 2</b>	66,6
<u>hXHTx mit IA</u>	<b>Rhesus 1</b>	5,61
	<b>Rhesus 2</b>	51,3
<u>hXHTx ohne IA</u>	<b>Cyn. 5</b>	585
	<b>Cyn. 7</b>	34,3

Tab. 4.5.: Kreatinkinase-MB Masse 60 Min. nach Reperusionsbeginn bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.

In den Vorstudien mit Cynomolgus- und Rhesusaffen kam es durch intraoperative Blutverluste und eine massive Hämodilution durch die extrakorporale Zirkulation zu einem

starken Abfall des Hämatokrit (auf 10 %). Die Thrombozyten fielen ebenfalls stark ab. 60 Min. nach der Implantation des Spenderherzens betrug die Zahl der Blutplättchen in allen Gruppen zwischen 13 und 84 G/l. Bei den oXHTx kam es hauptsächlich während der Herz-Lungen-Maschine zu Hämodilution, Thrombozyten- und Blutverlusten. Bei den hXHTx mit IA wurden Hämatokrit und Thrombozytenzahl durch die IA reduziert. Cynomolgusaffen, die nicht mit IA behandelt worden waren, erlitten durch die Operation ebenfalls größere Blutverluste.

### 4.3.2. Vorstudien mit Pavianen

Es wurden drei oXHTx mit IA und eine oXHTx ohne IA vorgenommen. Hier wurde die Behandlung ebenfalls während der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt, so dass der Zeitpunkt vor Beginn der IA dem Beginn der Herz-Lungen-Maschine entspricht. Das Transplantat des Tieres ohne IA versagte aufgrund einer massiven HAR nach 30 Min., während die anderen drei Versuche ohne Abstoßungsreaktion nach 100 Min., 11 und 21 Stunden terminiert wurden.

Der Anti-Pig-Antikörpertiter sank durch 4 Zyklen IA von  $1:298,7 \pm 1:112,9$  auf  $1:42,7 \pm 1:10,7$  und betrug 30 Min. nach der Implantation  $1:6,7 \pm 1:1,3$ . Ohne IA (Pavian 6) sank der Titer 30 Min. nach der Transplantation von  $1:1024$  auf  $1:256$ .

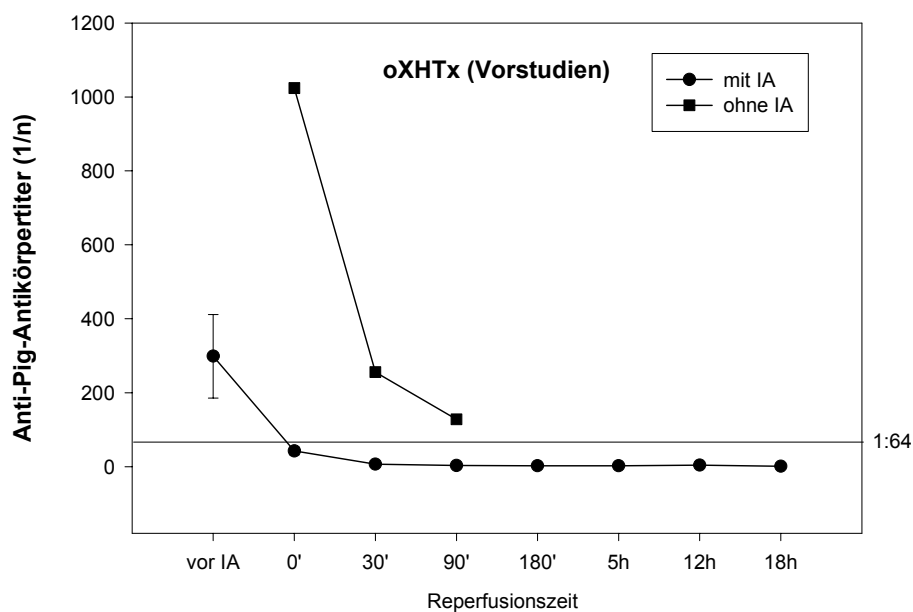


Abb. 4.14.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei den Vorstudien mit Pavianen.

Durch die IA kam es zu einer Reduktion von IgG um 85 %, von IgM um 83 % und von IgA um 83 %. Da hier nur 4 Behandlungszyklen durchgeführt worden waren, lagen bei den Vorstudien mit Pavianen die Immunglobulinspiegel nach IA im Durchschnitt auf etwas höherem Niveau als nach den Behandlungen bei den Langzeitstudien (Kapitel 4.3.4.). Während der Operation kam es wieder zu einem leichten Anstieg der Immunglobulinspiegel. 30 Min. nach Reperfusionbeginn lag IgG bei  $1,57 \pm 0,09$  g/l, IgM bei  $0,13 \pm 0,03$  g/l und IgA bei  $0,2 \pm 0,06$  g/l.

Bei Pavian 6 (ohne IA) sanken die IgG-, IgM- und IgA-Spiegel nach der Implantation des Spenderherzens nicht mehr wesentlich ab. Sie betragen nach 30 Min. Reperfusionzeit 4,2 g/l (IgG), 0,4 g/l (IgM) und 0,2 g/l (IgA). Durch Blutverluste und die Hämodilution während der Herz-Lungen-Maschine waren die Spiegel zu Beginn der Reperfusion des Spenderherzens (Zeitpunkt 0 Min.) bereits erniedrigt.

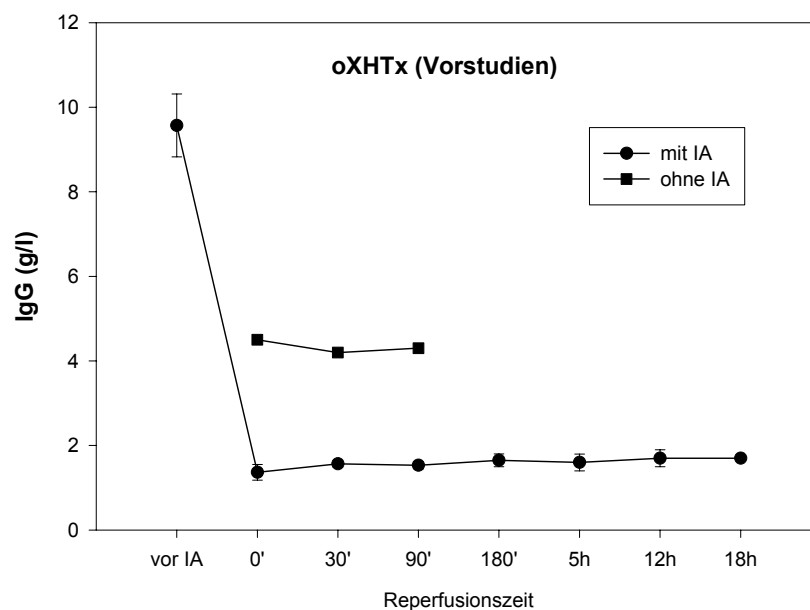


Abb. 4.15.: Verlauf des IgG-Spiegels bei den Vorstudien mit Pavianen.



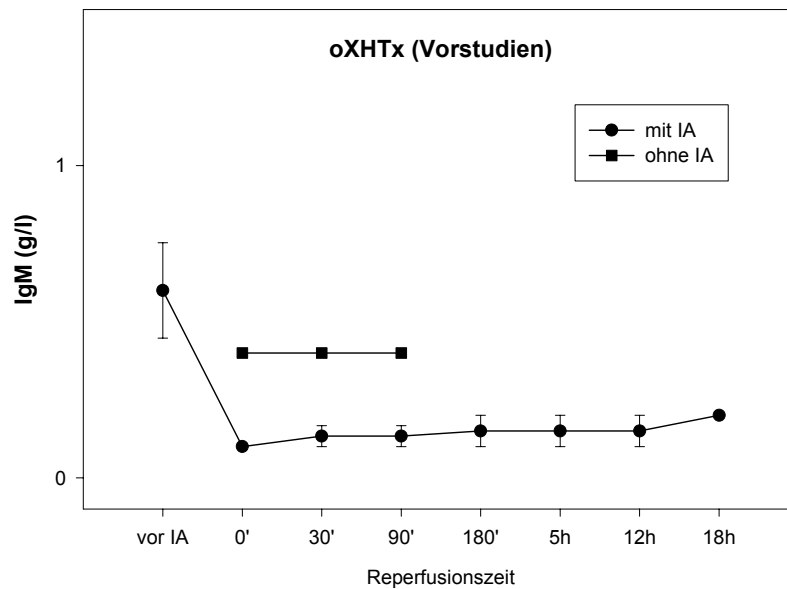


Abb. 4.16.: Verlauf des IgM-Spiegels bei den Vorstudien mit Pavianen.

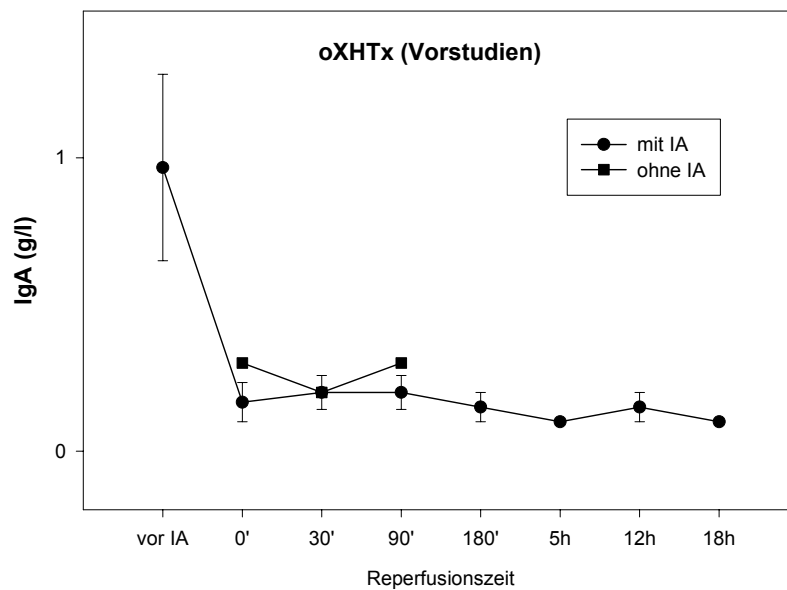


Abb. 4.17.: Verlauf des IgA-Spiegels bei den Vorstudien mit Pavianen.

C3 wurde durch die IA um 67 % und C4 um 65 % reduziert. Nach 30 Min. Reperusionszeit betrug C3  $0,44 \pm 0,1$  g/l und C4  $0,07 \pm 0,01$  g/l. Es kam bei den Tieren, die mit IA behandelt worden waren, zu keiner weiteren Reduktion der Komplementfaktoren C3 und C4. Bei Pavian 6 (ohne IA) fielen die Komplementfaktoren C3 und C4 nach der Implantation leicht ab. 30 Min nach der Transplantation lag der C3-Spiegel bei 0,39 g/l und der C4-Spiegel bei 0,05 g/l.

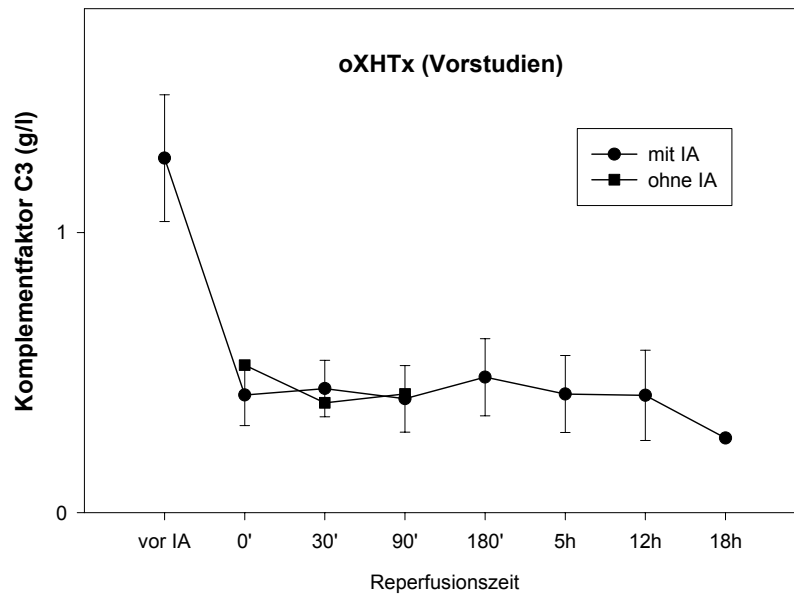


Abb. 4.18.: Verlauf des Spiegels von Komplementfaktor C3 bei den Vorstudien mit Pavianen.

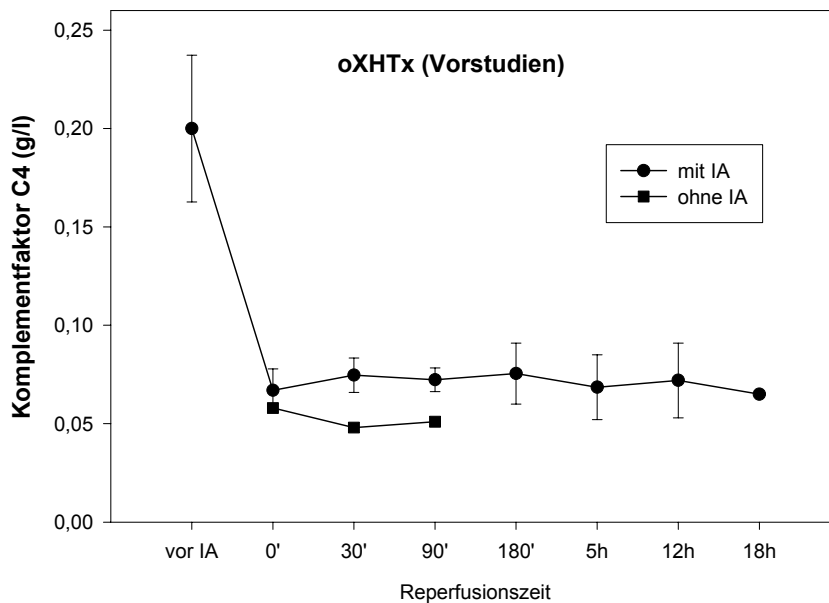


Abb. 4.19.: Verlauf des Spiegels von Komplementfaktor C4 bei den Vorstudien mit Pavianen.

Die Kreatinkinase-MB Masse erreichte bei den Tieren mit IA nach 90 Min. bis 5 Stunden ein Maximum. Dagegen zeigte Pavian 6 (HAR) bereits nach 60 Min. mit 81,7 ng/ml den höchsten Wert. Die Werte fielen bei den Tieren mit IA nach einigen Stunden wieder leicht ab auf 25,1 bis 60 ng/ml.

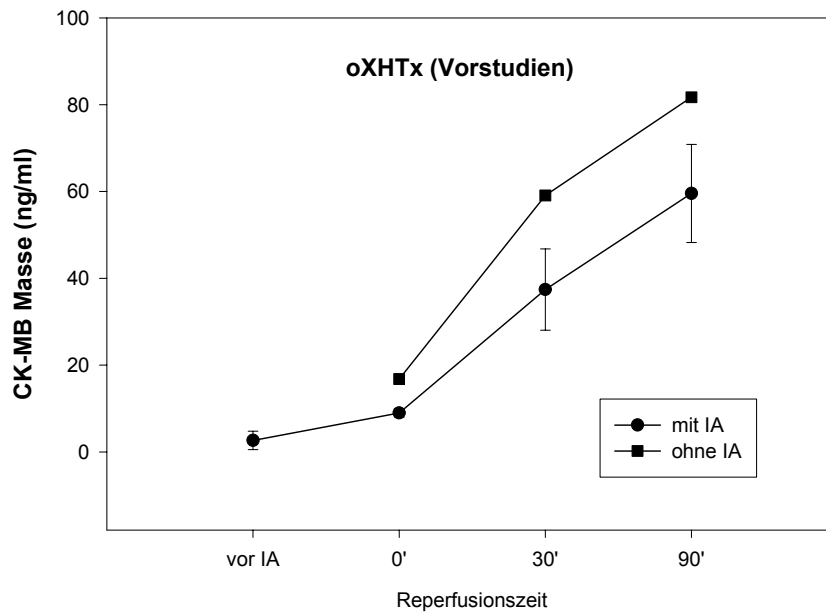


Abb. 4.20.: Verlauf der Kreatinkinase-MB Masse bei den Vorstudien mit Pavianen.

30 Min. nach der Implantation betrug die Leukozytenzahl durchschnittlich  $6,2 \pm 0,4$  G/l. Nach 5 Stunden zeigte sich ein Maximum von  $20,8 \pm 3$  G/l. Pavian 6 (ohne IA) hatte zu Beginn hohe Leukozytenwerte (10,4 G/l), die nach 60 Min. auf 7,7 G/l fielen. Der Leukozytenanstieg nach 180 Min. ist auf die Gabe von Methylprednisolon zurückzuführen. Als einzige immunsuppressive Maßnahme erhielten diese Tiere 30 Min. vor Öffnen der Aortenklammer eine einmalige Gabe von 300 mg Urbason<sup>®</sup> i.v.

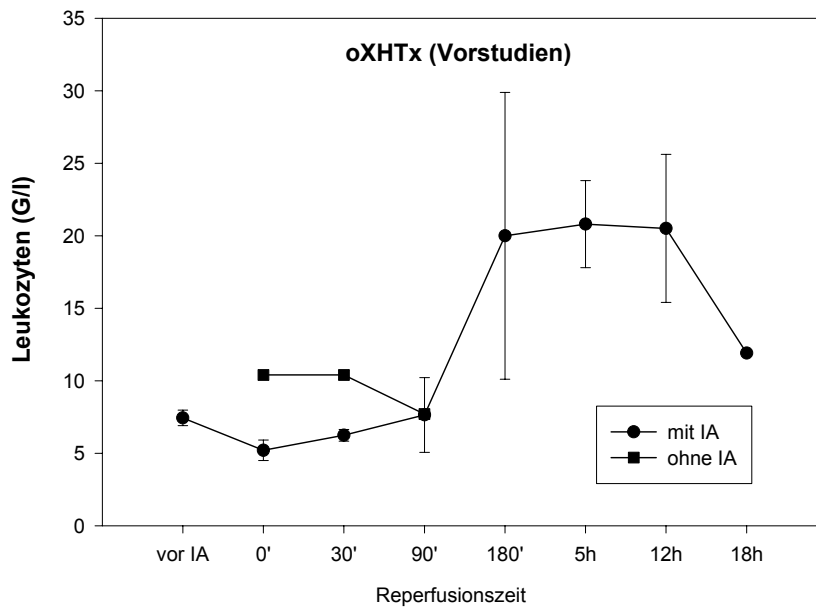


Abb. 4.21.: Verlauf der Leukozytenzahl bei den Vorstudien mit Pavianen.

Die Tiere mit IA zeigten bei einem präoperativen Wert von  $40,1 \pm 1,3$  % einen Hämatokrit von  $21,1 \pm 4,3$  % 90 Min. nach der Implantation des Spenderherzens. Die Thrombozytenzahlen lagen vor der Operation bei  $250,3 \pm 32,2$  G/l und nach 90 Min. bei  $61,3 \pm 26,3$  G/l. Bei Pavian 6 betrug der Hämatokrit 60 Min. nach Implantation  $18,2$  % und die Thrombozytenzahl  $87$  G/l bei Ausgangswerten von  $37,1$  % bzw.  $270$  G/l zu Operationsbeginn. Hämatokrit und Thrombozyten wurden durch die IA und die Herz-Lungen-Maschine reduziert bzw. es kam dadurch zu einer erheblichen Hämodilution. Blutkonserven wurden nicht verwendet.

#### 4.3.3. Langzeitstudien: hXHTx mit Landrasseschweineherzen

Es wurden fünf Versuche zum Langzeitüberleben von heterotop transplantierten Landrasseschweineherzen bei Pavianen durchgeführt (Pavian 3, 5, 7, 8 und 13). Alle Empfänger außer Pavian 7, der als Kontrolle diente, wurden präoperativ mit IA behandelt. Bei Pavian 13 wurde am 11. postoperativen Tag eine zweite Immunadsorptionsbehandlung durchgeführt, bevor er nach 15 Tagen eine AVR entwickelte. Die Transplantate von Pavian 7 (ohne IA) und Pavian 8 wurden hyperakut abgestoßen. Pavian 3 und 5 entwickelten keine Transplantatabstoßung.

Der Anti-Pig-Antikörpertiter wurde durch  $6 \pm 2$  Zyklen IA von durchschnittlich  $1:277,3 \pm 1:129,8$  auf  $1:50,7 \pm 1:38,7$  gesenkt. 30 Min. nach Beginn der Reperfusionzeit lag der Anti-Pig-Antikörpertiter bei  $1:11,7 \pm 1:10,2$ .

Bei Pavian 8 konnte durch die IA nur eine Senkung auf 1:128 erreicht werden. Der Titer fiel nach der Transplantation weiter auf 1:32. Zum Zeitpunkt der HAR (nach 60 Min.) betrug der Anti-Pig-Antikörpertiter 1:64.

Pavian 7 (ohne IA) wies präoperativ einen Anti-Pig-Antikörpertiter von 1:64 auf, der 30 Min. nach der Transplantation auf 1:8 absank.

Bei Pavian 13 stieg der Titer nach der zweiten Immunapherese stark an auf 1:1024, bevor das Transplantat nach 15 Tagen einer AVR unterlag.

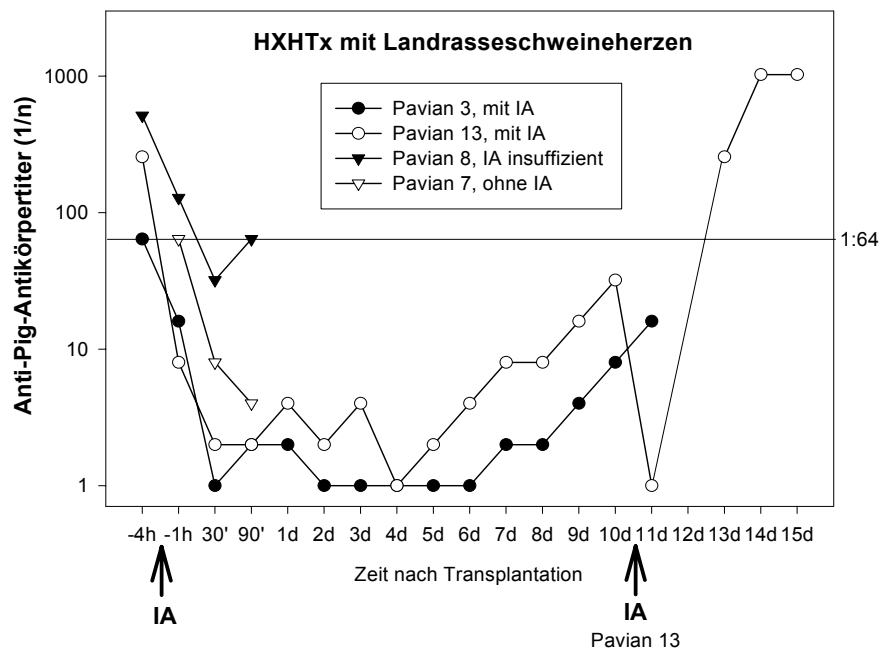


Abb. 4.22.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).

IgG wurde durch die IA um 83 %, IgM um 63 % und IgA um 59 % reduziert. 30 Min. nach der Transplantation kam es zu einer weiteren leichten Reduktion.

Pavian 8 (HAR) zeigte im Vergleich zu den anderen Tieren mit IA intraoperativ hohe Immunglobulinspiegel, vor allem bei IgM.

<b>Immunglobuline (g/l)</b>	<b>alle mit IA</b>	<b>Pavian 8, mit IA</b>	<b>Pavian 7, ohne IA</b>
<b>IgG vor IA</b>	9,4 ± 1,45	10,8	/
<b>IgG nach IA</b>	1,63 ± 0,88	3,3	7,8
<b>IgG nach 30' Reperfusion</b>	1,5 ± 0,6	2,7	6,1
<b>IgM vor IA</b>	0,73 ± 0,39	1,5	/
<b>IgM nach IA</b>	0,27 ± 0,22	0,7	0,3
<b>IgM nach 30' Reperfusion</b>	0,23 ± 0,19	0,6	0,3
<b>IgA vor IA</b>	0,73 ± 0,24	1,2	/
<b>IgA nach IA</b>	0,3 ± 0,2	0,7	0,8
<b>IgA nach 30' Reperfusion</b>	0,23 ± 0,13	0,5	0,7

*Tab. 4.6.: Intraoperativer Verlauf der Immunglobulinspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).*

Zwischen dem 1. und 2. postoperativen Tag stieg IgG auf die Hälfte des Ausgangswertes an. Die IgG-Spiegel veränderten sich im weiteren Verlauf nicht mehr wesentlich. IgM stieg jedoch kontinuierlich weiter an und erreichte zum Zeitpunkt der Abstoßung ein Maximum. IgA blieb unterhalb der Ausgangswerte.

Bei Pavian 13 erreichte der IgG-Spiegel am 14. Tag wieder das gleiche Niveau wie vor der 2. Immunadsorptionsbehandlung am 11. Tag. Es fällt ein starker Anstieg des IgM-Wertes am 14. Tag auf (1,2 g/l bei einem präoperativen Wert von 0,5 g/l).

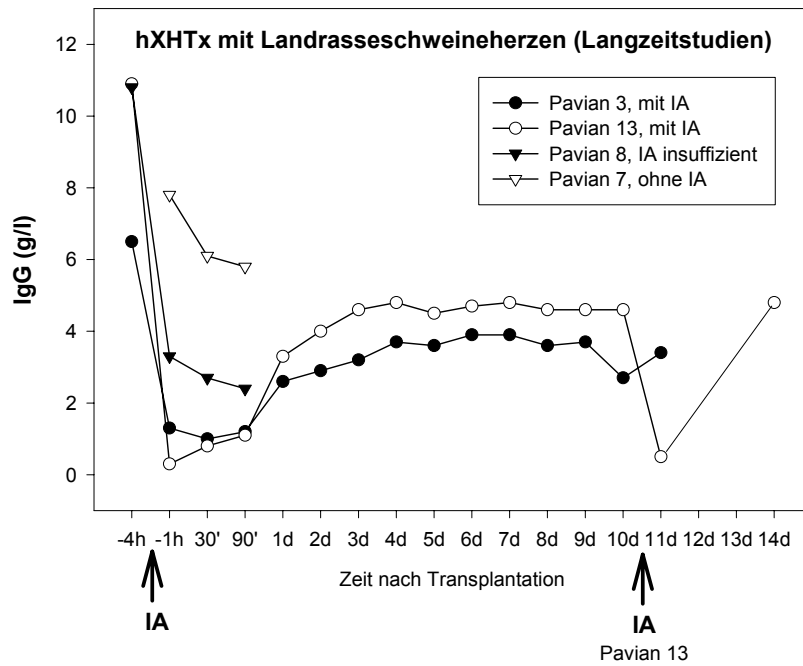


Abb. 4.23.: Verlauf des IgG-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).

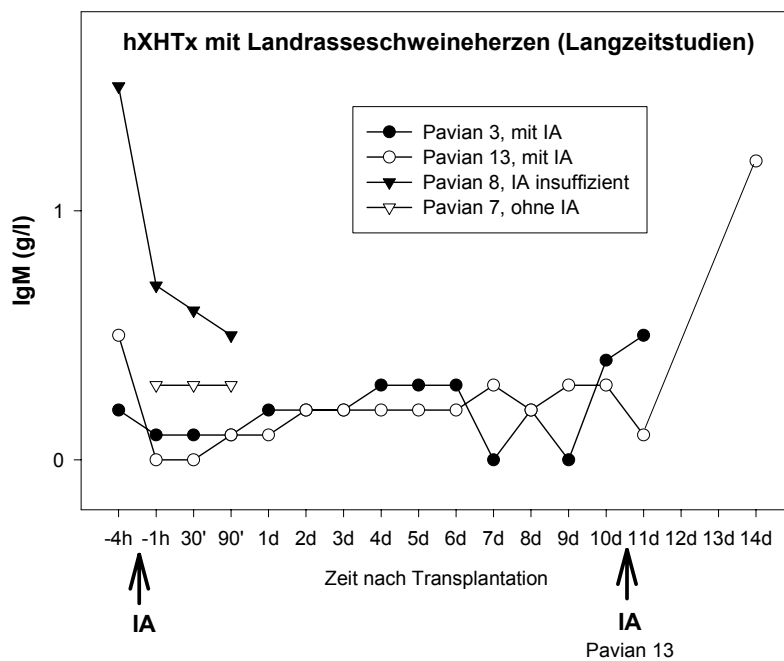


Abb. 4.24.: Verlauf des IgM-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).

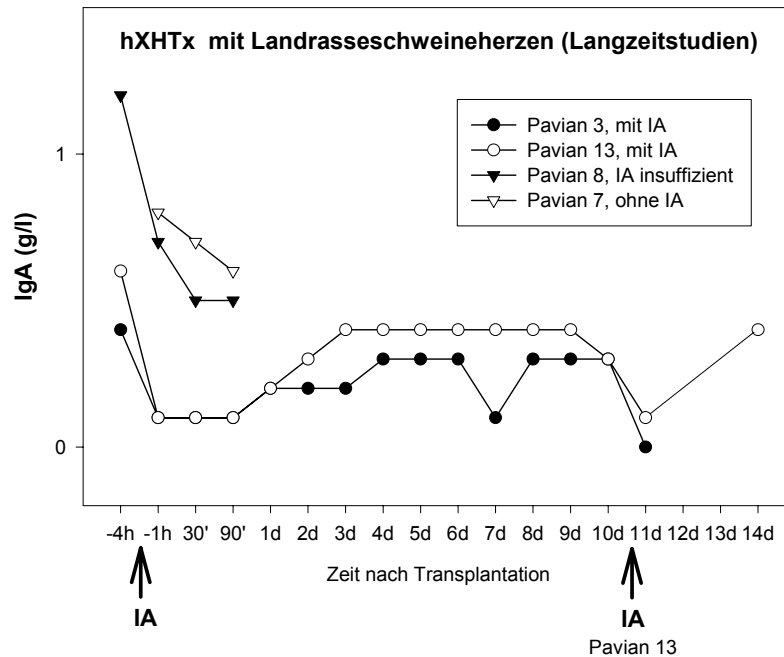


Abb. 4.25.: Verlauf des IgA-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).

Nach der IA kam es zu einem 46- bzw. 45-%igen Abfall der Komplementfaktoren C3 und C4 im Vergleich zu den Ausgangswerten. Pavian 7 und 8 (HAR) wiesen im Vergleich zu den Tieren, bei denen die Transplantate nicht hyperakut abgestoßen wurden, intraoperativ keine stark unterschiedlichen Komplementspiegel auf.

Komplementfaktoren (g/l)	alle mit IA	Pavian 8, mit IA	Pavian 7, ohne IA
<b>C3 vor IA</b>	1,16 ± 1,12	0,93	/
<b>C3 nach IA</b>	0,63 ± 0,08	0,64	0,87
<b>C3 nach 30' Reperfusion</b>	0,52 ± 0,08	0,4	0,74
<b>C4 vor IA</b>	0,22 ± 0,03	0,17	/
<b>C4 nach IA</b>	0,12 ± 0,03	0,1	0,24
<b>C4 nach 30' Reperfusion</b>	0,1 ± 0,02	0,07	0,21

Tab. 4.7.: Intraoperativer Verlauf der Komplementspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).

Innerhalb der nächsten Tage stiegen die Spiegel bei Pavian 3 und 13 langsam auf das Niveau des präoperativen Wertes und ab dem 5. bis 6. Tag auch über das Ausgangsniveau hinaus an.



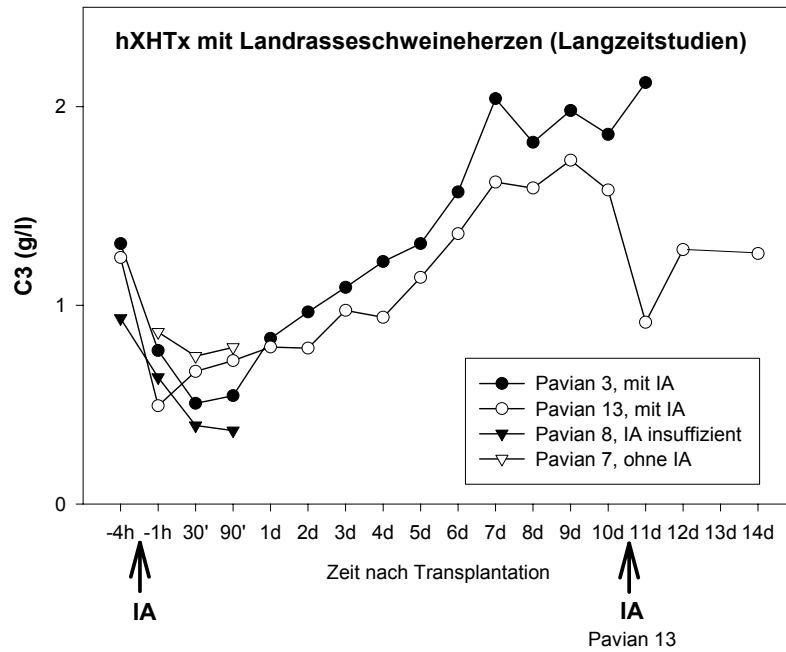


Abb. 4.26.: Verlauf des C3-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).

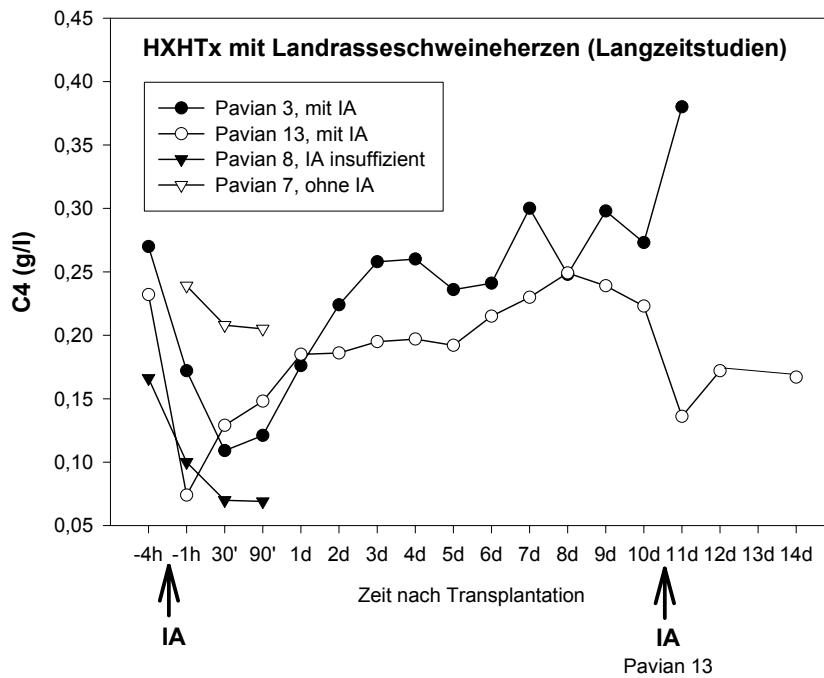


Abb. 4.27.: Verlauf des C4-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).

Es kam nach der Transplantation zu einem Anstieg der Kreatinkinase-MB Masse von normalen präoperativen Werten ( $< 5 \text{ ng/ml}$ ) auf ein Maximum (bis zu  $13,4 \text{ ng/ml}$ ) am 1. postoperativen Tag. Danach fielen die Werte wieder auf normales Niveau. Bei Pavian 13 war am 10.-11. postoperativen Tag ein Anstieg auf  $12,2 \text{ ng/ml}$  zu sehen. Bei Pavian 7 und 8 stieg die CK-MB Masse zum Zeitpunkt der HAR auf  $6,8$  bzw.  $12 \text{ ng/ml}$  an.

Die Leukozyten wurden durch die IA von  $6,7 \pm 1,7 \text{ G/l}$  auf  $3,9 \pm 1 \text{ G/l}$  reduziert und erreichten 30 Min. nach der Transplantation ein Minimum von  $3,7 \pm 1,1 \text{ G/l}$  und am 1. postoperativen Tag ein Maximum ( $10,7 \pm 3,7 \text{ G/l}$ ). Der Leukozytenanstieg wurde hier erst am nächsten Tag beobachtet, da die letzte Blutabnahme am Operationstag bereits nach 90 Minuten erfolgte und der cortisoninduzierte Anstieg der Leukozyten somit erst einen Tag später erfasst wurde. In den folgenden Tagen fielen die weißen Blutkörperchen wieder auf sehr niedrige Werte und zeigten kurz vor der Abstoßungsreaktion oder beim Aussetzen der Immunsuppression einen weiteren leichten Anstieg. Bei Pavian 13 stiegen die Leukozyten einige Tage nach der zweiten Immunapherese deutlich an.

Pavian 7 (ohne IA, HAR) zeigte 90 Min. nach der Transplantation einen deutlichen Leukozytenanstieg von  $5,6 \text{ G/l}$  auf  $11,9 \text{ G/l}$ .

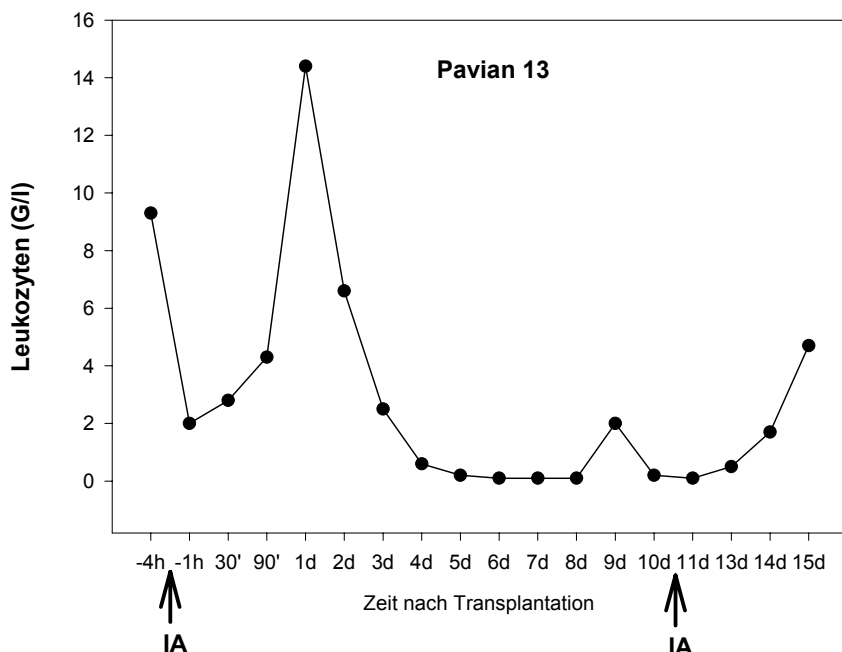


Abb. 4.28.: Verlauf der Leukozytenzahl bei Pavian 13 (hXHTx mit Landrasseschweineherz, Langzeitstudie).

Der Hämatokrit fiel bei den Tieren mit IA von initial  $36,8 \pm 0,6 \%$  auf  $31,2 \pm 0,9 \%$  nach IA. 90 Min. nach der Transplantation betrug er  $33,3 \pm 1,9 \%$ .

Die Thrombozyten wurden durch die IA ebenfalls reduziert. Sie fielen von  $202 \pm 40,4 \text{ G/l}$  auf  $156,7 \pm 14,5 \text{ G/l}$ . Die Thrombozytenzahlen erholten sich anschließend wieder. Sie stiegen 90 Min. nach der Implantation des Spenderherzens auf  $122 \pm 10,4 \text{ G/l}$ .

Bei Pavian 7 (ohne IA, HAR) betrug der Hämatokrit initial  $37 \%$  und 90 Min. nach der Transplantation  $33,6 \%$ . Die Plättchenzahlen blieben konstant bei Werten zwischen  $274 \text{ G/l}$  und  $299 \text{ G/l}$ .

#### 4.3.4. Langzeitstudien: hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen

Es wurden bei vier Pavianen hDAF-transgene Schweineherzen heterotop transplantiert (Pavian 14, 18, 19 und 21). Alle Tiere wurden präoperativ mit IA behandelt. Die Transplantate überlebten durchschnittlich  $5 \pm 1,3$  Tage und unterlagen alle einer AVR.

Durch  $10 \pm 1,6$  Zyklen IA konnte der Anti-Pig-Antikörpertiter von durchschnittlich  $1:608 \pm 1:241,6$  auf  $1:29 \pm 1:13$  gesenkt werden. Bis auf Pavian 19, der nach der IA einen Titer von  $1:64$  aufwies, wurde der Anti-Pig-Antikörpertiter bei allen Tieren auf  $1:32$  oder darunter gesenkt. 30 Min. nach der Transplantation betrug der Titer noch  $1:14 \pm 1:6,6$ . Pavian 14 zeigte einen deutlichen Titeranstieg zum Zeitpunkt der Abstoßungsreaktion.

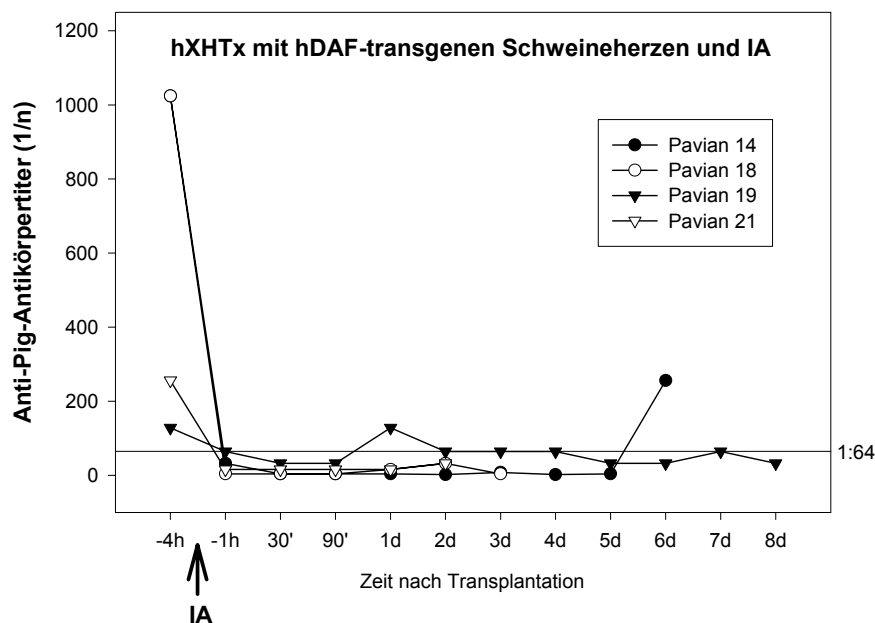


Abb. 4.29.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen).

IgG war nach der IA um durchschnittlich 86 %, IgM um 74 % und IgA um 63 % gefallen. Die Spiegel stiegen nach ein bis zwei Tagen auf die Hälfte des Ausgangswertes an. Es kam zu keinem weiteren Anstieg der Immunglobulinspiegel.

Immunglobuline	IgG (g/l)	IgM (g/l)	IgA (g/l)
<b>vor IA</b>	9,9 ± 0,08	0,7 ± 0,08	0,9 ± 0,12
<b>nach IA</b>	1,38 ± 0,63	0,18 ± 0,06	0,33 ± 0,13
<b>nach 30' Reperfusion</b>	1,48 ± 0,53	0,18 ± 0,06	0,33 ± 0,13

Tab. 4.8.: Intraoperativer Verlauf der Immunglobulinspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen).

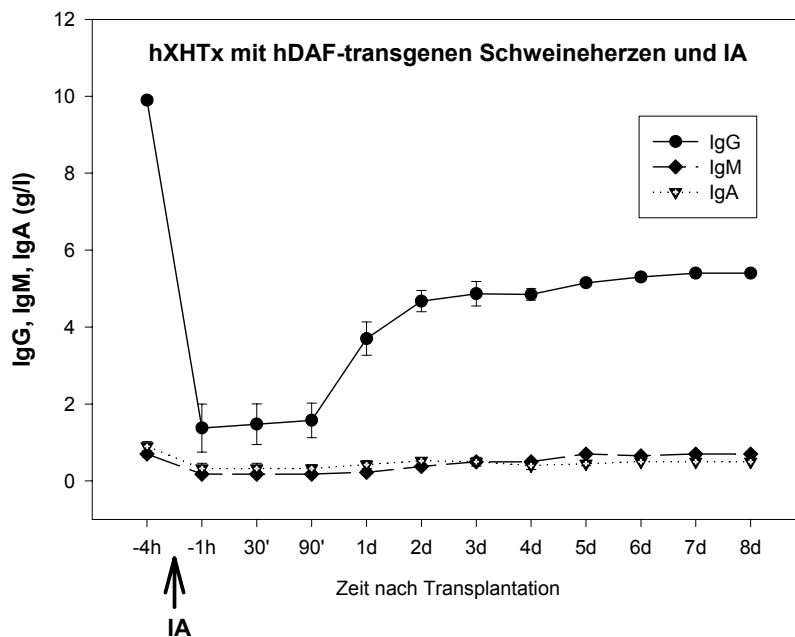


Abb. 4.30.: Verlauf der Immunglobulinspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen).

Durch die IA wurde C3 um 53 % und C4 um 59 % reduziert. Innerhalb von drei Tagen stiegen die Spiegel langsam an. Pavian 14 und 19 zeigten ab dem 3. Tag einen leichten Abfall von C4 und ab dem 5. Tag auch ein Absinken von C3.

Komplementfaktoren	C3 (g/l)	C4 (g/l)
vor IA	1,06 ± 0,19	0,22 ± 0,06
nach IA	0,5 ± 0,05	0,09 ± 0,01
nach 30' Reperfusion	0,36 ± 0,03	0,08 ± 0,01

Tab. 4.9.: Intraoperativer Verlauf der Komplementspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen).

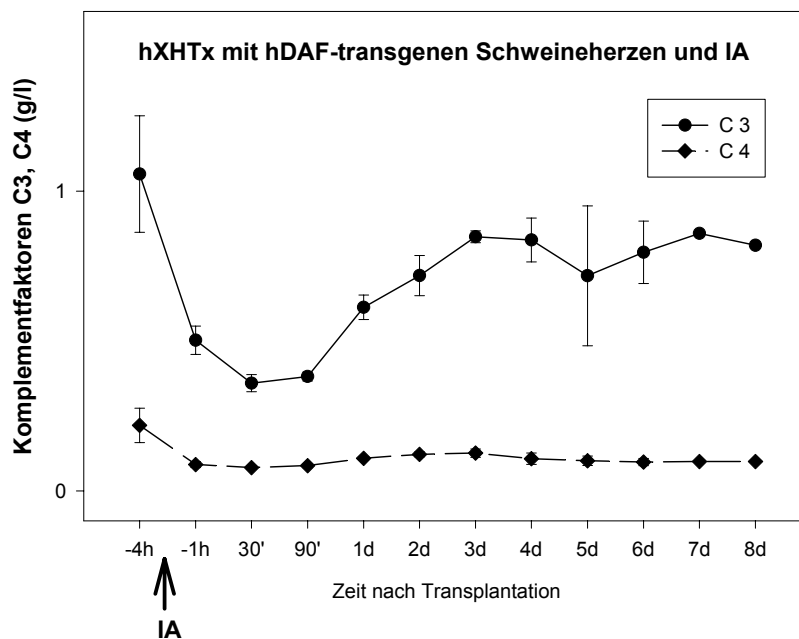


Abb. 4.31.: Verlauf der Komplementspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen).

Am erstem postoperativen Tag kam es zu einem operationsbedingten Anstieg der Kreatinkinase-MB Masse. Danach fielen die Werte wieder und zeigten zum Zeitpunkt der Abstoßungsreaktion bei einem Teil der Tiere einen mäßigen bis starken Anstieg.

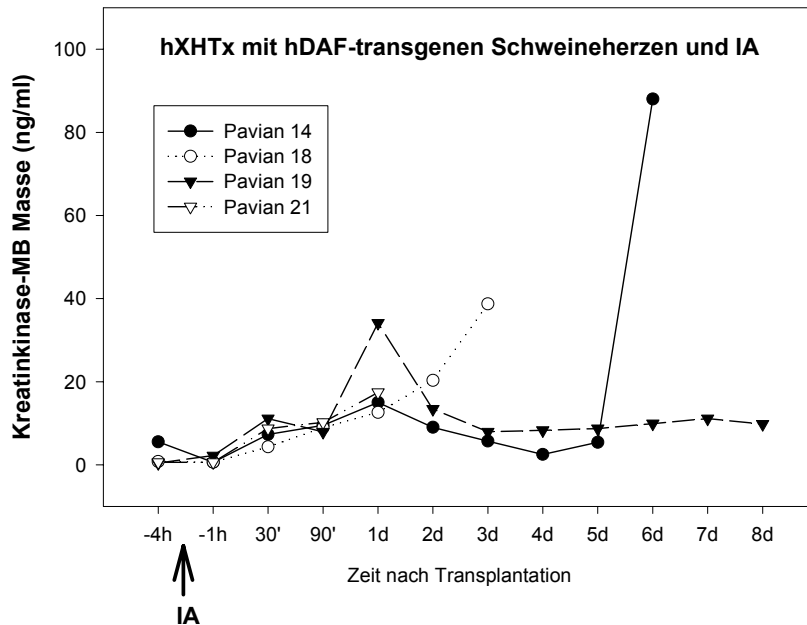


Abb. 4.32.: Verlauf der Kreatinkinase-MB Masse bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen).

Die Leukozyten wurden durch die IA von  $9,3 \pm 1,7$  G/l auf  $6,2 \pm 2,1$  G/l reduziert und fielen 30 Min. nach der Implantation des Spenderherzens auf  $5,1 \pm 1,1$  G/l. Sie stiegen am 1. postoperativen Tag auf einen Maximalwert von  $13,2 \pm 2,1$  G/l an. Durch die Immunsuppression fielen sie in den folgenden Tagen wieder auf sehr niedrige Werte.

Der Hämatokrit fiel durch die IA von  $38,8 \pm 2,4$  % auf  $27,9 \pm 5,1$  % und betrug 90 Min. nach der Transplantation  $28 \pm 5,9$  %. Der Hämatokrit blieb in den folgenden Tagen stabil bei Werten um 30 %.

Die Thrombozyten fielen durch die IA von  $230,8 \pm 54,9$  G/l auf  $150 \pm 17,2$  G/l. Sie sanken 90 Minuten nach der Transplantation auf  $137,3 \pm 23,8$  G/l und erreichten am 3. postoperativen Tag ein Minimum von  $64,3 \pm 13,2$  G/l, stiegen aber in den folgenden Tagen bei Pavian 14 und 19 wieder an.

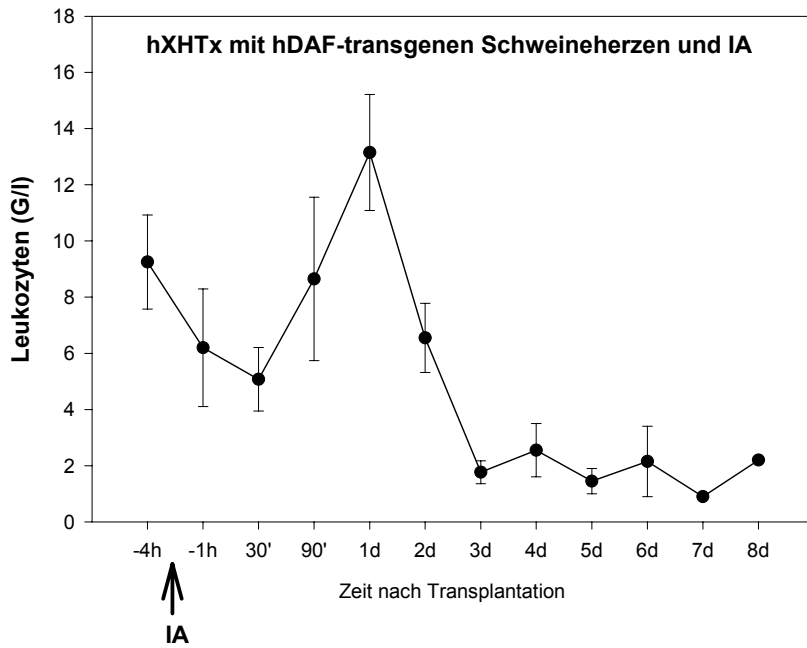


Abb. 4.33.: Verlauf der Leukozytenzahl bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen).

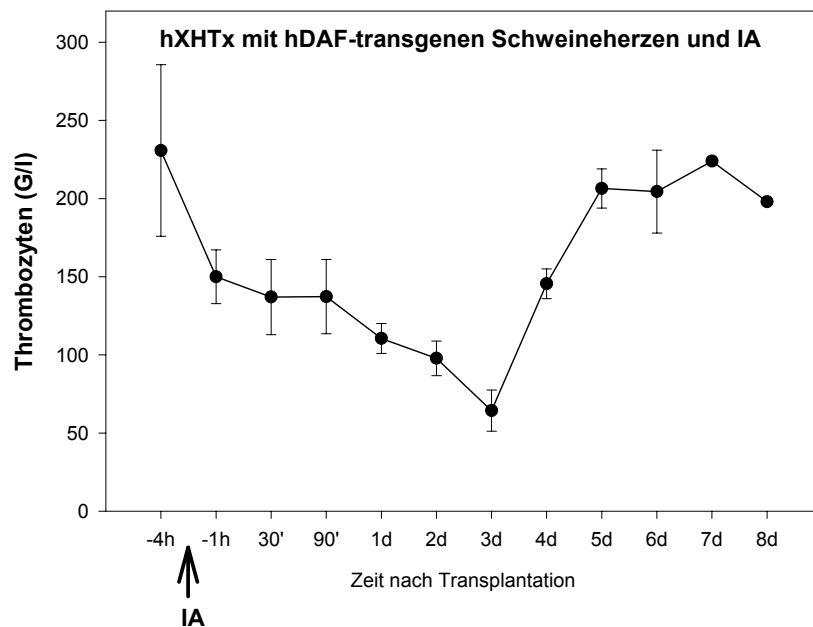


Abb. 4.34.: Verlauf der Thrombozytenzahl bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen).

### 4.3.5. Langzeitstudien: oXHTx

Es wurden 4 orthotope Transplantationen mit Landrasseschweineherzen und IA für Langzeitstudien vorgenommen. Die IA wurde hier vor dem Beginn der Operation durchgeführt. Die Tiere überlebten durchschnittlich  $0,9 \pm 0,2$  Tage ohne Abstoßungsreaktion. Der Anti-Pig-Antikörpertiter betrug vor der IA durchschnittlich  $1:704 \pm 1:192$  und nach 13  $\pm$  1 Zyklen IA  $1:34 \pm 1:23$ . 30 Min. nach der Implantation des Spenderherzens sank der Titer auf  $1:4,5 \pm 1:2$ .

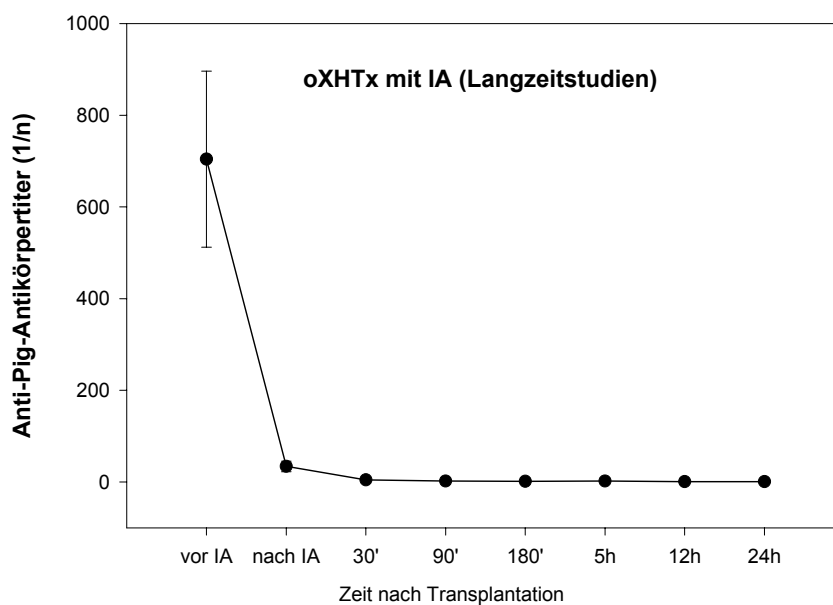


Abb. 4.35.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei den Langzeitstudien mit Pavianen (oXHTx mit IA).

Bei Ausgangswerten von  $9,68 \pm 0,91$  g/l (IgG),  $0,73 \pm 0,26$  g/l (IgM) und  $0,7 \pm 0,16$  g/l (IgA) wurde der IgG-Spiegel durch die IA um 97 %, der IgM-Spiegel um 89 % und der IgA-Spiegel um 86 % gesenkt. 30 Minuten nach erfolgter Transplantation war der IgG-Spiegel wieder leicht angestiegen (von  $0,25 \pm 0,05$  g/l nach IA auf  $0,3 \pm 0,1$  g/l), wohingegen IgM weiter absank (von  $0,08 \pm 0,05$  g/l nach IA auf  $0,05 \pm 0,03$  g/l) und der IgA-Spiegel konstant bei  $0,1 \pm 0,07$  g/l blieb. Nach 12-24 Stunden zeigte sich ein IgG-Anstieg auf 0,5 bis 1,2 g/l.



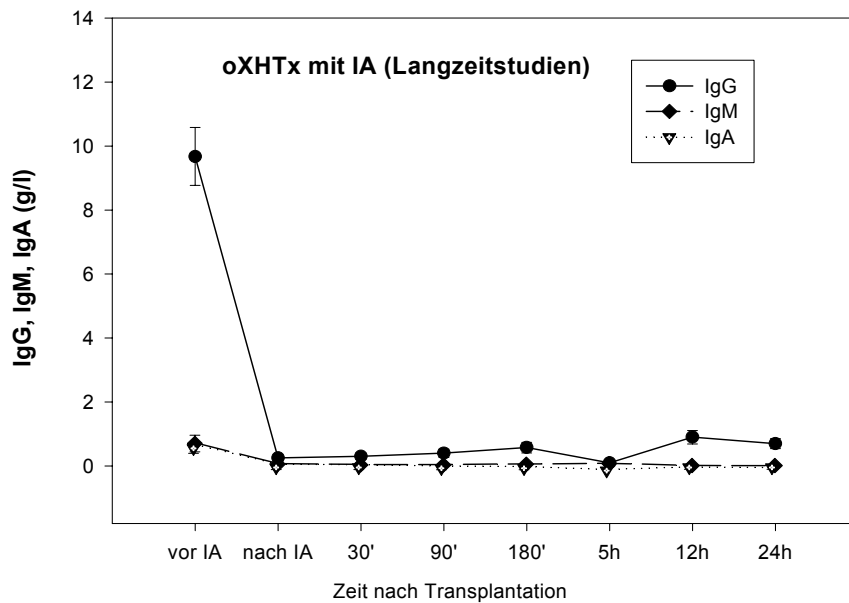


Abb. 4.36.: Verlauf der Immunglobulinspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (oXHTx mit IA).

Der Komplementfaktor C3 wurde durch die IA um 62 % reduziert und der Komplementfaktor C4 um 63 %. Die Ausgangswerte waren hierbei  $0,82 \pm 0,09$  g/l bei C3 und  $0,19 \pm 0,01$  g/l bei C4. 30 Min. nach der Transplantation waren C3 und C4 noch einmal leicht abgesunken (von  $0,31 \pm 0,05$  g/l nach IA auf  $0,18 \pm 0$  g/l bzw. von  $0,07 \pm 0,01$  g/l nach IA auf  $0,06 \pm 0$  g/l). Im weiteren Verlauf blieben die Spiegel konstant.

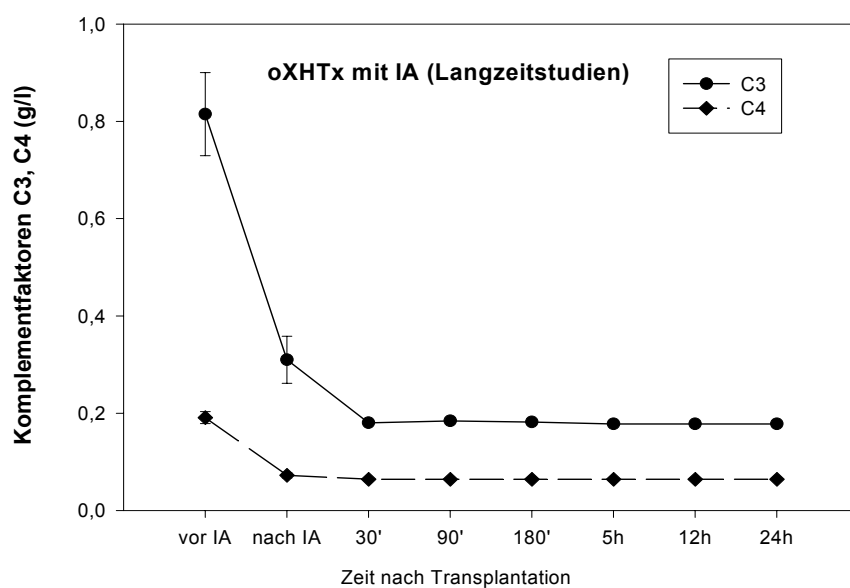


Abb. 4.37.: Verlauf der Komplementspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (oXHTx mit IA).

Bei den oXHTx mit IA stieg die CK-MB Masse von normalen präoperativen Werten nach 180 Min. auf ein Maximum ( $81,2 \pm 17$  ng/ml). Im weiteren Verlauf war ein Absinken der Werte auf zuletzt 12,6 bis 23 ng/ml nach 24 h zu beobachten.

Die Leukozyten sanken durch die IA von  $9,7 \pm 2,5$  G/l auf  $3,9 \pm 1,9$  G/l. Nach 30 Min. Reperfusionzeit betragen die Leukozyten  $7,2 \pm 0,6$  G/l. Nach 180 Min. erreichte die Leukozytenzahl ein Maximum ( $14 \pm 3,1$  G/l).

Hämatokrit und Thrombozyten wurden sowohl durch die IA als auch durch die extrakorporale Zirkulation reduziert. Der Hämatokrit fiel von initial  $33,5 \pm 3,2$  % auf  $27,7 \pm 2,2$  % nach IA und auf  $26,4 \pm 1,7$  % 90 Min. nach der Implantation des Spenderherzens. Die Thrombozytenzahlen fielen von  $304,2 \pm 12$  G/l auf  $161,8 \pm 16,5$  G/l nach IA und auf  $56 \pm 15,7$  G/l nach 90 Min.

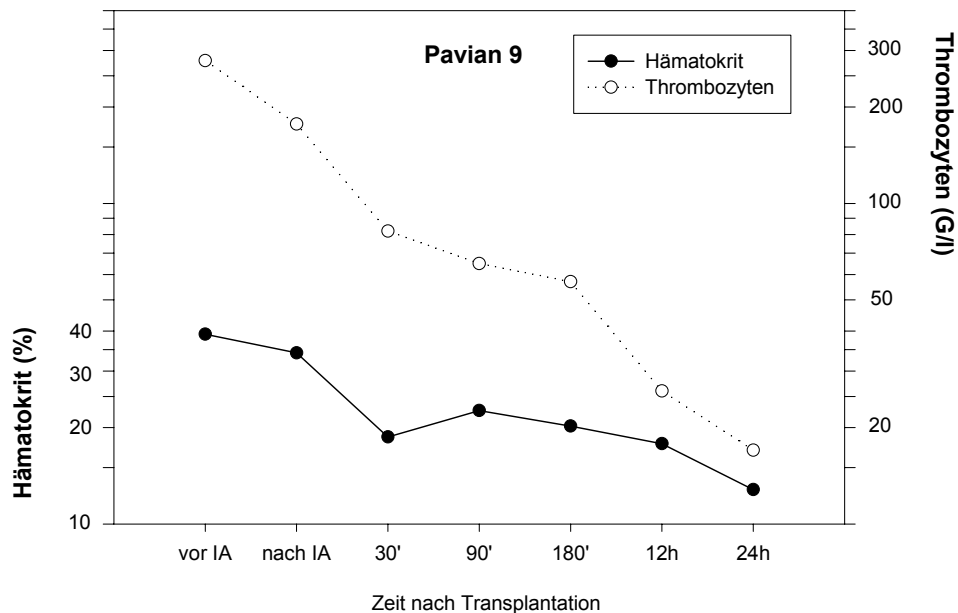


Abb. 4.38.: Verlauf von Hämatokrit und Thrombozyten am Beispiel von Pavian 9 (oXHTx mit IA, Langzeitstudie).

## 5. Diskussion

### 5.1. Klinische Erfahrungen mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption

Die Immunadsorption wurde zunächst für die klinische Anwendung bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen entwickelt. Die Bildung und Wirkung der Autoantikörper, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Krankheitsbilder ursächlich mitverantwortlich sind, kann zum Teil nur unzureichend medikamentös beeinflusst werden.

Bereits seit den fünfziger Jahren wird bei Autoimmunkrankheiten zur Entfernung von Antikörpern aus dem Blut die Plasmapherese angewendet, bei der unter Erhalt der zellulären Blutbestandteile das Plasma des Patienten entfernt wird. Eine ausreichende Elimination pathogener Substanzen ist jedoch oft nicht gewährleistet, da immer nur ein Teil des Plasmas entfernt werden kann. Zusätzlich müssen Plasmaproteine und Gerinnungsfaktoren substituiert werden, wodurch es zu allergischen Reaktionen auf humane Ersatzlösungen kommen kann und das Risiko einer Übertragung von Virusinfektionen besteht. Zudem können damit dem Patienten neue Antikörper zugeführt werden. Durch die Immunadsorption können dagegen die Antikörper bzw. Immunglobuline selektiv aus dem Blut eliminiert werden, ohne dass es zum Verlust anderer Plasmabestandteile kommt.

In der Vergangenheit wurden mit Hilfe verschiedener Immunadsorptionstechniken bei einem großen Spektrum von Autoimmunkrankheiten bereits Therapievorsuche unternommen. Dazu gehören der systemische Lupus erythematoses (69), Vaskulitiden (190, 191), idiopathische thrombozytopenische Purpura, erworbene Hämophilien (103), Myasthenia gravis, Guillain-Barré-Syndrom (12) und Formen der dilatativen Kardiomyopathie (64, 214). Auch bei hochsensibilisierten, mehrfach nierentransplantierten Patienten (63) oder nach blutgruppenungleicher Knochenmarkstransplantation (103) kam die Immunadsorption bereits zum Einsatz. Es wurden verschiedene Adsorbertechnologien entwickelt, die sich sowohl durch ihre Effizienz als auch im Spektrum ihrer Nebenwirkungen unterscheiden.

Die erste Generation von Adsorbentien stellen semispezifische Verfahren zur Bindung von bestimmten Autoantikörpern und anderen Blutbestandteilen dar (Dextransulfat-modifizierte Cellulose und Polyvinyl-Alkohol-Gele). Dextransulfat bindet Low Density Lipoproteine (LDL), Antithrombin III, den Komplementfaktor C3a sowie DNA und Anti-DNA-Antikörper (190). Das macht die Anwendung des Systems vor allem beim systemischen Lupus erythematoses sinnvoll. Eine weitere semiselektive Methode ist die Immunadsorption mittels an Polyvinyl-Alkohol-Gele gebundener Tryptophan- oder Phenylalaninreste (IMTR-350 und IMPH-350, Asahi, Tokyo, Japan). Mit diesem Adsorbent können bestimmte Autoantikörper

und zirkulierende Immunkomplexe entfernt werden, wobei die Tryptophan-Liganden eine höhere Affinität zu IgG zeigen.

Nachteile dieser semispezifischen Verfahren sind die teils unvollständige Adsorption der Antikörper, die unspezifische Eliminierung weiterer Plasmaproteine, vor allem der des Gerinnungssystems (190) und eine mögliche Komplementaktivierung (69). Auch wurde über allergische Reaktionen auf Dextransulfat berichtet (146). Die Säulen sind nicht regenerierbar und können nur begrenzt mit Plasma beladen werden, da es sonst zu einer Elution pathogener Substanzen aus der Säule kommt (206).

Als zweite Adsorbergeneration kamen Trägermaterialien auf dem Markt, an welche Protein A, ein Bestandteil der Zellwand von Staphylokokken, immobilisiert ist. Protein A reagiert nichtimmunologisch mit Immunglobulinen. Die IgG-Subklassen 1, 2 und 4 werden relativ spezifisch gebunden, jedoch besteht eine nur schwache bzw. keine Bindungsfähigkeit für IgG 3, IgM und IgA. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass Protein A selbst eine immunologisch aktive Substanz ist, die, falls sie in den Blutkreislauf gelangt, anaphylaktoide Reaktionen auslösen kann. Diese Komplikation trat bei Säulen auf, die an Kieselgel gebundenes Protein A (Prosorba®, Imré, Seattle, USA) enthielten (69). Deshalb wurde eine Adsorptionssäule mit Sepharose-gebundenem Protein A entwickelt (Immunosorba®, Excorim, Lund, Schweden), die eine Protein A-Leakage von < 1 ng/ml Plasma aufweist. Diese Säulen sind bei wesentlich höherer Kapazität zudem mehrmals verwendbar. Es werden für eine Behandlung jeweils zwei Säulen eingesetzt, die abwechselnd beladen und regeneriert werden. Das ermöglicht zusammen mit der hohen Bindungskapazität von 1,25 bis 1,5 g IgG pro Säule die Behandlung unbegrenzter Plasmavolumina (190). Allerdings wird eine breite Anwendung dadurch verhindert, dass kein IgG 3 gebunden wird. Darüber hinaus besteht die Gefahr der Komplementaktivierung durch die Bindung von Antikörpern an Protein A (132).

Wieder verwendbare Protein A-Säulen wurden erfolgreich zur Vermeidung einer hyperakuten Abstoßung vor erneuter Nierentransplantation bereits mehrfach transplantierte Empfänger mit Anti-HLA-Antikörpern eingesetzt (150) sowie zur Behandlung einer akuten humoralen Abstoßung (AHR) nach Nierentransplantation. Die AHR war in 9 von 10 Fällen reversibel und die Transplantatüberlebensrate betrug nach 14 Monaten 80 % (17). Da in der IgG-Subklasse 3 ein Teil der Anti-HLA-Antikörper repräsentiert ist, wurde eine Säule mit Staphylokokken-Protein G (Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden) entwickelt, die einen höheren Anteil von IgG 3 adsorbiert (14).

Die antikörperbasierte Immunadsorption mit Ig-Therasorb®-Säulen (Baxter Therasorb Medizinische Systeme GmbH, Unterschleißheim) stellt die dritte Generation von

Adsorbentechnologien dar. Durch die immunologisch spezifische Bindung von humanen Immunglobulinen können alle IgG-Klassen, IgA und IgM eliminiert werden, aber auch Komplementfaktoren, Immunglobulinfragmente und zirkulierende Immunkomplexe (107).

Die Verträglichkeit der Behandlung auch über Jahre hinweg wurde bereits durch die positiven Erfahrungen mit der LDL-Apherese bewiesen. Seit 1981 wird eine antikörperbasierte Adsorptionssäule für LDL (LDL-Therasorb<sup>®</sup>, Baxter, Unterschleißheim) bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie zur Langzeitbehandlung bei Versagen medikamentöser Therapien eingesetzt (66, 200, 214).

Die Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption wird beim Patienten mit zwei wieder verwendbaren Adsorptionssäulen im Wechsel durchgeführt. Über einen großlumigen Zugang wird aus der Kubitalvene Blut entnommen und in einem Plasmafilter separiert. Die Antikoagulation wird systemisch (intravenös) oder lokal verabreicht, indem die gerinnungshemmenden Medikamente in den vom Patienten wegführenden Schenkel des Schlauchsystems injiziert und evtl. im zuführenden Schenkel antagonisiert werden. Üblicherweise erfolgt die Antikoagulation mit 1000-2000 I.E. Heparin pro Stunde und 0,15-molarer Citratdextrose in einem Volumenverhältnis von 1:20 (187).

Bei allen bisherigen klinischen Studien kam es zu keinen oder nur zu leichten Begleiterscheinungen oder Nebenwirkungen. Die Laborparameter wurden außer einem temporären moderaten Leukozytenanstieg und einem leichten Thrombozytenabfall (171) nicht wesentlich beeinflusst. Plasmaproteine und Gerinnungsfaktoren wurden nicht adsorbiert (206, 207). Teilweise kam es zu einer leichten Komplementaktivierung, vermutlich durch die extrakorporale Zirkulation bedingt (171). Nach jahrelanger Behandlung konnte bei einem Teil der Patienten das Auftreten von Antikörpern gegen Schafimmunglobuline nachgewiesen werden. Diese Anti-Schaf-Titer stiegen jedoch im Verlauf des ersten Behandlungsjahres nur leicht an und fielen durch die Immunadsorption wieder auf ihren Ausgangswert ab, so dass es zu keinerlei allergischen Reaktionen kam. Immunologische Sensibilisierungen gegen andere Anteile der Therasorb<sup>®</sup>-Säulen sind nicht bekannt (66).

Allerdings bringt die Behandlung mittels extrakorporaler Zirkulation auch bei der Immunadsorption Risiken für den Patienten mit sich. Es besteht die Gefahr von Blutverlusten, vagovasalen Reaktionen oder Nebenwirkungen durch die Antikoagulation. Insgesamt traten diese Nebenwirkungen jedoch selten auf und waren eher unbedeutend. Vereinzelt wurde über Hypotension unter der Behandlung berichtet, die durch Volumensubstitution ausgeglichen werden konnte. Es kann auch bei einer Antikoagulation mit Citrat zur Hypokalzämie mit Parästhesien kommen, welche aber durch orale Calcium-Gabe schnell zu beheben sind.

Andere Nebenwirkungen einer Immunadsorptionsbehandlung mit Ig-Therasorb<sup>®</sup> wurden in den bisherigen klinischen Studien nicht beobachtet (107, 207).

Die Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen können über einen Zeitraum von bis zu drei Jahren für ca. 40-100 Behandlungen beim gleichen Patienten wieder verwendet werden. Trotz mehrmaliger Verwendung konnte bei sachgerechter Lagerung unter sterilen Bedingungen bisher keine Besiedelung der Säulen mit Keimen nachgewiesen werden, so dass in dieser Hinsicht kein Infektionsrisiko für den Patienten besteht (171, 208). Die Kosten für ein Säulenpaar sind zwar sehr hoch, sie können aber so oft wieder verwendet werden, dass eine Behandlung mit nicht wieder verwendbaren Säulen vergleichsweise wesentlich kostenintensiver ist. Die Behandlung ist auch wesentlich günstiger als z.B. eine Therapie mit Faktor VIII-Präparaten bei erworbener Hemmkörperhämophilie (103).

Für eine ausreichende Reduktion der Antikörperspiegel des Patienten ist die Behandlung von etwa 1,5-2 Plasmavolumina (d.h. 6–7 l) pro Sitzung notwendig, was einer Behandlungsdauer von 3-4 Stunden entspricht. Nach einer Therapiesitzung kann der IgG- Spiegel um ca. 70 % gesenkt werden. IgM und IgA, die in geringeren Konzentrationen vorhanden sind, werden um über 50 % gesenkt. Innerhalb von einigen Tagen ist eine ein- bis zweimalige Wiederholung der Behandlung notwendig, da es nach 24 Stunden durch die Diffusion von Immunglobulinen aus dem Gewebe wieder zu einem leichten Anstieg des Spiegels kommt. Nach insgesamt drei Behandlungen wird eine Reduktion von IgG um 90 % sowie von IgM und IgA um 75 % erreicht. Der Spiegel steigt unter immunsuppressiver Therapie nur langsam an, so dass die nächste Behandlung erst nach einigen Wochen erforderlich ist (208). Der Ausgangswert stellt sich etwa 4-6 Wochen nach der letzten Behandlung ein (207).

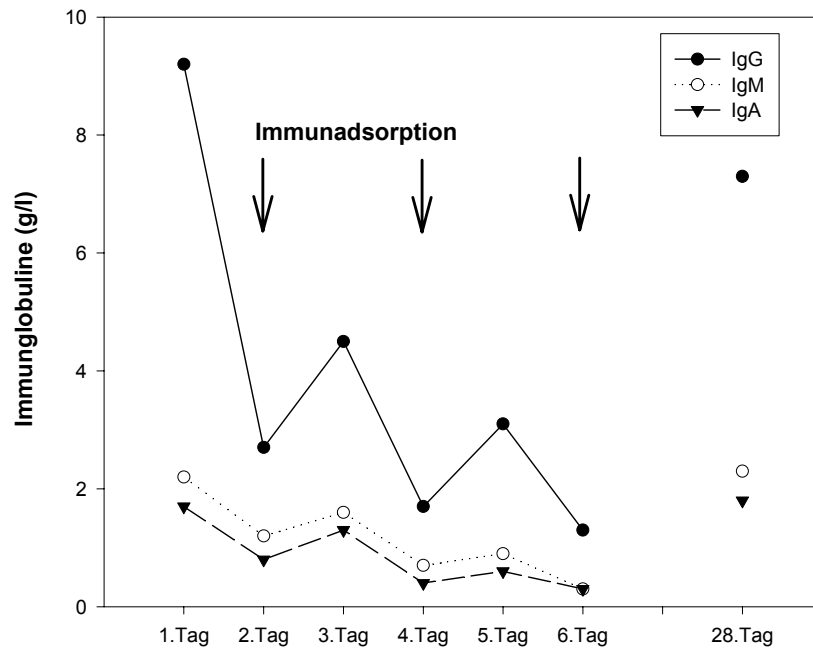


Abb. 5.1.: Verlauf der Immunglobulinspiegel während mehrerer Immunadsorptionsbehandlungen bei einem Patienten. Der Ausgangswert wird nach ca. 4 Wochen wieder erreicht. [Toepfer M, et al. Fortschr Med. 1999;117:1-5. (208)]

Eine zusätzliche Hemmung der Antikörperproduktion bzw. eine Potenzierung des Effektes der Immunadsorption kann durch passiv gegebene Immunglobuline oder Immunsuppressiva erreicht werden. Da sich die B-Zellen nach Entfernung der Immunglobuline in einer vulnerablen Synthesephase befinden, ist für eine immunsuppressive Therapie in dieser Zeit eine erhöhte Wirksamkeit zu erwarten (12). Durch die Gabe von Immunglobulinpräparaten kommt es zu einem negativen Rückkopplungseffekt auf die Neusyntheserate und so zu einer Immunmodulation (132). Nach längerer Behandlungsdauer kann die Frequenz der Immunadsorptionssitzungen gesenkt werden, da im Laufe der Zeit offenbar die Antikörperproduktion nachlässt (61, 146).

Die Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption wurde unter anderem bei hämatologischen Autoimmunerkrankungen wie erworbener Hemmkörperhämophilie und Immunthrombozytopenie sowie beim Auftreten von Antikörpern nach Bluttransfusionen oder blutgruppenungleicher Knochenmarktransplantation erfolgreich eingesetzt. Nach 3-4 Behandlungen konnten die Auto- oder Alloantikörper eliminiert werden (103, 171). Bei Patienten mit Myasthenia gravis und Guillain-Barré-Syndrom wurde in 70-80 % eine Verbesserung der Symptomatik, insbesondere eine Entwöhnung vom Respirator und die

Wiederherstellung der selbständigen Atmung erreicht (12). Nach einem Behandlungszyklus verbesserte sich bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Anti- $\beta$ -Adrenoceptor-Autoantikörpern in 7 von 8 Fällen die Herzleistung um mindestens eine Stufe in der NYHA-Klassifizierung (64, 214). Die Therapie mit der Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption bei systemischem Lupus erythematodes zeigte in einer kontrollierten klinischen Studie auch langfristige Erfolge (81).

Bei mehrfach nierentransplantierten, hochsensibilisierten Patienten mit hohen Titern zytotoxischer Antikörper gegen HLA-Antigene konnte durch Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption eine suffiziente Transplantatfunktion aufrechterhalten werden, die mit dem Verlauf bei Ersttransplantierten ohne HLA-Antikörper vergleichbar ist. Dabei wurde in der initial kritischen Phase kurz nach der Transplantation mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen behandelt sowie in der nachfolgenden Zeit durch wiederholte Immunadsorptionsbehandlungen eine kontinuierliche Depletion des Antikörpertiters erreicht (61, 63).

Bisher gab es keine Berichte über ein wesentlich erhöhtes Infektionsrisiko für Patienten nach Immunadsorption, da die Infektabwehr des Immunsystems wohl weniger von den präformierten Antikörpern abhängt, die im Blut vorhanden sind, sondern eher von der monoklonalen Antikörper-Neuproduktion nach Antigenkontakt (208).

Leider gibt es zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund der kleinen Fallzahlen und der fraglichen ethischen Vertretbarkeit nur wenige kontrollierte klinische Studien zur Immunadsorption.

## **5.2. Immunadsorption im Xenotransplantationsmodell**

Bei Menschen, Primaten und Altweltaffen sind hauptsächlich IgM-Antikörper für eine hyperakute Abstoßung xenogener Transplantate verantwortlich. In dieser Immunglobulinklasse sind die meisten xenoreaktiven Antikörper repräsentiert (18, 136, 163). Die AVR wird dagegen vor allem durch IgG-, aber auch durch IgM-Antikörper ausgelöst (23, 80, 119).

Bei Xenotransplantationen wurden bereits verschiedene Verfahren zur selektiven Entfernung von xenoreaktiven Antikörpern oder Immunglobulinen getestet. Zur Elimination des gesamten Empfänger-Immunglobulins wurden die Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption und die Staphylokokken-Protein A-Adsorption erprobt. Außerdem wurde ein extrakorporales Verfahren zur selektiven Entfernung von Anti- $\alpha$ Gal-Antikörpern entwickelt.

Durch die fehlende oder verminderte Adsorption von IgM und IgG 3 ist die Anwendbarkeit von Protein A-Säulen bei Xenotransplantationen limitiert. Die Reduktion xenoreaktiver IgM-Antikörper durch diese Säulen ist wahrscheinlich nicht ausreichend, um eine HAR zu



verhindern. In einer Studie mit 22 Patienten von Ramos et al. (169) wurde nach drei Behandlungen mit Protein A-Säulen eine Reduktion von xenoreaktivem IgG um 75 % und von xenoreaktivem IgM um nur 48 % erzielt. Die Zytotoxizität des Serums behandelter Patienten gegen PK15-Zellen (*pig kidney*-Zelllinie) sank nach drei Sitzungen von 58 % auf 39 %.

Im Xenotransplantationsmodell bietet die Behandlung mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen durch die hohe Adsorptionsrate von IgM Vorteile gegenüber Staphylokokken-Protein A-Säulen. Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen eliminierten im *ex vivo*-Modell effektiv xenoreaktive Antikörper (47 % Reduktion von Anti-Pig-IgG und 69,4 % Reduktion von Anti-Pig-IgM) ohne signifikante Verringerung von Gerinnungsfaktoren und Plasmaproteinen (112). Vorstudien unserer Arbeitsgruppe (19, 21) zur *ex vivo*-Perfusion von Schweineherzen mit humanem Vollblut bestätigten diese Ergebnisse. Die Behandlung des Humanblutes (500 ml) mit zwei Zyklen IA vor der Perfusion durch ein unmodifiziertes Schweineherz führte zu einer Reduktion von IgG um 84 %, von IgM um 83 % und von IgA um 76 % sowie zu einer Absenkung der Komplementfaktoren C3 und C4 um über 50 %. Die Anti-Pig-Antikörpertiter sanken von 1:160 auf 1:24. Die Überlebenszeit der perfundierten Herzen war nach vorheriger Behandlung des Plasmas mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption signifikant verlängert.

Ein Rebound-Phänomen (d.h. eine überschießende Neuproduktion der Antikörper) wurde nach Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorptionsbehandlungen im *in vivo*-Xenotransplantationsmodell bisher nicht beobachtet. Lin et al. (124) beschrieben bei immunsupprimierten Pavianen nach einer Behandlung mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen und einer Reduktion von IgG und IgM um über 90 % und von IgA um über 70% einen langsamen Wiederanstieg der Immunglobuline, aber keinen Rebound (120, 124). Nach der Behandlung von 3-5 Plasmavolumina stiegen die IgG-Spiegel innerhalb von 24 Stunden auf 50 % und die IgM-Spiegel auf 38 % des Ausgangswertes an. Nach zwei Tagen erreichte IgG 60 % und IgM 50 % des Ausgangswertes. In den folgenden Tagen blieben die Immunglobulinspiegel konstant. In den klinischen Studien mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption wurde auch bei Patienten bislang nicht von einem Rebound von IgG, IgM oder IgA nach Aussetzen der Behandlungen berichtet, auch ohne immunsuppressive Therapie (171, 208). Es kam auch hier lediglich zu einem langsamen Wiederanstieg auf die Ausgangswerte innerhalb von mehreren Tagen.

Im Xenotransplantationsmodell konnte mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption eine HAR vermieden werden. Einer AVR konnte mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Behandlungen ebenfalls vorgebeugt werden. Dafür waren Behandlungen maximal alle 48 Stunden ausreichend (120, 124).

Um IgM alleine aus dem Blut zu entfernen, entwickelten Leventhal et al. (120) eine antikörperbasierte Adsorptionssäule, die selektiv IgM bindet. Damit wurde *in vitro* eine 83-84-%ige Reduktion von IgM in humanem und in Pavianplasma erreicht. Die Säule wurde aber nicht bei Xenotransplantationen eingesetzt, da xenoreaktive IgG-Antikörper mit dieser Säule nicht oder nur durch zusätzliche Maßnahmen entfernt werden können.

1987 erreichten Bannett et al. (11) durch die selektive Adsorption von Anti A- oder Anti B-Antikörpern bei AB0-inkompatiblen Empfängern von allogenen Nierentransplantaten eine Akkomodation. Sie verwendeten dazu eine Säule, die das entsprechende A- oder B-Trisaccharid enthielt. Analog zu diesem Modell entwickelte man für Xenotransplantationen Adsorptionssäulen, die mittels inert gebundener  $\alpha$ Gal-Di- oder -Trisaccharide spezifisch Anti- $\alpha$ Gal-Antikörper adsorbieren (108, 109, 172, 204), welche den Hauptanteil xenoreaktiver Antikörper ausmachen (38, 85).

In Arbeiten von Taniguchi et al. (204) und Lambrigts et al. (116) wurde nach der selektiven Entfernung von  $\alpha$ 1-3Gal-Antikörpern mit  $\alpha$ Gal-Säulen von einer Reduktion von Anti- $\alpha$ Gal-IgM um 96 % und von Anti- $\alpha$ Gal-IgG um 95 % berichtet. Kozlowski et al. (108, 109) senkten bei immunsupprimierten Pavianen mit einer Behandlung  $\alpha$ Gal-Immunsorption Anti- $\alpha$ Gal-IgM und -IgG auf 0-19 % des Ausgangswertes. Durch weitere Behandlungen konnten niedrige Antikörperspiegel aufrechterhalten werden. Es wurde jedoch teilweise ein starker Rebound dieser Antikörper und auch des gesamten Immunglobulins beobachtet, vor allem, wenn keine gleichzeitige immunsuppressive Therapie erfolgte (109, 116). Mit IS konnte die Rückkehr der Antikörper verzögert werden. Anti- $\alpha$ Gal-IgM erreichte den Ausgangswert nach vier statt nach zwei Tagen und Anti- $\alpha$ Gal-IgG blieb auf niedrigem Niveau. Durch Behandlungen zu späteren Zeitpunkten konnten die Antikörperspiegel weiter gesenkt werden. Es wurde aber keine totale Suppression der Antikörperneubildung erreicht, auch ohne eine Sensibilisierung des Immunsystems durch Schweinegewebe.

Die Entfernung von Anti- $\alpha$ Gal-Antikörpern alleine verhindert eine HAR (221). Es kommt aber ohne IS nach Kontakt mit dem Transplantat zu einer starken reaktiven Überproduktion von Antikörpern (116, 204). Als Nebenwirkungen der Behandlung wurden eine Absenkung der Gerinnungsfaktoren V und VIII um 40-60 % und Hypotension beschrieben (109).

Wahrscheinlich erbringt eine Elimination aller xenoreaktiven Antikörper, auch nicht  $\alpha$ Gal-spezifischer, langfristig bessere Resultate als die Entfernung von  $\alpha$ 1-3Gal-Antikörpern alleine. Es ist noch nicht klar, wie groß die Zahl verschiedener Epitope ist, die eine HAR von Xenotransplantaten triggern können. In jüngerer Zeit wurden bei  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase-*knock out*-Mäusen eine Reihe weiterer Epitope identifiziert, die xenoreaktive Antikörper

binden. Dazu gehören das Forssman-Antigen, Gal $\alpha$ 1-3Le(x), Hanganutziu-Deicher und Tn (36, 196). Insbesondere die HAR von Schweinelungen scheint durch polyreaktive Antikörper vermittelt zu werden. Bei hMCP-transgenen Schweinelungen kam es trotz Gal $\alpha$ 1-3Gal-Antikörperdepletion zu einem Funktionsverlust nach 3 Stunden (76, 84). Werden lediglich  $\alpha$ 1-3Gal-Antikörper depletiert, so könnte es bei langzeitüberlebenden Empfängern zu einer vermehrten Produktion anderer Antikörper kommen.

Bei der postoperativen Entfernung aller Immunglobuline nach einer Xenotransplantation könnte zudem die Dissoziation niedrigaffiner Antikörper vom Transplantat durch eine Umverteilung in die Blutstrombahn stattfinden und die Immunadsorption könnte so zur Vermeidung einer Myokardschädigung beitragen (120).

Die Reduktion von Komplement durch die IA mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen hat ebenfalls positive Effekte, da die Aktivierung des Komplementsystems eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer HAR spielt (56, 185). So waren nach xenogener Perfusion von Schweinelebern durch Pascher et al. (154, 155) die Komplementaktivierung im Empfängerblut und die vaskulären Antikörper- und Komplementablagerungen im Transplantat wesentlich geringer, nachdem das verwendete Humanblut zuvor mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption behandelt worden war.

Aufgrund der langjährigen klinischen Erfahrungen ist davon auszugehen, dass es auch im Xenotransplantationsmodell möglich ist, bei einer Langzeitbehandlung mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Säulen zusammen mit medikamentöser Immunsuppression durch die wiederholte Entfernung des gesamten Immunglobulins eine Supprimierung der Produktion xenoreaktiver Antikörper durch negative Rückkopplungseffekte zu erreichen.

### **5.3. Diskussion der Ergebnisse**

*Präoperative Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorptionsbehandlungen.* Durch die IA konnten die Immunglobuline effizient depletiert werden (um 80-90 %) und eine über 50-%ige Reduktion der Komplementfaktoren C3 und C4 erreicht werden. Die Behandlung mit zwei Zyklen IA, entsprechend 0,5-1 Plasmavolumina bei Pavianen, resultierte in einer Reduktion des Anti-Pig-Antikörpertiters um ein bis zwei Titerstufen. Da es sich beim Anti-Pig-Antikörpertest um eine geometrische Verdünnungsreihe handelt, kann man davon ausgehen, dass die Erniedrigung des Titers um eine Stufe einer Halbierung der Antikörperkonzentration im Vergleich zur vorherigen Stufe entspricht.

Wir untersuchten in den Vorstudien, in welchem Maße die IA die Anti-Pig-Antikörpertiter *in vivo* beeinflusst, um in den Langzeitstudien anhand des präoperativen Anti-Pig-Antikörpertiters voraussagen zu können, wie hoch die Zahl der benötigten Zyklen zum

Erreichen des Zielwertes ist. Als Grenzwert zur Vermeidung einer HAR hatten wir in den Vorstudien einen Titer von < 1:64 ermittelt. Da die Anzahl der Zyklen auch vom Gewicht des Primaten und von den technischen Gegebenheiten wie der Größe und Art des Zuganges und dem Ausmaß des Shuntflusses in der punktierten Vene abhängig ist, da für die Behandlung immer nur ein einzelner intravenöser Zugang mit zwei Lumina verwendet wurde, kann nicht immer exakt die benötigte Zyklenzahl angegeben werden.

Antikörpertiter	Endwert						
	Ausgangswert	1:128	1:64	1:32	1:16	1:8	1:4
1:2048	8-10	10-14	10-14	14	14+	14+	
1:1024	4-8	8-10	10-14	10-14	14	14+	
1:512	4	4-8	8-10	10-14	10-14	14	
1:256	2	4	4-8	8-10	10-14	10-14	
1:128		2	4	4-8	8-10	10-14	
1:64			2	4	4-8	8-10	
1:32				2	4	4-8	
1:16					2	4	
1:8						2	
	Zyklen IA						

Tab. 5.1.: Reduktion des Anti-Pig-Antikörpertiters im Verhältnis zur Zyklenzahl bei Pavianen mit einem Gewicht von 15-25 kg.

Bei IgM, das bei der HAR eine große Rolle spielt, ist die Reduktion von Spiegeln über 1,0 g/l auf Werte oberhalb von 0,1 g/l mit nur wenigen Zyklen möglich. Jedoch ist die Zahl der benötigten Zyklen vergleichsweise sehr hoch, wenn man den Spiegel von 1,0 g/l auf 0,01 g/l senken will. Eine Reduktion auf 0,01 g/l konnte nur bei Tieren mit niedrigen Ausgangsspiegeln (0,3 bis 0,7 g/l) erreicht werden.

IgM (g/l)	Endwert			
	0,3	0,2	0,1	0,01
<b>Ausgangswert</b>				
<b>1,5</b>	10	14	14	
<b>1,25</b>	10	12	14	
<b>1,0</b>	4-8	10	10	
<b>0,75</b>	4	10	10	14
<b>0,5</b>	4	4	4-8	14
<b>0,25</b>			4	10-14
	<b>Zyklen IA</b>			

Tab. 5.2.: Reduktion von IgM im Verhältnis zur Zyklenzahl bei Pavianen mit einem Gewicht von 15-25 kg.

Innerhalb von 24 Stunden nach der IA kommt es zu einer Umverteilung der verbliebenen Immunglobuline aus dem Interzellulärraum ins Plasma. Nach einigen Stunden war deshalb ein leichter Wiederanstieg der Immunglobulinspiegel zu beobachten. Das würde eine zweite Immunapheresebehandlung am nächsten oder übernächsten Tag sinnvoll machen.

*Vorstudien mit Cynomolgus- und Rhesusaffen.* Dies waren die ersten Versuche unserer Arbeitsgruppe zur Evaluation der Technik der Immunadsorption bei orthotopen und heterotopen Xenotransplantationen von Schweineherzen. Die Aussagekraft bezüglich des Auftretens einer HAR war hier limitiert, da es durch hohe intraoperative Blutverluste und die Hämodilution nach der extrakorporalen Zirkulation zu einer starken Verdünnung der xenoreaktiven Antikörper im Plasma kam und die Tiere zum Teil aufgrund der massiven Hämodilution an Kreislaufversagen verstarben. Lediglich bei Cynomolgus 5 (ohne IA) fiel auf, dass die extrem hohen CK-MB-Werte (bis zu 585 ng/ml), zusammen mit einem starken Anstieg der Gesamt-CK und von Troponin I, mit hohen prä- und postoperativen Antikörperspiegeln einhergingen (1:64; 10 Min. nach Reperfusionbeginn). Dies hatte aber keinen unmittelbaren Funktionsverlust des Transplantats zur Folge. Das von Schmoeckel et al. (189) beobachtete inkonsistente Auftreten einer HAR bei nicht immunsupprimierten Cynomolgusaffen ist als mögliche Erklärung ebenfalls zu bedenken.

Technische Probleme und Blutverluste waren bei diesen ersten Versuchen nicht zu vermeiden und es standen keine Blutkonserven zur Verfügung. Die Antikoagulation an der Herz-

Lungen-Maschine und eine möglicherweise unzureichende Antagonisierung des Heparins nach IA bargen weiterhin die Gefahr einer verstärkten Blutungsneigung. Werden bei solchen Versuchen Blutersatzprodukte verwendet, sollten diese antikörperfrei und möglichst wenig immunogen sein. Sablinski et al. (178) verwendeten deshalb bei Langzeitstudien mit Cynomolgusaffen Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate von Spenderaffen und antikörperdepletiertes Plasma.

Die Durchführung einer Immunadsorptionsbehandlung bei den kleinen Cynomolgus- und Rhesusaffen ist möglich, wenngleich durch die Verwendung von Blutkonserven und durch eine Verringerung des extrakorporalen Volumens, z.B. durch die Verwendung von speziellen kleinen Adsorptionssäulen, die noch nicht auf dem Markt erhältlich sind, eine Verbesserung des Langzeitergebnisses erreicht werden könnte.

*Vorstudien mit Pavianen.* Die eindeutige hyperakute Abstoßung bei Pavian 6 (ohne IA) korrelierte mit einem hohen Anti-Pig-Antikörpertiter (präoperativ 1:1024, nach der Transplantation 1:256), während bei den drei anderen orthotopen Vorstudien mit Pavianen vergleichsweise niedrige Ausgangstiter vorhanden waren, die durch die IA noch weiter reduziert werden konnten.

Jedoch kam es auch bei den Herzen, die keiner HAR unterlagen, zu einer leichten Schädigung des Myokards. Bei dem Tier, das am längsten überlebte, war diese am ausgeprägtesten. Inwiefern sich daraus eine AVR entwickelt hätte, ist aufgrund der kurzen Beobachtungszeit nicht zu ersehen. Vermutlich ist eine leichte Myokardschädigung bei XT obligat, auch wenn sie nicht zu einem Funktionsverlust führt, da durch die IA nie alle Antikörper vollständig entfernt werden können.

Diese Vorstudien konnten bereits zeigen, dass die Entstehung einer hyperakuten Abstoßung stark von der Höhe des Anti-Pig-Antikörpertiters abhängt. Dass die Entfernung xenoreaktiver Antikörper mit der Überlebenszeit korreliert, hat sich in früheren Studien bereits erwiesen (2, 176). Vier Zyklen IA waren hier auch ohne Immunsuppression ausreichend, um eine HAR zu verhindern.

*Heterotope Transplantationen mit IA und Landrasseschweineherzen (Langzeitstudien).* Hier wurde in zwei Fällen ein Transplantat hyperakut abgestoßen. Das erste Tier (Pavian 8) erhielt zwar präoperativ eine Immunadsorptionsbehandlung, sie war jedoch nicht ausreichend. Der Anti-Pig-Antikörpertiter blieb nach der IA oberhalb der Grenze von 1:64 (bei 1:128). Bei dem zweiten Pavian (#7), der nicht mit Immunadsorption behandelt worden war, kam es ebenfalls

zu einer HAR. Dies zeigt wiederum, dass eine ausreichende Senkung der Antikörperspiegel unerlässlich ist, um eine HAR zu verhindern.

Pavian 3, der 11 Tage lang ohne Abstoßung überlebte, hatte von Beginn an niedrige Antikörper-, Immunglobulin- und Komplementspiegel. Der Anti-Pig-Antikörpertiter blieb auch in den Tagen nach der Transplantation auf sehr niedrigem Niveau und stieg erst ab dem 7. postoperativen Tag etwas an. Ob es sich bei dem starken Anstieg der Komplementfaktoren C3 und C4 ab den 7. Tag um einen Prozess im Rahmen einer beginnenden Abstoßung oder um eine unspezifische Reaktion handelt, ist unklar. Das Komplement steigt bei einer AVR (127), aber auch bei jeder Art von unspezifischer Gewebeschädigung an. Das Transplantat funktionierte jedoch bis zum Tod des Tieres und wies keine histologischen Abstoßungszeichen auf. Der Komplementanstieg kann somit auch auf die Medikamentennebenwirkungen zurückgeführt werden.

Bei Pavian 5 konnte durch die IA ebenfalls eine HAR verhindert werden.

Einen zunächst ähnlichen Verlauf wie Pavian 3 zeigte Pavian 13. Das Transplantat funktionierte 8 Tage lang, bis sich ein Anstieg des Anti-Pig-Antikörpertiters und der CK-MB-Masse abzeichnete. Um eine AVR zu verhindern, erhielt das Tier nach 11 Tagen eine zweite Immunadsorptionsbehandlung. Nach dieser Behandlung kam es allerdings zu einem schnellen Anti-Pig- und IgM-Anstieg und das Transplantat unterlag am 15. Tag einer massiven AVR. Die IA konnte die Antikörper zwar effektiv entfernen und die AVR verzögern, der Antikörper-Wiederanstieg war jedoch entscheidend dafür, dass letztendlich vier Tage später doch eine AVR auftrat. Dass eine AVR mit Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption vermieden werden kann, wurde durch Lin et al. (124) bereits gezeigt.

Das sorgfältige Monitoring der Antikörpertiter spielt bei der Festlegung des Behandlungszeitpunktes mit IA eine große Rolle, da bei der AVR regelmäßig ein Anstieg xenoreaktiver Antikörper beobachtet wird (2, 111, 121). Die Messungen sollten mindestens einmal oder besser zweimal pro Tag erfolgen, um einen tatsächlichen Anstieg frühzeitig erfassen und nachverfolgen zu können. Es sollte auch nicht abgewartet werden, bis der Titer den Grenzwert von 1:64 überschritten hat, sondern es sollte auf jeden deutlichen Anstieg (um 2-3 Titerstufen) sofort reagiert werden.

Der starke Titeranstieg trotz des vorhandenen Transplantatherzens spricht gegen die Theorie, dass sämtliche Antikörper sofort im Transplantat gebunden werden und deshalb bei einer AVR kein Titeranstieg zu sehen ist. Eine mögliche Ursache war, dass eine ausreichende Hemmung der Antikörperneuproduktion zu diesem Zeitpunkt nicht mehr gegeben war, da der Primat seit dem 2. postoperativen Tag kein Cyclophosphamid (CyP) mehr erhalten hatte. Es

kam gleichzeitig auch zu einem starken Leukozytenanstieg, was darauf hinweist, dass die Immunsuppression nicht mehr ausreichend war. Möglicherweise hätten CyP-Gaben in den Tagen vor und nach der zweiten Behandlung mit IA den schnellen Wiederanstieg verhindern können.

CyP spielt eine entscheidende Rolle bei der Antikörpersuppression. Klinische Studien haben gezeigt, dass CyP in Kombination mit Steroiden auch ruhende B-Zellen supprimiert (203). Eine 4-Tage-Hochdosistherapie mit CyP konnte bei Patienten Alloantikörper vollständig eliminieren (22). Im Xenotransplantationsmodell ist eine totale Suppression von xenoreaktivem IgM nur durch die Gabe von hochdosiertem Cyclophosphamid möglich (138). Die Neuproduktion von Antikörpern kann bei Xenotransplantationen nach IA verlangsamt werden (116) und führt auch ohne IA zu einem verlängerten Transplantatüberleben (189). Durch die Kombination mit CyA und Steroiden sowie der zusätzlichen Gabe von MMF kann durch die unterschiedlichen Wirkungsweisen die bestmögliche Suppression von xenoreaktiven Antikörpern und auch von zellulären Abstoßungsprozessen erreicht und die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer AVR verringert werden (16, 213, 215).

Im Gegensatz zur Allotransplantation führt bei der diskordanten Xenotransplantation die Gabe von Cyclosporin A (CyA) alleine nicht zu einer Suppression der Antikörperproduktion. Lambrigts et al. (116) beschrieben bei Pavianen einen schnellen Wiederanstieg von Antikörpern nach  $\alpha$ Gal-Antikörperadsorption, auch wenn mit CyA behandelt worden war. Auch um eine T-Zell-vermittelte Antwort bei der AVR zu unterdrücken, ist CyA alleine nicht ausreichend (101). Bei der AVR kommt es vor allem zu einer T-Zell-abhängigen Anti-Pig-IgG-Produktion (178). Mit Deoxyspergualin kann die Antikörperproduktion vermindert werden, aber nicht in ausreichendem Maße (142). Mycophenolat Mofetil (MMF) hat ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die Antikörperneubildung (215). Aber auch die Kombination von CyA und MMF konnte die Neuproduktion von Antikörpern im Xenotransplantationsmodell nicht vollständig unterdrücken (111).

*Heterotope Transplantationen mit IA und hDAF-transgenen Schweineherzen (Langzeitstudien).* Die vier transgenen Herzen wurden nach 2 bis 8 Tagen durch eine AVR abgestoßen. Auch bei einer nicht ganz ausreichenden Reduktion von Anti-Pig-Antikörpern (z.B. bei Pavian 19 mit 1:64 nach IA) trat keine HAR auf, was möglicherweise auf die Schutzwirkung des transgenen DAF zurückzuführen ist. Das Transplantat von Pavian 19 arbeitete 8 Tage lang, obwohl die Antikörper-, Immunglobulin- und Komplementspiegel vergleichsweise hoch waren. Jedoch blieb der Anti-Pig-Antikörpertiter immer auf dem



gleichen Niveau (um 1:64) und zeigte keinen plötzlichen Anstieg, was darauf schließen lässt, dass bei diesen Tier ein Antikörperspiegel dieser Höhe durch das Transplantat toleriert wurde. Ein Anti-Pig-Antikörperanstieg konnte bis auf Pavian 14 zum Zeitpunkt der AVR nicht gesehen werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass der Anstieg sehr kurzfristig stattfand und bei den morgendlichen Blutabnahmen noch nicht erfasst wurde. IgG, IgM und IgA stiegen bei den Tieren in den Tagen nach der Transplantation und zum Zeitpunkt der AVR nicht weiter an und es gab keine Hinweise darauf, dass IgA eine Rolle bei der AVR spielt, obgleich *in vitro* nachgewiesen wurde, dass IgA an Schweineendothel binden und eine Aktivierung von humanem Komplement initiieren kann (186).

Es wurde nachgewiesen, dass hDAF die humane Komplementaktivität um 84 % der totalen Plasmaaktivität senkt. Die Aktivität bei Cynomolgusaffen wurde um 72 % und die von Pavianen um 69 % gesenkt, während bei Rhesusaffen die Aktivität nur um 28 % abnahm (216). Die Übertragbarkeit eines transgenen Schwein-zu-Pavian-Modells auf die Verhältnisse beim Menschen ist also gegeben. Studien unter Verwendung hDAF-transgener Herzen und Nieren im Schwein-zu-Primat-Modell haben gezeigt, dass hDAF-transgene Organe eine deutliche Schutzwirkung bei der HAR haben. Auch wenn auf Immunsuppression verzichtet wurde, scheint eine HAR nicht aufzutreten. (189, 227). Eine AVR trat in den bisher beschriebenen Studien unter IS in etwa zwei Drittel der Fälle auf, jedoch wurde sie insbesondere bei den sehr lange überlebenden Transplantaten nicht beobachtet (16, 189).

Aufgrund unserer Beobachtungen und der Erfahrungen aus anderen Studien kann davon ausgegangen werden, dass bei vorangegangener präoperativer Antikörperdepletion der 3. bis 9. postoperative Tag besonders kritisch für die Entstehung einer AVR ist, auch bei hDAF-transgenen Schweineorganen. Deshalb wäre es sinnvoll, zu diesem Zeitpunkt regelmäßig weitere Immunadsorptionsbehandlungen durchzuführen. Die Zeitpunkte hierfür kann man vom Wiederanstieg der Antikörper abhängig machen. Die Behandlungsfrequenz kann wahrscheinlich im Laufe der Zeit gesenkt werden, da die Antikörperneuproduktion mit der Zeit verlangsamt wird, insbesondere wenn gleichzeitig B-Zell-hemmende Immunsuppression verabreicht wird (116, 120, 204).

Da die AVR durch hDAF-transgene Organe nicht vermieden werden kann, wäre eine zusätzliche kurzzeitige Komplementhemmung, z.B. mit sCR-1, eine weitere Möglichkeit, um eine AVR zu vermeiden oder deren erste Anzeichen zu therapieren (127).

*Orthotope Transplantationen mit IA und Landrasseschweineherzen (Langzeitstudien).* Die Tiere überlebten 5 Stunden bis 1,2 Tage. Die Herzen zeigten keine eindeutigen

Abstoßungszeichen. Die Flüssigkeitsüberladung sowie die Dauer der extrakorporalen Zirkulation (4 Stunden für die IA und 2-3 Stunden an der Herz-Lungen-Maschine) hatten vermutlich Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System, die durch das ohnehin funktionsschwächere Transplantatherz nicht kompensiert werden konnten. Die Tiere blieben deshalb katecholaminpflichtig und entwickelten schließlich ein Lungenödem oder Organversagen.

Ob neben der Herz-Lungen-Maschine auch die IA für die schlechte Kreislaufsituation verantwortlich war oder ob die Landrasseschweineherzen durch Abstoßungsprozesse doch zu sehr geschädigt worden waren, ist fraglich. Eine ungenügende Entfernung von Antikörpern oder Komplement ist hier als Erklärung nicht ausreichend, da die Spiegel nach der IA durch die langen Adsorptionsbehandlungen sehr niedrig waren. Lin et al. (124) beschrieben nach einer Behandlung mit Ig-Therasorb® und heterotoper Herztransplantation ebenfalls das Auftreten von Lungenödemem bei drei Pavianen.

Eine Reduktion der Zyklenzahl und die sorgfältige Bilanzierung des Flüssigkeitshaushaltes schon während der IA könnte hier die Entwicklung von Ödemen verringern. Möglicherweise wären ein größerer zeitlicher Abstand zwischen der IA und dem Herz-Lungen-Bypass oder die Durchführung der IA an der Herz-Lungen-Maschine hier sinnvoller.

*Schlussfolgerungen.* Wir konnten zeigen, dass die Entfernung xenoreaktiver Antikörper zur Vermeidung einer HAR von entscheidender Bedeutung ist. Dabei musste ein Anti-Pig-Antikörpertiter von  $< 1:64$  unterschritten werden. Wurde dieser Wert durch die Immunadsorptionsbehandlung nicht erreicht, war die Entwicklung einer HAR sehr wahrscheinlich. Der Anti-Pig-Hämagglutinationstest erwies sich dabei als eine zuverlässige sowie einfache und schnelle Messmethode zur Effizienzkontrolle der IA und als Verlaufparameter. Daneben spielt eine ausreichende Reduktion der Immunglobuline, v.a. von IgM (auf Werte  $< 0,1$  g/l) eine große Rolle.

Ein günstiger Zeitpunkt zur obligaten Durchführung einer zweiten Immunadsorptionsbehandlung wäre der zweite Tag nach der Transplantation, da zu diesem Zeitpunkt Immunglobuline, die im Interstitium vorhanden waren, ins Plasma diffundiert sind und die Neuproduktion von Antikörpern begonnen hat. Die Wahrscheinlichkeit einer AVR steigt am 3. postoperativen Tag und in den folgenden Tagen stark an und ihr Auftreten könnte somit verzögert oder verhindert werden. Insbesondere die regelmäßige und häufige Bestimmung des Anti-Pig-Antikörpertiters (alle 12 Stunden) ist hier wichtig, damit ein Titeranstieg frühzeitig erkannt wird. Wahrscheinlich wären danach

Immunadsorptionsbehandlungen alle 3-5 Tage ausreichend. Es ist zu erwarten, dass die Behandlungsfrequenz im Lauf der Zeit verringert werden kann, insbesondere zusammen mit einer immunsuppressiven Therapie, die effektiv die Neuproduktion xenoreaktiver Antikörper hemmt.

Die Adsorptionsbehandlungen waren auch bei kleinen Cynomolgus- und Rhesusaffen durchführbar. Die Methode wäre damit auch bei einer möglichen klinischen XT von Kleinkindern oder Säuglingen eine gute Option zur Vermeidung einer HAR. Jedoch sollten antikörperfreie Erythrozytenkonzentrate gegeben und das extrakorporale Volumen, z.B. mit kleineren Adsorptionssäulen, verringert werden, um eine starke Hämodilution zu vermeiden.

Wird die IA vor einer oXHTx durchgeführt, so muss die Kreislaufbelastung durch die IA möglichst gering bleiben. Dass gravierende Nebenwirkungen beim erwachsenen Patienten kaum auftreten, konnte jedoch bereits durch die vielfache Anwendung in der Klinik bei Autoimmunerkrankungen bewiesen werden.

Erstmals führten wir die Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption auch in Kombination mit hDAF-transgenen Schweineherzen durch. Die Expression von transgenem hDAF bietet zwar einen zuverlässigen Schutz vor einer HAR, doch ist der Schutz vor einer AVR bislang nur durch eine optimale Kombination von Immunsuppressiva möglich. Mit einem immunsuppressiven Vierfachregime aus Cyclophosphamid, Cyclosporin A, Steroiden und Mycophenolat konnte das Auftreten einer AVR in einem weiteren lebenserhaltenden, orthotopen hDAF-transgenen Modell unserer Arbeitsgruppe verhindert werden und Überlebenszeiten von bis zu 20 Tagen erreicht werden (s. 8.3. Publikationsverzeichnis: Abstracts 9, 10 und 13).

Da jedoch die Immunsuppression alleine zur Vorbeugung oder bei den ersten Anzeichen einer AVR wahrscheinlich nicht immer ausreichend ist, müssen zusätzliche Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen. Mit der IA hätte man eine Strategie, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer AVR weiter zu verringern oder in einem frühen Stadium noch zu therapieren. Die IA wäre eine Akuttherapie, die sehr schnell greift, auch wenn bereits Antikörper vorhanden sind, da die Immunsuppression nur deren Bildung verhindern kann. Inwiefern die Ig-Therasorb<sup>®</sup>-Immunadsorption zusammen mit einer effizienten Immunsuppression auch bei der Vermeidung einer AVR zuverlässig ist, muss jedoch in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

Der zukünftige Erfolg der XT hängt sicher von der Entwicklung selektiver T- und B-Zell-hemmender bzw. Antikörper-supprimierender Therapien ab, die eine tolerable Nebenwirkungsrate aufweisen. Es bleibt jedoch unklar, wie lange die B-Zell-Aktivität unterdrückt werden muss, um die Produktion natürlicher Antikörper dauerhaft zu

supprimieren oder ganz auszuschalten und somit eine Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Transplantat zu erreichen. Dass eine derartige Toleranzentwicklung möglich ist, wurde im AB0-inkompatiblen Allotransplantationsmodell und bei hochsensibilisierten Allotransplantatempfängern bereits gezeigt. Die Inkompatibilitäten bei diskordanten XT sind aber nicht so leicht zu überwinden und deshalb werden längerfristige und intensivere Therapien sowie hochspezifische Ansätze erforderlich sein, um ein Langzeitüberleben von Xenotransplantaten zu garantieren.

## 6. Zusammenfassung

Die erfolgreiche Transplantation von Schweineorganen auf den Menschen, also die Xenotransplantation, ist angesichts der zunehmenden Knappheit von Alлотransplantaten ein vorrangiges Ziel der modernen Transplantationsforschung. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden deshalb bereits viele experimentelle Studien mit Primaten als Empfänger durchgeführt. Neben medikamentöser Immunsuppression, Komplementhemmung und Toleranzinduktion ist die Entfernung xenoreaktiver Antikörper bei der Schwein-zu-Primat-Xenotransplantation von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Anwendbarkeit der Ig-Therasorb®-Immunadsorption zur extrakorporalen Elimination xenoreaktiver Antikörper in einem Schwein-zu-Primat-Modell, sowie die technische Durchführung, die Nebenwirkungen und die Effizienz der Behandlungen. Die Immunadsorption wurde dabei zur Vermeidung und Therapie der hyperakuten und akuten vaskulären Xenotransplantatabstoßung eingesetzt. Erstmals wurden auch hDAF-transgene Schweineherzen in Kombination mit Ig-Therasorb®-Immunadsorption verwendet, um eine zusätzliche Hemmung des Komplementsystems zu erreichen.

Wir führten 2 Versuchsreihen mit 7 Cynomolgus- und Rhesusaffen sowie 4 Pavianen als Empfänger zur Evaluierung der Technik und Effizienz der Immunadsorption durch sowie 4 Versuchsreihen mit insgesamt 18 Pavianen zum Langzeitüberleben nach orthotoper und heterotoper Transplantation von Landrasse- und hDAF-transgenen Schweineherzen mit perioperativer Immunadsorption.

Die Ig-Therasorb®-Immunadsorption ist eine effiziente und sichere extrakorporale Plasmaperfusionsmethode zur Entfernung xenoreaktiver Antikörper. Eine hyperakute Abstoßung kann durch die präoperative Behandlung mit Immunadsorption vermieden werden, wenngleich noch untersucht werden muss, ob die Immunadsorption auch bei der Vermeidung einer akuten vaskulären Abstoßung eine verlässliche Methode ist. Es konnte zudem bestätigt werden, dass hDAF-transgene Schweineherzen einen Schutz vor der hyperakuten Xenotransplantatabstoßung bieten.

Die Ig-Therasorb®-Immunadsorption hat sich bereits in vielen Studien mit Patienten als sicher und effizient erwiesen, auch in der langfristigen Anwendung. Es ist zu erwarten, dass die Methode bei einer zukünftigen klinischen Xenotransplantation von den Patienten gut vertragen würde und einen entscheidenden Beitrag zur Vermeidung einer HAR und zur Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit leisten könnte.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adams DH, Kadner A, Chen RH, Farivar RS. Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation*. 2001;8:36-40.
2. 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.
3. Atkinson JP, Odlesby 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;86:27-30.
4. Bach FB, Turman MA, Vercellotti GM, Platt JL, Dalmaso AP. Accomodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant Proc*. 1991;23:205-207.
5. Bach FH, Dalmaso AP, Platt JL. Xenotransplantation: a current perspective. *Transplant Rev*. 1992;6:163-174.
6. Bach FH, Robson SC, Ferran C, Millan M, Anrather J, Kopp C, Lesnikoski B, Goodman DJ, Hancock WW, Wrighton C. Xenotransplantation: endothelial cell activation and beyond. *Transplant Proc*. 1995;27:77-79.
7. Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC. Delayed xenograft rejection. *Immunol Today*. 1996;17:379-384.
8. Bach FH. Xenotransplantation: problems for consideration. *Clin Transplant*. 1991;5:595-599.
9. Bailey LL, Nehlsen-Canarella SL, Concepcion W, Jolley WB. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA*. 1985;254:3321-3329.
10. Bannett AD, McAlack RF, Morris M, Chopek M, Platt JL. AB0 incompatible renal transplantation: a qualitative analysis of native endothelial tissue AB0 antigens after transplantation. *Transplant Proc*. 1989;21:783-785.
11. Bannett AD, McAlack RF, Raja R, Baquero A, Morris M. Experiences with known AB0-mismatched renal transplants. *Transplant Proc*. 1987;19:4543-4546.

12. Banyai S, Mayer N, Zeitlhofer J, Apsner R, Derfler K. IgG-Immunoabsorption bei Patienten mit neurologischen Erkrankungen. *Symposium der Med. Hochschule Hannover*. 28.02.-01.03.1997; Hannover.
13. 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;52:1035-1038.
14. Barocci S, Nocera A. In vitro removal of anti-HLA IgG antibodies from highly sensitized transplant recipients by immunoabsorption with protein A and protein G sepharose columns: a comparison. *Transpl Int*. 1993;6:29-33.
15. Basta M. Modulation of complement-mediated immune damage by intravenous immune globulin. *Clin Exp Immunol*. 1996;104:21-25.
16. Bhatti FNK, Schmoeckel M, Zaidi A, Cozzi E, Chavez G, Goodard M, Dunning JJ, Wallwork J, White DJG. Three-month survival of HDAFF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplant Proc*. 1999;31:958.
17. Böhmig GA, Regele H, Exner M, Derhartunian V, Kletzmayer J, Saemann MD, Horl WH, Druml W, Watschinger B. C4d-positive acute humoral renal allograft rejection: effective treatment by immunoabsorption. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2482-2489.
18. Borche L, Thibaudeau K, Navenot J, Souillou J, Blanchard D. Cytolytic effect of human anti-Gal IgM and complement on porcine endothelial cells: a kinetic analysis. *Xenotransplantation*. 1994;1:58-64.
19. Brenner P, Hinz M, Huber H, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Meiser B, Hammer C, Reichart B. The influence of antibody and complement removal with a Ig-Therasorb column in a xenogeneic working heart model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;15: 672-679.
20. Brenner P, Hinz M, Huber H, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Effects of prolonged cold storage time in xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18:1211-1217.
21. Brenner P, Schmoeckel M, Huber H, Vetter HO, Müller-Höcker J, Hammer C, Reichart B. Einfluß der Antikörper-Reduktion mittels der Immunapheresesäule Ig-Therasorb auf die hyperakute Abstoßungsreaktion im Xenoperfusionsmodell. *Langenbecks Arch Chir I (Forumband)*. 1998:645-650.

22. Brodsky RA, Fuller AK, Ratner LE, Leffell MS, Jones RJ. Elimination of alloantibodies by immunoablative high-dose cyclophosphamide. *Transplantation*. 2001;71:482-484.
23. Buhler L, Yamada K, Kitamura H, Alwayn IP, Basker M, Appel JZ, Colvin RB, White-Scharf ME, Sachs DH, Robson SC, Awwad M, Cooper DK. Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal(alpha)1-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation. *Transplantation*. 2001;72:1743-1752.
24. Calne RY. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc*. 1970;2:550-556.
25. Candinas D, Bach FH, Hancock WW. Delayed xenograft rejection in complement-depleted T-cell deficient rat recipients of guinea pig cardiac grafts. *Transplant Proc*. 1996;28:678.
26. Candinas D, Belliveau S, Koyamada N, Miyatake T, Hechenleitner P, Mark W, Bach FH, Hancock WW. T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation*. 1996;62:1920-1927.
27. Carrel A. La technique operateire des anastomoses vasculaire et la transplantation des visceres. *Lyon Med*. 1902;98:859.
28. Chapman LE, Folks TM, Salomon DR, Patterson AP, Eggerman TE, Noguchi PD. Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N Engl J Med*. 1995;333:1498-1501.
29. Chen JM, Michler RE. Heart xenotransplantation: lessons learned and future prospects. *J Heart Lung Transplant*. 1993;12:869-875.
30. Chen RH, Naficy S, Logan JS, Diamond LE, Adams DH. Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. *Xenotransplantation*. 1999;6:194-200.
31. Chong AS, Shen J, Xiao F, Blinder L, Wei L, Sankary H, Foster P, Williams J. Delayed xenograft rejection in the concordant hamster heart into Lewis rat model. *Transplantation*. 1996;62:90-96.
32. Chopek MW, Simmons RL, Platt JL. AB0-incompatible renal transplantation: initial immunopathologic evaluation. *Transplant Proc*. 1987;19:4553-4557.



33. Cohnhey S, McKenzie IF, Patton K, Prenzoska J, Ostenreid K, Fodor WL, Sandrin MS. Down-regulation of Gal alpha(1,3) Gal expression by alpha 1,2-fucosyltransferase: further characterization of alpha1,2-fucosyltransferase transgenic mice. *Transplantation*. 1997;64:495-500.
34. Cooley DA, Hallman GL, Bloodwell RD, Nora JJ, Leachman RD. Human heart transplantation. Experience with twelve cases. *Am J Cardiol*. 1968;22:804-810.
35. Cooper DK, Koren E, Oriol R. Oligosaccharides and discordant transplantation. *Immunol Rev*. 1994;141:31-58.
36. Cooper DK. Xenoantigens and xenoantibodies. *Xenotransplantation*. 1998;5:6-17.
37. Cooper DKC, Cairns TDH, Taube DH. Extracorporeal immunoabsorption of anti-pig antibody in baboons using  $\alpha$ Gal oligosaccharide immunoaffinity columns. *Xeno*. 1996;4:27-29.
38. Cooper DKC, Good AH, Koren E, Oriol R, Malcolm AJ, Ippolito RM, Neethling FA, Ye Y, Romano E, Zuhdi N. Identification of  $\alpha$ -galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig-antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl Immunol*. 1993;1:198-205.
39. Cooper DKC, Human PA, Lexer G, Rose AG, Rees J, Keraan M, DuToit E. Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon. *J Heart Transplant*. 1988;7:238-246.
40. Cooper DKC, Ye Y, Kehoe M, Niekrasz M, Rolf LL, Martin M, Baker J, Kosanke S, Zuhdi N, Worsley G, Romano E. A novel approach to 'neutralization' of preformed antibodies: cardiac allotransplantation across the AB0-blood group barrier as a paradigm of discordant xenotransplantation. *Transplant Proc*. 1992;24:566-571.
41. Cooper DKC, Ye Y, Niekrasz M, Kehoe M, Martin M, Neethling FA, Kosanke S, De Bault LE, Worsley G, Zuhdi N. Specific intravenous carbohydrate therapy - a new concept in inhibiting antibody-mediated rejection: experience with AB0-incompatible cardiac allografting in the baboon. *Transplantation*. 1993;56:769-777.
42. Cooper DKC, Ye Y, Rolf LL, Zuhdi 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*. Berlin: Springer, 1991:481-500.

43. Cooper DKC. Xenografting: how great is the clinical need? *Xeno*. 1993;1:25-26.
44. Costa C, Zhao L, Burton WV, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Ditullio PA, Ebert KM, Fodor WL. Expression of the human alpha1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytotoxicity. *FASEB J*. 1999;13:1762-1773.
45. Costa C, Zhao L, Burton WV, Rosas C, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Dalmaso AP, Fodor WL. Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection. *Xenotransplantation*. 2002;9:45-57.
46. Cotterell AH, Collins BH, Parker W, Harland RC, Platt JL. The humoral immune response in humans following cross-perfusion of porcine organs. *Transplantation*. 1995;60:861-868.
47. Coughlan AF, Berndt MC, Dunlop LC, Hancock WW. In vivo studies of P-selectin and platelet activating factor during endotoxemia, accelerated allograft rejection, and discordant xenograft rejection. *Transplant Proc*. 1993;25:2930-2931.
48. Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Chen CG, Fisticaro N, Francis DM, Goodman DJ, Han W, Kurek M, Nottle MB, Pearse MJ, Salvaris E, Shinkel TA, Stainsby GV, Stewart AB, D'Apice AJ. Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation*. 2000;69:2504-2515.
49. Cozzi E, Bhatti F, Schmoeckel M, Chavez G, Smith KGC, Zaidi A, Bradley JR, Thiru S, Goodard M, Vial C, Ostlie D, Wallwork J, White DJG, Friend PJ. Long-term survival of nonhuman primates receiving transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation*. 2000;70:15-21.
50. Cozzi E, White DJG. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med*. 1995;1: 964-966.
51. Cozzi E, Yanoutsos N, Langford GA, Pino-Chavez G, Wallwork J, White DJG. Effect of transgenic expression of human decay accelerating factor on the inhibition of hyperacute rejection of pig organs. In: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG, eds. *Xenotransplantation. The Transplantation of Organs and Tissues Between Species*. 2nd ed. Berlin: Springer; 1997:665-682.

52. Czaplicki J, Blonska B, Religa Z. The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human. *J Heart Lung Transplant*. 1992;11:393-397.
53. Daggett CW, Yeatman M, Lodge AJ, Chen EP, Lin SS, Gullotto C, Frank MM, Platt JL, Davis RD. Total respiratory support from swine lungs in primate recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;115:19-27.
54. Dalmaso AP, Platt JL. Prevention of complement-mediated activation of xenogeneic endothelial cells in an in vitro model of xenograft hyperacute rejection by C1-inhibitor. *Transplantation*. 1993;56:1171-1176.
55. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Fischel RJ, Bolman RM, Bach FH, Platt JL. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am J Pathol*. 1992;140:1157-1166.
56. Dalmaso AP. Role of complement in xenograft rejection. In: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG, eds. *Xenotransplantation. The Transplantation of Organs and Tissues Between Species*. 2nd ed. Berlin: Springer; 1997:38-60.
57. Davis EA, Jakobs F, Pruitt SK, Greene PS, Qian Z, Lam TT, Tseng E, Levin JL, Baldwin WM, Sanfilippo F. Overcoming rejection in pig-to-primate cardiac xenotransplantation. *Transplant Proc*. 1997;29:938-939.
58. Davis EA, Pruitt SK, Greene PS, Ibrahim S, Lam TT, Levin JL, Baldwin WM, Sanfilippo F. Inhibition of complement, evoked antibody, and cellular response prevents rejection of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation*. 1996;62:1018-1023.
59. Dehoux JP, De la Parra B, Latinne D, Bazin H, Gianello P. Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft. *Xenotransplantation*. 2002;9:338-349.
60. Deng S, Bühler L, Lou J, Grant G, Redard M, Bubloz C, Rohner A, Morel P. Study of concordant xenografted islets of Langerhans rejection: humoral or cellular mechanism? *Transplant Proc*. 1994;26:1184-1185.

61. Derfler K, Sautner T, Banyai S, Jansen M, Mühlbacher F, Mayr WR, Druml W. IgG-Immunapheresetherapie bei hochsensibilisierten mehrfachtransplantierten Dialysepatienten. *Symposium der Med. Hochschule Hannover*. 28.02.-01.03.1997; Hannover.
62. Diamond LE, Quinn CM, Martin MJ, Lawson J, Platt JL, Logan JS. A human CD46 transgenic model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation*. 2001;71:132-142.
63. Diem K, Mayr WR, Sautner T, Mühlbacher F, Hörl WH, Janson M, Druml W, Derfler K. Anti-HLA antibody removal by IgG-immunapheresis in highly sensitized renal transplant recipients. *Eur J Clin Invest*. 1996;26: Suppl.1, A 25.
64. Dörffel WV, Felix SB, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, Kleber FX, Baumann G, Reinke P. Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1997;95:1994-1997.
65. Dorling A, Riesbeck K, Lechler RI. The T cell response to xenografts. *Xeno*. 1996;4:68-76.
66. Du Moulin A, Müller-Derlich J, Bieber F, Richter WO, Frei U, Müller R, Spaethe R. Antibody-based immunoadsorption as a therapeutic means. *Blood Purif*. 1993;11:145-149.
67. Dunning J, Braidley PC, Wallwork J, White DJG. Analysis of hyperacute rejection of pig hearts by human blood using an ex vivo perfusion model. *Transplant Proc*. 1994;26:1016-1017.
68. Esmon CT, Taylor FB, Snow TR. Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thromb Haemost*. 1991;66:160-165.
69. Euler HH, Zeuner RA, Schroeder JO. Plasma exchange in systemic lupus erythematoses. *Transfus Sci*. 1996;17:245-265.
70. Evans R, Orians C, Ascher N. The potential supply of organ donors. An assessment of the efficacy of organ procurement efforts in the United States. *JAMA*. 1992;267:239-246.

71. Evans RW. The National Cooperative Transplantation Study. *Executive Summary*. Seattle, WA: BHARC; 1991.
72. Figueroa J, Fuad SA, Kunjummen BD, Platt JL, Bach FH. Suppression of synthesis of natural antibodies by mycophenolate mofetil (RS-61443). Its potential use in discordant xenografting. *Transplantation*. 1993;55:1371-1374.
73. Fischel RJ, Matas AJ, Platt JL, Perry E, Noreen H, Shumway SJ, Bolman RM. Cardiac xenografting in the pig-to-rhesus monkey model: manipulation of antiendothelial antibody prolongs survival. *J Heart Lung Transplant*. 1992;11:965-974.
74. Fishman JA. Miniature swine as organ donors for men: strategies for prevention of xenotransplant associated infections. *Xenotransplantation*. 1994;1:47-57.
75. Fukushima N, Bouchart F, Gundry SR, Nehlsen-Cannarella S, Gusewitch G, Chang L, Fagoaga O, Bailey LL. The role of anti-pig antibody in pig-to-baboon cardiac xenotransplant rejection. *Transplantation*. 1994;57:923-928.
76. Gaca JG, Lee W, Aksoy O, Braedehoeft SJ, Gonzalez-Stawinski GV, Parker W, Davis RD. Evidence for polyreactive xenoreactive antibodies in the repertoire of human anti-swine antibodies: the 'next' humoral barrier to xenotransplantation? *Transpl Immunol*. 2001;9:19-27.
77. Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA. Evolutionary relationship between natural anti-Gal antibody and the Gal $\alpha$ (1-3)Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;84:1369-1373.
78. 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;263:17755-17762.
79. Galili U. Evolution and pathophysiology of the human natural anti-alpha Gal antibody. *Springer Sem Immunopathol*. 1993;15:155-171.
80. Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today*. 1993;14:480-482.
81. Gaubitz M, Seidel M, Kummer S, Schotte H, Perniok A, Domschke W, Schneider M. Prospective randomized trial of two different immunoadsorbents in severe systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 1998;11:495-501.

82. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*. 1990;343:757-760.
83. Gianello PR, Latinne D, Alexandre GPJ. Pig-to-baboon renal xenografts. *Xeno*. 1995;3:26-30.
84. Gonzalez-Stawinski GV, Daggett CW, Lau CL, Karoor S, Love SD, Logan JS, Gaca JG, Parker W, Davis RD. Non-anti-Gal alpha1-3Gal antibody mechanisms are sufficient to cause hyperacute lung dysfunction in pulmonary xenotransplantation. *J Am Coll Surg*. 2002;194:765-773.
85. Good H, Cooper DKC, Malcolm AJ, Ippolito RM, Koren E, Neethling FA, Ye Y, Zuhdi N, Lamontagne LR. Identification of carbohydrate structures which bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in man. *Transplant Proc*. 1992;24:559-562.
86. Gourlay WA, Chambers WH, Monaco AP, Maki T. Importance of natural killer cells in the rejection of hamster skin xenografts. *Transplantation*. 1998;65:727-734.
87. Hancock WW. Delayed xenograft rejection. *World J Surg*. 1997;21:917-923.
88. Hansch GM, Hammer CH, Vanguri P, Shin ML. Homologous species restriction in lysis of erythrocytes by terminal complement proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:5118-5121.
89. Hardy JD, Chavez CM, Kurrus FD, Lehan PH, Hellems HK, Fabian LW. Heart transplantation in man. *JAMA*. 1964;188:1132-1140.
90. Heidelberger M, Kendall FE. A quantitative theory of the precipitin reaction. *J Exp Med*. 1935;62:697-720.
91. Heneine W, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Rosales GV, Mathews A, Korsgren O, Chapman LE, Folks TM, Groth CG. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts [Published erratum]. *Lancet*. 1998;352:695-699, 1478.
92. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: eighteenth official report - 2001. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:805-815.

93. Hunt BJ, Rosenberg RD. The essential role of haemostasis in hyperacute rejection. *Xenotransplantation*. 1993;1:16-19.
94. Inverardi L , Clissi B, Stolzer AL, Bender JR, Sandrin MS, Pardi R. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionary conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation*. 1997;63:1318-1330.
95. Inverardi L, Samaja M, Marelli F, Bender JR, Pardi R. Cellular early immune recognition of xenogeneic vascular endothelium. *Transplant Proc*. 1992;24:459-461.
96. Jaboulay M. Greffe de reins au pli du coude par soudres arterielles et veineuses. *Lyon Med*. 1906;39:575-577.
97. Johnsson C, Andersson A, Bersztel A, Karlsson-Parra A, Gannedahl G, Tufveson G. Successful retransplantation of mouse-to-rat cardiac xenografts under immunosuppressive monotherapy with cyclosporine. *Transplantation*. 1997;63:652-656.
98. Johnston PS, Wang MW, Lim SM, Wright LJ and White DJ. Discordant xenograft rejection in an antibody-free model. *Transplantation*. 1992;54:573-576.
99. Jurd KM, Gibbs RV, Hunt BJ. Activation of human prothrombin by porcine aortic endothelial cells – a potential barrier to pig to human xenotransplantation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7:336-343.
100. Kaplon RJ, Michler RE, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Platt JL. Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts. *Transplantation*. 1995;59:1-6.
101. Kawai T, Cosimi B, Colvin R, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, Sykes M, Monroy R, Tanaka M, Sachs DH. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation*. 1995;59:256-262.
102. Kawauchi M, Takeda M, Matsumoto J, Furuse A. Cardiac xenotransplantation from pig to Japanese monkey with splenectomy, tacrolimus, filtration plasmapheresis and nafamstat mesilate. *Transplant Proc*. 1994;26:1076-1077.
103. Knöbl P, Derfler K. Immunologisch bedingte hämatologische und hämostaseologische Erkrankungen - Indikationen für Immunadsorption? *Symposium der Med. Hochschule Hannover*. 28.02.-01.03.1997; Hannover.

104. Kobayashi T, Neethling FA, Koren E, Taniguchi S, Ye Y, Niekrasz M, Takagi H, Hancock WW, Cooper DK. In vitro and in vivo investigation of anticomplement agents FUT-175 and K76COOH in the prevention of hyperacute rejection following discordant xenotransplantation in a nonhuman primate model. *Transplant Proc.* 1996;28:604.
105. 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;64:1255-1261.
106. Kobayashi T, Taniguchi S, Ye Y, Niekrasz M, Kosanke S, Neethling FA, Wright LJ, Rose AG, White DJ, Cooper DK. Delayed xenograft rejection in C3-depleted discordant (pig-to-baboon) cardiac xenografts treated with cobra venom factor. *Transplant Proc.* 1996;28:560.
107. Koll RA. Ig-Therasorb immunoadsorption for selective removal of human immunoglobulins in diseases associated with pathogenic antibodies of all classes and IgG subclasses, immune complexes, and fragments of immunoglobulins. *Ther Apher.* 1998;2:147-152.
108. Kozlowski T, Fuchimoto Y, Monroy R, Bailin M, Martinez-Ruiz R, Foley A, Xu Y, Awwad M, Fishman J, Andrews D, Ritzenthaler J, Sablinski T, Ierino FL, Sachs DH. Apheresis and column absorption for specific removal of Gal-a-1,3Gal natural antibodies in a pig-to-baboon model. *Transplant Proc.* 1997;29:961.
109. Kozlowski T, Ierino FL, Lambrechts D, Foley A, Andrews D, Awwad M, Monroy R, Cosimi AB, Cooper DK, Sachs DH. Depletion of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibody in baboons by specific immunoaffinity columns. *Xenotransplantation.* 1998;5:122-131.
110. Kozlowski T, Monroy R, Xu Y, Glaser R, Awwad M, Cooper DK, Sachs DH. Anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibody response to porcine bone marrow in unmodified baboons and baboons conditioned for tolerance induction. *Transplantation.* 1998;66:176-182.
111. Kozlowski T, Shimizu A, Lambrechts D, Yamada K, Fuchimoto Y, Glaser R, Monroy R, Xu Y, Awwad M, Colvin RB, Cosimi AB, Robson SC, Fishman J, Spitzer TR, Cooper DK, Sachs DH. Porcine kidney and heart transplantation in baboons undergoing a tolerance induction regimen and antibody adsorption. *Transplantation.* 1999;67:18-30.



112. Kroshus TJ, Dalmaso AP, Leventhal JR, John R, Matas AJ, Bolman RM. Antibody removal by column immunoadsorption prevents tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenograft hyperacute rejection. *J Surg Res.* 1995;59:43-50.
113. Kroshus TJ, Salerno CT, Dalmaso AP, Fodor WL, Bolman RM. Expression of human CD59 in transgenic pig hearts extends survival in an orthotopic pig-to-baboon model of heart transplantation [Abstract 281]. *J Heart Lung Transplant.* 1997;16:111.
114. Kujundzic M, Koren E, Neethling FA. Variability of anti- $\alpha$ Gal antibodies in human serum and their relation to serum cytotoxicity against pig cells. *Xenotransplantation.* 1994;1:58-65.
115. Lambrigts D, Sachs DH, Cooper DKC. Discordant organ xenotransplantation in primates. World experience and current status. *Transplantation.* 1998;66:547-561.
116. Lambrigts D, Van Calster P, Xu Y, Awwad M, Neethling FA, Kozlowski T, Foley A, Watts A, Chae SJ, Fishman J, Thall AD, White-Scharf ME, Sachs DH, Cooper DK. Pharmacologic immunosuppressive therapy and extracorporeal immunoadsorption in the suppression of anti- $\alpha$ Gal antibody in the baboon. *Xenotransplantation.* 1998;5:274-283.
117. Lawson JH, Platt JL. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation.* 1996;62:303-310.
118. Lee JM, Tu CF, Yang PW, Lee KH, Tsuji K, Tsai MK, Chen RJ, Hu CY, Hsieh RP, Tai HC, Chiang BL, Weng CN, Lee YC, Lee CJ. Reduction of human-to-pig cellular response by alteration of porcine MHC with human HLA DPW0401 exogenes. *Transplantation.* 2002;73:93-97.
119. Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RM, Matas AJ. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation.* 1993;55:857-865.
120. Leventhal JR, John R, Fryer JP, Witson JC, Muller-Derlich J, Remiszewski J, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM. Removal of baboon and human anti-porcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vivo and in vitro studies. *Transplantation.* 1995;59:294-300.

121. Leventhal JR, Sakiyalak P, Witson J, Simone P, Matas AJ, Bolman RM, Dalmaso AP. The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in nonhuman primates. *Transplantation*. 1994;57:974-978.
122. Lexer GH, Cooper DKC, Wicomb WN. Cardiac transplantation using discordant xenografts in a nonhuman primate model. *Transplant Proc*. 1987;19:1153-1154.
123. Lin SS, Hanaway MJ, Gonzalez-Stawinski GV, Lau CL, Parker W, Davis RD, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS, Platt JL. The role of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation*. 2000;70:1667-1674.
124. Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, Diamond LE, Lawson JH, Hoopes CW, Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Harland RC, Davis RD, Bollinger RR, Logan JS, Platt JL. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J Clin Invest*. 1998;101:1745-1756.
125. Lin Y, Vandeputte M, Waer M. Contribution of activated macrophages to the process of delayed xenograft rejection. *Transplantation*. 1997;64:1677-1683.
126. Liu D, Kobayashi T, Yokoyama I, Ogawa H, Nagasaka T, Muramatsu H, Kadomatsu K, Oikawa T, Shimano Y, Morozumi K, Uchida K, Muramatsu T, Nakao A. Enzymatic removal of alpha-Gal antigen in pig kidneys by ex vivo and in vivo administration of endo-beta-galactosidase C. *Xenotransplantation*. 2002;9:228-236.
127. Loss M, Vangerow B, Schmidtke J, Kunz R, Jalali A, Arends H, Przemeck M, Ruckholt H, Leuwer M, Kaup FJ, Rensing S, Cozzi E, White DJ, Klempnauer J, Winkler M. Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model. *Xenotransplantation*. 2000;7:186-196.
128. Magee JC, Collins BH, Harland RC, Lindman BJ, Bollinger RR, Frank MM, Platt JL. Immunoglobulin prevents complement-mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation. *J Clin Invest*. 1995;96:2404-2412.

130. Makrides SC. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev.* 1998;50:59-87.
131. Matsumiya G, Gundry SR, Nehlsen-Cannarella S, Fagoaga OR, Morimoto T, Arai S, Fukushima N, Zuppan CW, Bailey LL. Serum interleukin-6 level after cardiac xenotransplantation in primates. *Transplant Proc.* 1997;29:916-919.
132. Mayr WR. Vergleich der Immunadsorption mit dem Plasmaaustausch. *Symposium der Med. Hochschule Hannover.* 28.02.-01.03.1997; Hannover.
133. McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, Platt JL. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med.* 1995;1:423-427.
134. McCurry KR, Parker W, Cotterell AH, Weidner BC, Lin SS, Daniels LJ, Holzknecht ZE, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS, Platt JL. Humoral responses to pig-to-baboon cardiac transplantation: implications for the pathogenesis and treatment of acute vascular rejection and for accommodation. *Hum Immunol.* 1997;58:91-105.
135. Meyer C, Wolf P, Romain N, Ravanat C, Roussi J, Beller JP, Imbs P, Chenard MP, Fabre M, Kieny R, Bonneau M, Drouet L, Cazenave JP, Soulillou JP, Azimzadeh A. Use of von Willebrand diseased kidney as donor in a pig-to-primate model of xenotransplantation. *Transplantation.* 1999;67:38-45.
136. 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. *Transplantation.* 1997;63:182-186.
137. Mornex JF. Endogenous porcine retroviruses and xenotransplantation. *Pathol Biol.* 2000;48:395-398.
138. Morschheuser T, Steinhoff G, Indzhiia L, Heiser A, Heim M, Lapin BA, Haverisch A. Successful down-regulation of natural and xenoreactive antibodies in pig-to-baboon xenotransplantation by high-dose cyclophosphamide. *Transplant Proc.* 1997;29:970.
139. Moses RD, Auchincloss H. Mechanisms of cellular xenograft rejection. In: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG, eds. *Xenotransplantation. The Transplantation of Organs and Tissues Between Species.* 2nd ed. Berlin: Springer; 1997:140-174.

140. Moses RD, Pierson RN, Winn HJ, Auchincloss H. Xenogeneic proliferation and lymphokine production are dependent on CD4+ helper T cells and self antigen-presenting cells in the mouse. *J Exp Med.* 1990;172:567-575.
141. Nagayasu T, Saadi S, Holzkecht RA, Plummer TB, Platt JL. Expression of tissue factor mRNA in cardiac xenografts: clues to the pathogenesis of acute vascular rejection. *Transplantation.* 2000;69:475-482.
143. Neethling FA, Simon PM, Zopf D, Cooper DKC. Delay of antibody-mediated rejection of pig heart transplants in baboons by continuous intravenous infusion with  $\alpha$ -galactosyl oligosaccharide [Abstract 73]. *J Heart Lung Transplant.* 1997;16:59.
144. Neuhof H. *The Transplantation of Tissues.* New York: Appleton; 1923.
145. Norin AJ, Brewer RJ, Lawson N, Grijalva GA, Vaynblatt M, Burton W, Squinto SP, Kamholz S, Fodor WL. Enhanced survival of porcine endothelial cells and lung xenografts expressing human CD59. *Transplant Proc.* 1996;28:797-798.
146. Olbricht CJ, Schaumann D, Fischer D. Anaphylactoid reactions, LDL apheresis with dextran sulphate, and ACE inhibitors. *Lancet.* 1992;340:908-909.
147. Oriol R, Candelier JJ, Taniguchi S, Peters L, Cooper DKC. Major oligosaccharide epitopes found in tissues of 23 animal species, potential donors for organ xenotransplantation. *Transplant Proc.* 1996;28:794.
148. Oriol R, Ye Y, Koren E, Cooper DKC. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets für hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation.* 1993;56:1433-1442.
149. Osman N, McKenzie IF, Ostenried K, Ioannou YA, Desnick RJ, Sandrin MS. Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha1,2,-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Galalpha(1,3)Gal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:14677-14682.

150. Palmer A, Welsh K, Bewick M, Gjorstrup P, Thick M. Removal of anti-HLA antibodies by extracorporeal immunoadsorption to enable renal transplantation. *Lancet*. 1989;1:10-12.
151. Paradis K, Langford G, Lang Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science*. 1999;285:1236-1241.
152. Parker W, Bruno D, Holzkecht ZE, Platt JL. Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J Immunol*. 1994; 153:3791-3803.
153. Parker W, Lin SS, Yu PB, Sood A, Nakamura YC, Song A, Everett ML, Platt JL. Naturally occurring anti-alpha-galactosyl antibodies: relationship to xenoreactive anti-alpha-galactosyl antibodies. *Glycobiology*. 1999;9:865-873.
154. Pascher A, Poehlein C, Stangl M, Thiery J, Mueller-Derlich J, Hammer C. Immunoapheresis, an advanced technique for depleting human anti-porcine antibodies, delays hyperacute rejection of xenogeneic perfused pig livers. *Transplant Proc*. 1997;29:962-963.
155. Pascher A, Stangl M, Hammer C. Impact of immunoadsorption on complement activation, immunopathology, and hepatic perfusion during xenogeneic pig liver perfusion. *Transplantation*. 1998;65:737-740.
156. Patience C, Patton G, Takeuchi Y, Weiss RA, McClure M, Ryberg L, Weiss RA, McClure MO, Rydberg L, Breimer ME. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extra-corporeal connection to pig. *Lancet*. 1998;352:699-701.
157. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med*. 1997;3:282-286.
158. Perper RJ, Narajan JS. Experimental renal heterotransplantation. I. In widely divergent species. *Transplantation*. 1966;4:377-388.
159. Perper RJ, Narajan JS. Experimental renal heterotransplantation. II. Closely related species. *Transplantation*. 1966;4:700-712.

160. Platt JL, Bach FH. Mechanism of tissue injury in hyperacute xenograft rejection. In: Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG, eds. *Xenotransplantation. The Transplantation of Organs and Tissues Between Species*. Berlin: Springer; 1991:69-79.
161. Platt JL, Logan JS. Use of transgenic animals as xenotransplant donors. In: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG, eds. *Xenotransplantation. The Transplantation of Organs and Tissues Between Species*. 2nd ed. Berlin: Springer; 1997:650-658.
162. Platt JL, Vercellotti BJ, Dalmaso AP, Oegema TR, Bach FH, Dalmaso AP. Release of heparan sulfate from endothelial cells: implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J Exp Med*. 1990;171:1363-1368.
163. 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;11:450-457.
164. Platt JL. The immunological barriers to xenotransplantation. *Crit Rev Immunol*. 1996;16:331-358.
165. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*. 1990;50:537-544.
166. Princeteau M. Greffe renale. *J Med Bordeaux*. 1905;26:549.
167. Pruitt SK, Bollinger RR, Collins BH, Marsh HC, Levin JL, Rudolph AR, Baldwin WM, Sanfilippo F. Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate xenografts. *Transplantation*. 1997;63:900-902.
168. Pruitt SK, Kirk AD, Bollinger RR, Marsh HC, Collins BH, Levin JL, Mault JR, Heinle JS, Ibrahim S, Rudolph AR. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts. *Transplantation*. 1994;57:363-370.
169. Ramos A, Ruiz JC, de Francisco AL, Gomez-Fleitas M, Arias M. Removal of xenoreactive antibodies by protein-A immunoabsorption: experience in 22 patients. *Xenotransplantation*. 2000;7:14-20.
170. Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol Reprod*. 2003;69:437-445.

171. Richter WO, Donner MG, Selmaier S, Hiller E, Schwandt P. Efficacy and safety of immunoglobulin apheresis. *ASAIO J.* 1997;43:53-59.
172. Rieben R, Von Allmen E, Korchagina EY. Detection, immunoabsorption and inhibition of cytotoxic activity of anti- $\alpha$ Gal antibodies using newly developed substances with synthetic Gal $\alpha$ 1-3Gal disaccharide epitopes. *Xenotransplantation.* 1995;2:98-104.
173. Robson SC, Candinas D, Siegel JB, Kopp C, Millan M, Hancock WW, Bach FH. Potential mechanism of abnormal thromboregulation in xenograft rejection: loss of ecto-ADPases upon endothelial cell activation. *Transplant Proc.* 1996;28:536.
174. Rollins S, Zhao J, Ninomiya, Sims PJ. Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. *J Immunol.* 1991;146:2345-2351.
175. Romano EL, Neethling FA, Nilsson K, Kosanke S, Shimizu A, Magnusson S, Svensson L, Samuelsson B, Cooper DK. Intravenous synthetic alphaGal saccharides delay hyperacute rejection following pig-to-baboon heart transplantation. *Xenotransplantation.* 1999;6:36-42.
176. Roslin MS, Zisbrod Z, Burack JH, Tranbaugh RF, Strashun A, Jacobowitz IJ, Brewer RJ, Kim Y, Cunningham JN, Norin AJ. Fifteen-day survival in pig-to-baboon heterotopic cardiac xenotransplantation. *Transplant Proc.* 1992;24:572-573.
177. Saadi S, Platt JL. Transient perturbation of endothelial integrity induced by antibodies and complement. *J Exp Med.* 1994;18:2-31.
178. Sablinski T, Gianello PR, Bailin M, Bergen KS, Emery DW, Fishman JA, Foley A, Hatch T, Hawley RJ, Kozlowski T, Lorf T, Meehan S, Monroy R, Powelson JA, Colvin RB, Cosimi AB, Sachs DH. Pig-to-monkey bone marrow and kidney xenotransplantation. *Surgery.* 1997;121:381-391.
179. Sablinski T, Latinne D, Gianello P, Bailin M, Bergen K, Colvin RB, Foley A, Hong HZ, Lorf T, Meehan S, Monroy R, Powelson JA, Sykes M, Tanaka M, Cosimi AB, Sachs DH. Xenotransplantation of pig kidneys to nonhuman primates: I. Development of the model. *Xenotransplantation.* 1995;2:264-270.
180. Sachs DH. The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994;43:185-191.

181. Sachs L. *Angewandte Statistik*. 7. Auflage. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
182. Sahu A, Kay BK, Lambris JD. Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J Immunol*. 1996;157:884-891.
183. Salerno CT, Kulick DM, Yeh CG, Guzman-Paz M, Higgins PJ, Benson BA, Park SJ, Shumway SJ, Bolman RM, Dalmaso AP. A soluble chimeric inhibitor of C3 and C5 convertases, complement activation blocker-2, prolongs graft survival in pig-to-rhesus monkey heart transplantation. *Xenotransplantation*. 2002;9:125-134.
184. Sandrin M, Vaughan H, Dabkowski P, Mackenzie I. Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal ( $\alpha$ 1-3) Gal epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:11391-11395.
185. Sanfilippo F. Exogenous complement inhibition in xenotransplantation. *Xeno*. 1996;4:46-49.
186. Schaapherder AFM, Gooszen HG, TeBulte MTJ, Daha MR. Human complement activation via the alternative pathway on porcine endothelium initiated by IgA antibodies. *Transplantation*. 1995;60:287-291.
187. Schmaldienst S, Goldammer A, Spitzauer S, Derfler K, Horl WH, Knobl P. Local anticoagulation of the extracorporeal circuit with heparin and subsequent neutralization with protamine during immunoadsorption. *Am J Kidney Dis*. 2000;36:490-497.
188. Schmoeckel M, Bhatti FNK, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MD, Goodard M, Warner RG, Langford GA, Dunning JJ, Wallwork J, White DJG. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation*. 1998;65:1570-1577.
189. Schmoeckel M, Cozzi E, Chavez G, Dunning JJ, Wallwork J, White DJG. Xenotransplantation hDAF-transgener Schweineherzen. *Zentralbl Chir*. 1999;124:604-608.
190. Schneider KM, Gaubitz M, Perniok A. Immunoadsorption in systemic connective tissue diseases and primary vasculitis. *Ther Apher*. 1997;1:117-120.
191. Schneider KM. Plasmapheresis and immunoadsorption: different techniques and their current role in medical therapy. *Kidney Int*. 1998;53 Suppl. 64:61-65.



192. Sernetz M, Giese C, Hauptmann U, Hild D. *Klinische Laboratoriumsdiagnostik, Organfunktionsproben (Kursskript)*. 13. Auflage. Gießen: 2000; Kapitel 4 und 6.
193. Shapiro R, Tzakis AG, Scantlebury V, Makowka L, Watt R, Oks A, Yanaga K, Podesta L, Casavilla A, Wos S. Immunodepletion in xenotransplantation. *J Invest Surg*. 1990;3:39-49.
194. Sharma A, Naziruddin B, Cui C, Martin MJ, Xu H, Wan H, Lei Y, Harrison C, Yin J, Okabe J, Mathews C, Stark A, Adams CS, Houtz J, Wiseman BS, Byrne GW, Logan JS. Pig cells that lack the gene for alpha1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*. 2003;75:430-436.
195. Sharma A, Okabe J, Birch P, McClellan SB, Martin MJ, Platt JL, Logan JS. Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:7190-7195.
196. Shinkel DA, Chen CG, Salvaris E, Henion TR, Barlow H, Galili U, Pearse MJ, D'Apice AJ. Changes in cell surface glycosylation in alpha1,3-galactosyltransferase knockout and alpha1,2-fucosyltransferase transgenic mice. *Transplantation*. 1997;64:197-204.
197. Simon PM, Neethling FA, Taniguchi S, Goode PL, Zopf D, Hancock WW, Cooper DK. Intravenous infusion of  $\alpha$ -gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine heart xenografts. *Transplantation*. 1998;65:346-353.
198. Squinto SP, Fodor WL. Engineering of xenografts to provide organs for human transplantation. In: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG, eds. *Xenotransplantation. The Transplantation of Organs and Tissues Between Species*. 2nd ed. Berlin: Springer; 1997:659-664.
199. Stevens RB, Wang YL, Kaji H, Lloveras J, Dalmaso A, Bach FH, Rubinstein P, Sutherland DE, Platt JL. Administration of nonanticoagulant heparin inhibits the loss of glycosaminoglycans from xenogeneic cardiac grafts and prolongs graft survival. *Transplant Proc*. 1993;25:382.
200. Stoffel W, Borberg H, Greve V. Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterinemia. *Lancet*. 1981;1:1005-1007.

201. Stone KR, Ayala G, Goldstein J, Hurst R, Wagenbach A, Galili U. Porcine cartilage transplants in the cynomolgus monkey. III. Transplantation of alpha-galactosidase-treated porcine cartilage. *Transplantation*. 1998;65:1577-1583.
202. Sykes M, Lee LA, Sachs DH. Xenograft tolerance. *Immunol Rev*. 1994;141:245-276.
203. Takeno M, Suzuki N, Nagafuchi H, Mizushima Y, Sakane T. Selective suppression of resting B cell function in patients with systemic lupus erythematoses treated with cyclophosphamide. *Clin Exp Rheumatol*. 1993;11:263-270.
204. Taniguchi S, Neethling FA, Korchagina EY, Bovin N, Ye Y, Kobayashi T, Niekrasz M, Li S, Koren E, Oriol R, Cooper DK. In vivo immunoadsorption of anti-pig antibodies in baboons using a specific Gal $\alpha$ 1-3Gal column. *Transplantation*. 1996;62:1379-1384.
205. Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, Katerelos M, Shinkel TA, Van Denderen BJ, Lonie AJ, Lyons I, Nottle MB, Cox T, Becker C, Peura AM, Wigley PL, Crawford RJ, Robins AJ, Pearse MJ, D'Apice AJ. The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation*. 1996;61:13-19.
206. Toepfer M, Sitter T, Burchardi C, Held E, Schiffel H. Klinische Immunadsorption. *Dtsch Med Wochenschr*. 1999;124:461-465.
207. Toepfer M, Sitter T, Spannagl M, Schramm W, Müller-Felber W, Pongratz D, Held E, Schiffel H. Zirkulierende Immunglobuline selektiv entfernen. *Fortschr Med*. 1999;117:38-39.
208. Toepfer M, Sitter T, Spannagl M, Schramm W, Müller-Felber W, Pongratz D, Held E, Schiffel H: Extrakorporale antikörperbasierte Immunapherese – Evaluation einer neuen Methode zur selektiven Elimination zirkulierender Immunglobuline. *Fortschr Med*. 1999;117:1-5.
209. Ullman E. Tissue and organ transplantation. *Ann Surg*. 1914;60:195-219.
210. Unger E. Transplantation des vaisseaux et des organes. *B Fur Chir*. 1908;46:1367-1370.
211. 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. *Transpl Int*. 2000;13 Suppl 1:S504-S507.

212. Vangerow B, Hecker JM, Lorenz R, Loss M, Przemeck M, Appiah R, Schmidtko J, Jalali A, Rueckoldt H, Winkler M. C1-Inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation*. 2001;8:266-272.
213. Vial CM, Ostlie DJ, Bhatti FN, Cozzi E, Goddard M, Chavez GP, Wallwork J, White DJ, Dunning JJ. Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19:224-229.
214. Wallukat G, Reinke P, Dörffel WV, Luther HP, Bestvater K, Felix SB, Baumann G. Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *Int J Cardiol*. 1996;54:191-195.
215. Waterworth PD, Cozzi E, Tolan MJ, Langford G, Braidley P, Chavez G, Dunning J, Wallwork J, White D. Pig-to-primate cardiac xenotransplantation and cyclophosphamide therapy. *Transplant Proc*. 1997;29:899-900.
216. Waterworth PD, Dunning JJ, Tolan M, Cozzi E, Langford G, Chavez G, White D, Wallwork J. Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1998;17:1201-1207.
217. White DJG, Langford GA, Cozzi E, Young VJ. Production of pigs transgenic for human DAF: a strategy for xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 1995;2:213-217.
218. Williams PW. Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. *BMJ*. 1894;ii:1303-1304.
219. Woolnough JA, Misko JS, Lafferty KJ. Cytotoxic and proliferative lymphocyte response to allogeneic and xenogeneic antigens in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1979;57:467-477.
220. Xu H, Gundry SR, Hancock WW, Matsumiya G, Zuppan CW, Morimoto T, Slater J, Bailey LL. Prolonged discordant xenograft survival and delayed xenograft rejection in a pig-to-baboon orthotopic cardiac xenograft model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;115:1342-1349.
221. Xu Y, Lorf T, Sablinski T, Gianello P, Bailin M, Monroy R, Kozlowski T, Awwad M, Cooper DKC, Sachs DH. Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4 $\beta$ Glc-X immunoaffinity column. *Transplantation*. 1998;65:172-179.

222. Ye Y, Neethling FA, Niekrasz M, Koren E, Richards SV, Martin M, Kosanke S, Oriol R, Cooper DK. Evidence that intravenously administered  $\alpha$ -galactosyl carbohydrates reduce serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts. *Transplantation*. 1994;58:330-337.
223. Ye Y, Neethling FA, Niekrasz M, Richards SV, Koren G, Merhav H, Kosanke S, Oriol R, Cooper DK. Intravenous administration of  $\alpha$ -galactosyl carbohydrates reduces in vivo baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells and transplanted pig hearts. *Transplant Proc*. 1994;26:1399.
224. Yeatman M, Daggett CW, Byrne GW, Logan JS, Platt JL, Davis RD. Complement-mediated pulmonary xenograft injury: studies in swine-to-primate orthotopic single lung transplant models. *Transplantation*. 1998;65:1084-1093.
225. Yi S, Feng X, Hawthorne WJ, Patel AT, Walters SN, O'Connell PJ. CD4+ T cells initiate pancreatic islet xenograft rejection via an interferon-gamma-dependent recruitment of macrophages and natural killer cells. *Transplantation*. 2002;73:437-446.
226. Yoo D, Giulivi A. Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res*. 2000;64:193-203.
227. Zaidi A, Friend P, Schmoeckel M, Bhatti F, Waterworth P, Tolan M, Cozzi E, Chavez G, Langford G, Thiru S, Wallwork J, White D, Friend P. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation*. 1998;65:1584-1590.

## 8. Anhang

### 8.1. Maßeinheiten und Abkürzungen

<b>Abkürzung:</b>	<b>Maßeinheit:</b>
%	Prozent
1:n	Eins zu n (Titerstufe des Anti-pig-Antikörpertiters)
d	Tage
F	French
G/l	10 <sup>9</sup> pro Liter
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunden
I.E.	Internationale Einheiten
I.E./kg	Internationale Einheiten pro Kilogramm Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
Min./min; 30'	Minuten; 30 Minuten
min <sup>-1</sup>	pro Minute
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
pH	pH-Wert
U/min	Umdrehungen pro Minute

## Verwendete Abkürzungen:

#	Nummer des Versuchstieres
±	Gibt den Standardfehler des Mittelwertes an
<	Kleiner als
A.	Arteria
α1-3Gal	Endständiger α(1-3)Galactoserest
ACT	<i>Activated clotting time</i> (Gerinnungszeit)
ADA	Adsorptions-Desorptions-Automat
αGal	α(1-3)Galactose
ALG	Antilymphozytenglobulin
ATG	Antithymozytenglobulin
AVR	Akute vaskuläre Abstoßung
AZT	Azathioprin (Immunsuppressivum)
BM11	Blutpumpe zur Immunadsorption
B-Zelle	Lymphozyt, der sich in sekundärem lymphatischem Gewebe differenziert
C3	Komplementfaktor C3
C4	Komplementfaktor C4
CAB-2.0	<i>Complement activation blocker-2.0</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> (T-Zell-Subtyp)
CD59	Protectin (Komplementregulationsfaktor)
CH50	Totale Komplementaktivität
CK-MB	Kreatinkinase, Subtyp MB (herzmuskelspezifisch)
CL-4b	Subtyp der Sepharose (kugelförmiges Makromolekül)
CR-1	<i>Complement receptor-1</i>
CRP	Komplementregulationsprotein
CS	Corticosteroide
CVF	<i>Cobra venom factor</i>
CyA	Cyclosporin A (Immunsuppressivum)
Cyn.	Cynomolgusaffe
DAF	<i>Decay accelerating factor</i>
DSG	15-Deoxyspergualin (Immunsuppressivum)
E	Extinktion
EKG	Elektrokardiogramm

EP12	Plasmapumpe zur Immunadsorption
F <sub>ab</sub> -Teil	Antigenbindende Region eines Immunglobulinmoleküls
F <sub>c</sub> -Teil	Nicht antigenspezifische Region eines Immunglobulin-Moleküls; bestimmt die Immunglobulinklasse
FK-506	Tacrolimus (Immunsuppressivum)
FUT-175	Synthetischer Komplementinhibitor
HAR	Hyperakute Abstoßung
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
hDAF	<i>Human decay accelerating factor (CD55)</i>
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	Hauptkomplex der Histokompatibilitätsantigene
hMCP	<i>Human membrane cofactor protein (CD46)</i>
hXHTx	Heterotope Herz-Xenotransplantation
i.m.	Intramuskuläre Medikamentenapplikation
i.v.	Intravenöse Medikamentenapplikation
IA	Immunadsorption
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IS	Immunsuppression
I-κB	Inhibitor von NF-κB
K76COOH	Synthetischer Komplementinhibitor
KMTx	(xenogene) Knochenmarktransplantation
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MAC	<i>Membrane attack complex</i>
MCP	<i>Membrane cofactor protein (CD46)</i>
MCV	<i>Mean cellular volume</i> (Erythrozyten)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMF	Mycophenolat Mofetil (Immunsuppressivum)
MTX	Methotrexat (Immunsuppressivum)
n	Anzahl der Versuchstiere
N <sub>2</sub> O	Lachgas
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor

NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NYHA	<i>New York Heart Association Classification</i> (gibt den Grad der Herzinsuffizienz an)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OP	Organperfusion
oXHTx	Orthotope Herz-Xenotransplantation
p.o.	Orale Medikamentenapplikation
Pav.	Pavian
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PERV	<i>Porcine endogenous retrovirus</i>
PK15	<i>Pig kidney</i> -Zelllinie
PP	Plasmapherese
Protein A	Staphylokokken-Protein A
Rhes.	Rhesusaffe
s.	siehe
sCR-1	<i>Soluble complement receptor-1</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
tgl.	täglich
TI	Thymusbestrahlung
TLI	Totale Lymphbestrahlung
T-Zelle	Lymphozyt, der sich im Thymus differenziert
V.	Vena
WBI	Ganzkörperbestrahlung
XT	Xenotransplantation
ZVK	Zentralvenöser Katheter



## 8.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

<b>Abbildungen:</b>	<b>Seite</b>
<i>Abb. 1.1.: Der Mangel an Organen für Transplantationen.</i> .....	1
<i>Abb. 1.2.: Aktivierung und Regulation des klassischen Komplementweges.</i> .....	7
<i>Abb. 1.3.: Pathogenese der hyperakuten Xenotransplantatabstoßung.</i> .....	8
<i>Abb. 1.4.: Pathogenese der akuten vaskulären Xenotransplantatabstoßung.</i> .....	10
<i>Abb. 1.5.: Mögliche Resultate diskordanter Xenotransplantationen.</i> .....	10
<i>Abb. 1.6.: Therapeutische Ansätze zur Vermeidung der diskordanten Xenotransplantatabstoßung.</i> .....	21
<i>Abb. 3.1.: Schematische Darstellung einer Ig-Therasorb®-Säule.</i> .....	27
<i>Abb. 3.4.: Heidelberger-Kendall-Kurve.</i> .....	35
<i>Abb. 3.5.: Verwendete graphische Darstellungen.</i> .....	39
<i>Abb. 4.1.: Puls und Blutdruck während einer präoperativen Immunadsorptionsbehandlung.</i> .....	43
<i>Abb. 4.2.: Puls und Blutdruck während einer Immunadsorptionsbehandlung bei einem kleinen Affen.</i> .....	44
<i>Abb. 4.3.: Reduktion des Anti-Pig-Antikörpertiters durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).</i> .....	46
<i>Abb. 4.4.: Anti-Pig-Antikörpertiter im Verlauf der Behandlung bei einem Pavian mit hohem und einem mit niedrigem Ausgangstitern.</i> .....	46
<i>Abb. 4.5.: IgG-Reduktion durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).</i> .....	47
<i>Abb. 4.6.: IgM-Reduktion durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).</i> .....	48
<i>Abb. 4.7.: IgA-Reduktion durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).</i> .....	48
<i>Abb. 4.8.: Reduktion von Komplementfaktor C3 durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).</i> .....	49
<i>Abb. 4.9.: Reduktion von Komplementfaktor C4 durch die Immunadsorption (Langzeitstudien).</i> .....	50
<i>Abb. 4.10.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.</i> .....	54
<i>Abb. 4.11.: Verlauf des IgG-Spiegels bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.</i> .....	55
<i>Abb. 4.12.: Verlauf des IgM-Spiegels bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.</i> .....	55
<i>Abb. 4.13.: Verlauf des IgA-Spiegels bei Cynomolgus- und Rhesusaffen.</i> .....	56
<i>Abb. 4.14.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei den Vorstudien mit Pavianen.</i> .....	57
<i>Abb. 4.15.: Verlauf des IgG-Spiegels bei den Vorstudien mit Pavianen.</i> .....	58
<i>Abb. 4.16.: Verlauf des IgM-Spiegels bei den Vorstudien mit Pavianen.</i> .....	59
<i>Abb. 4.17.: Verlauf des IgA-Spiegels bei den Vorstudien mit Pavianen.</i> .....	59
<i>Abb. 4.18.: Verlauf des Spiegels von Komplementfaktor C3 bei den Vorstudien mit Pavianen.</i> .....	60
<i>Abb. 4.19.: Verlauf des Spiegels von Komplementfaktor C4 bei den Vorstudien mit Pavianen.</i> .....	60
<i>Abb. 4.20.: Verlauf der Kreatinkinase-MB Masse bei den Vorstudien mit Pavianen.</i> .....	61
<i>Abb. 4.21.: Verlauf der Leukozytenzahl bei den Vorstudien mit Pavianen.</i> .....	62
<i>Abb. 4.22.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).</i> .....	63
<i>Abb. 4.23.: Verlauf des IgG-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).</i> .....	65
<i>Abb. 4.24.: Verlauf des IgM-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).</i> .....	65
<i>Abb. 4.25.: Verlauf des IgA-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen).</i> .....	66

Abb. 4.26.: Verlauf des C3-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen). .....	67
Abb. 4.27.: Verlauf des C4-Spiegels bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen). .....	67
Abb. 4.28.: Verlauf der Leukozytenzahl bei Pavian13 (hXHTx mit Landrasseschweineherz, Langzeitstudie).	68
Abb. 4.29.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen). .....	69
Abb. 4.30.: Verlauf der Immunglobulinspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen). .....	70
Abb. 4.31.: Verlauf der Komplementspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen). .....	71
Abb. 4.32.: Verlauf der Kreatinkinase-MB Masse bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen). .....	72
Abb. 4.33.: Verlauf der Leukozytenzahl bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen). .....	73
Abb. 4.34.: Verlauf der Thrombozytenzahl bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen). .....	73
Abb. 4.35.: Verlauf des Anti-Pig-Antikörpertiters bei den Langzeitstudien mit Pavianen (oXHTx mit IA). .....	74
Abb. 4.36.: Verlauf der Immunglobulinspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (oXHTx mit IA). .....	75
Abb. 4.37.: Verlauf der Komplementspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (oXHTx mit IA). .....	75
Abb. 4.38.: Verlauf von Hämatokrit und Thrombozyten am Beispiel von Pavian 9 (oXHTx mit IA, Langzeitstudie). .....	76
Abb. 5.1.: Verlauf der Immunglobulinspiegel während mehrerer Immunadsorptionsbehandlungen bei einem Patienten. ....	81

<b>Tabellen:</b>	<b>Seite</b>
Tab. 1.1.: Veröffentlichte Berichte von klinischen Xenotransplantationen von Herzen. ....	4
Tab. 1.2.: Xenotransplantationen von Schweineorganen bei Primaten nach der Depletion xenoreaktiver Antikörper des Empfängers. ....	16
Tab. 1.3.: Xenotransplantationen bei Primaten unter Verwendung von transgenen Schweineorganen. ....	19
Tab. 3.1.: Bezugsquellen der Tiere. ....	24
Tab. 3.2.: Übersicht über die Vorstudien. ....	24
Tab. 3.3.: Übersicht über die Langzeitstudien mit Pavianen. ....	25
Tab. 3.4.: Handelsnamen und Hersteller der verwendeten Immunsuppressiva. ....	33
Tab. 4.1.: Dosierung der Antikoagulation mit Heparin zu Beginn der Behandlung und ACT (activated clotting time) nach Heparin-gabe. ....	40
Tab. 4.2.: Übersicht über die Immunadsorptionsbehandlungen. ....	41
Tab. 4.3.: Anti-Pig-Antikörpertiter vor und nach IA bei den Vorstudien. ....	45
Tab. 4.4.: Übersicht über die Versuchsgruppen mit Überlebenszeiten und Art der Abstoßungsreaktion. ....	52
Tab. 4.5.: Kreatinkinase-MB Masse 60 Min. nach Reperfusionsbeginn bei Cynomolgus- und Rhesusaffen...	56
Tab. 4.6.: Intraoperativer Verlauf der Immunglobulinspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen). ....	64
Tab. 4.7.: Intraoperativer Verlauf der Komplementspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit Landrasseschweineherzen). ....	66

<i>Tab. 4.8.: Intraoperativer Verlauf der Immunglobulinspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen). .....</i>	70
<i>Tab. 4.9.: Intraoperativer Verlauf der Komplementspiegel bei den Langzeitstudien mit Pavianen (hXHTx mit hDAF-transgenen Schweineherzen). .....</i>	71
<i>Tab. 5.1.: Reduktion des Anti-Pig-Antikörpertiters bei Pavianen mit einem Gewicht von 15-25 kg. ....</i>	86
<i>Tab. 5.2.: Reduktion von IgM im Verhältnis zur Zyklenzahl bei Pavianen mit einem Gewicht von 15-25 kg....</i>	87

### 8.3. Publikationsverzeichnis

#### Buchartikel und Originalarbeiten:

1. Brenner P, **Eder V**, Hammer C, Reichart B. Reduktion xenoreaktiver Antikörper durch Immunoabsorption. In: Grimm H, Hrsg. *Xenotransplantation*. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag; 2002:56-74.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

#### Multimediale Publikationen:

1. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, **Eder V**, Wimmer C, Rucker A, Hinz M, Felbinger T, Kriegeskorte S, Uchita S, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Einsatz der Ig-Therasorb-Säulenadsorption bei Pavianen zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßungsreaktion nach orthotoper Xenotransplantation von Schweineherzen. In: Grimm H, Hrsg. *3. Symposium Xenotransplantation 1999*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1999: electronic media, Multimediale Bibliothek der Medizin, ISBN: 3-540-14830-2.

2. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, **Eder V**, Wimmer C, Rucker A, Hinz M, Felbinger T, Kriegeskorte S, Uchita S, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Technik der Immunadsorption bei heterotoper und orthotoper Xenotransplantation von Schweineherzen bei Cynomolgus- und Rhesusaffen. In: Grimm H, Hrsg. *3. Symposium Xenotransplantation 1999*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1999: electronic media, Multimediale Bibliothek der Medizin, ISBN: 3-540-14830-2.

### **Abstracts:**

1. **Eder V**, Hinz M, Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Rucker A, Wimmer C, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Technique of immunoadsorption in heterotopic and orthotopic xenotransplantation of pig hearts in cynomolgus and rhesus monkeys [Abstract 1114]. *9th Congress of the European Society for Organ Transplantation*. 19.-24.06.1999; Oslo, Norwegen.
2. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, **Eder V**, Rucker A, Wimmer C, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Treatment of cynomolgus and rhesus monkeys by immunoabsorption before xenotransplantation with pig hearts. *Transplantation*. 1999;67:136.
3. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, **Eder V**, Rucker A, Wimmer C, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Treatment of cynomolgus and rhesus monkeys by immunoabsorption before xenotransplantation with pig hearts. *American Society of Transplantation, 18th Annual Scientific Meeting*. 15.-19.05.1999; Chicago, IL, USA.
4. Brenner P, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Uchita S, Hinz M, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Immunoadsorption prevents the hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons. *1<sup>st</sup> Regensburg Immunology Meeting*. 15.-16.10.1999; Regensburg.
5. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, **Eder V**, Rucker A, Wimmer C, Uchita S, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Technique of immunoapheresis in heterotopic and orthotopic xenotransplantation of pig hearts in cynomolgus and rhesus monkeys [Abstract 1142]. *The 5th Congress of the International Xenotransplantation Association*. 24.-28.10.1999; Nagoya, Japan.

6. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, **Eder V**, Wimmer C, Rucker A, Hinz M, Felbinger T, Kriegeskorte S, Uchita S, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Einsatz der Ig-Therasorb-Säulenadsorption bei Pavianen zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßungsreaktion nach orthotoper Xenotransplantation von Schweineherzen. *3. Symposium Xenotransplantation*. 20.-21.11.1999; Rauschholzhausen.
7. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, **Eder V**, Wimmer C, Rucker A, Hinz M, Felbinger T, Kriegeskorte S, Uchita S, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Technik der Immunadsorption bei heterotoper und orthotoper Xenotransplantation von Schweineherzen bei Cynomolgus- und Rhesusaffen. *3. Symposium Xenotransplantation*. 20.-21.11.1999; Rauschholzhausen.
8. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Kriegeskorte S, Uchita S, Hinz M, Meiser B, Müller-Höcker J, Hammer C, Reichart B. Heterotopic and orthotopic xenotransplantation of hDAF transgenic pig hearts. *Eur J Surg Res*. 2000;32:253.
9. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Felbinger T, Uchita S, Hinz M, Müller-Höcker J, Meiser B, Hammer C, Reichart B. 20 days survival: orthotopic xenotransplantation of hDAF-transgenic pig hearts into baboons. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;48:99-100.
10. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Uchita S, Hinz M, Müller-Höcker J, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Twenty days survival after orthotopic xenotransplantation of hDAF-transgenic pig hearts into baboons. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19:67.
11. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Felbinger T, Hinz M, Uchita S, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Immunoadsorption treatment of hyperacute and delayed xenograft rejection after xenotransplantation of landrace and hDAF transgenic pig hearts into baboons. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19:67.

12. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Felbinger T, Hinz M, Hammer C, Reichart B. Immunoapheresis for prevention of hyperacute and delayed xenograft rejection after heterotopic and orthotopic xenotransplantation of landrace pig hearts in a baboon model. *18<sup>th</sup> International Cardiovascular Surgical Symposium*. 26.02.-04.03.2000; Zürs, Österreich.
13. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Uchita S, Hinz M, Müller-Höcker J, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Orthotopic heart xenotransplantation (20 days survival) in a hDAF-transgenic pig-to-baboon model. *Transplant 2000, the 1<sup>st</sup> Joint Meeting of the American Society of Transplant Surgeons and the American Society of Transplantation*. 13.-17.05.2000; Chicago, IL, USA.
14. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Felbinger T, Hinz M, Uchita S, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Combination of hDAF-transgenic pig hearts and immunoabsorption in heterotopic xenotransplantation of immunosuppressed baboons [Abstract P0290W]. *18<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society*. 27.08.-01.09.2000; Rom, Italien.
15. Wimmer C, Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, **Eder V**, Rucker A, Felbinger T, Hinz M, Uchita S, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Orthotopic xenotransplantation of landrace pig hearts into baboons after immunoabsorption and immunosuppression [Abstract P0314]. *18<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society*. 27.08.-01.09.2000; Rom, Italien.
16. Wimmer C, Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, **Eder V**, Rucker A, Felbinger T, Uchita S, Müller-Höcker J, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Pre- and postoperative immunoapheresis to prevent hyperacute and acute vascular rejection after heterotopic xenotransplantation of landrace pig hearts into baboons [Abstract P0322]. *18<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society*. 27.08.-01.09.2000; Rom, Italien.
17. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Uchita S, Felbinger T, Hinz M, Müller-Höcker J, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Orthotopic heart xenotransplantation (20 days survival) in a DAF-transgenic pig-to-baboon model. *Transplant 2001. The American Society of Transplantation*. 11.-16.05.2001; Chicago, IL, USA.

18. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Felbinger T, Hinz M, Uchita S, Müller-Höcker J, Meiser B, Lamm P, Schütz A, Hammer C, Reichart B. Prevention of hyperacute and acute vascular rejection after heterotopic and orthotopic xenotransplantation of landrace pig hearts into baboons utilizing immunoadsorption. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;49:25.
19. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Felbinger T, Hinz M, **Eder V**, Wimmer C, Rucker A, Shammohamadi M, Kriegeskorte S, Uchita S, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Verhinderung der hyperakuten Abstoßungsreaktion nach heterotoper und orthotoper Xenotransplantation von Schweineherzen bei Cynomolgus- und Rhesusaffen mit Hilfe der Immunapherese. *Transplantationsmedizin.* 1999(Suppl);1:132.
20. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Rucker A, Wimmer C, **Eder V**, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Immunoadsorption technique in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons. *Transplantation.* 1999;67:117.
21. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Müller-Höcker J, Hammer C, Reichart B. IG-therasorb immunoapheresis in orthotopic xenotransplantation of baboons with landrace pig hearts. *Transplantation.* 1999;67:594.
22. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Hinz M, Meiser B, **Eder V**, Wimmer C, Rucker A, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Heterotopic and orthotopic xenotransplantation of pig hearts into cynomolgus and rhesus monkeys after immunoadsorption. *Transplantation.* 1999;67:595.
23. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Hinz M, Felbinger T, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Antibody and complement removal with Ig-Therasorb-column prevents hyperacute xenograft rejection of pig hearts in a working heart model [Abstract 50]. *17<sup>th</sup> International Cardiovascular Surgical Symposium.* 06.-13.03.1999; Züri, Österreich.
24. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Hinz M, Felbinger T, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Technique of immunoadsorption in orthotopic xenotransplantation of pig hearts in baboon model for prevention of hyperacute xenograft rejection [Abstract 61]. *17<sup>th</sup> International Cardiovascular Surgical Symposium.* 06.-13.03.1999; Züri, Österreich.



25. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Rucker A, Wimmer C, **Eder V**, Hammer C, Reichart B. Technik der Ig-Therasorb-Säulenadsorption zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) im Pavianmodell bei orthotoper Xenotransplantation (oXHTx) von Schweineherzen [Kurzreferat 116]. *116. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie*. 06.-10.04.1999; München.
26. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Hinz M, Felbinger T, Müller-Höcker J, Seidel D, Hammer C, Reichart B. Heterotope und orthotope Xenotransplantation von Schweineherzen bei Cynomolgus- und Rhesusaffen mit Hilfe von Immunoabsorption. *65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung*. 08.-10.04.1999; Mannheim.
27. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Hinz M, Felbinger T, Müller-Höcker J, Seidel D, Hammer C, Reichart B. Technique of immunoabsorption in orthotopic xenotransplantation of pig hearts in baboons [Abstract PP61]. *34th Congress of the European Society of Surgical Research*. 22.-24.04.1999; Bern, Schweiz.
28. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Hinz M, Felbinger T, Müller-Höcker J, Seidel D, Hammer C, Reichart B. Technique of immunoabsorption in orthotopic xenotransplantation of pig hearts in baboons [Abstract PP146]. *34th Congress of the European Society for Surgical Research*. 22.-24.04.1999; Bern, Schweiz.
29. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Rucker A, Wimmer C, **Eder V**, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Immunoabsorption technique in orthotopic xenotransplantation of pig hearts in baboons. *American Society of Transplantation, 18th Annual Scientific Meeting*. 15.-19.05.1999; Chicago, IL, USA.
30. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts in baboons using immunoabsorption [Abstract 238]. *9th Congress of the European Society for Organ Transplantation*. 19.-24.06.1999; Oslo, Norwegen.

Biotest Preis 1999

31. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Uchita S, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. 20 days survival after orthotopic xenotransplantation of a hDAF-transgenic pig heart into a baboon [Abstract 1141A]. *The 5th Congress of the International Xenotransplantation Association*. 24.-28.10.1999; Nagoya, Japan.
32. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Uchita S, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Prevention of hyperacute xenograft rejection of pig hearts by immunoadsorption in an orthotopic xenotransplantation model with baboons [Abstract 1141B]. *The 5th Congress of the International Xenotransplantation Association*. 24.-28.10.1999; Nagoya, Japan.
33. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Felbinger T, Wimmer C, **Eder V**, Rucker A, Uchita S, Hinz M, Müller-Höcker J, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Xenograft survival (20 days) of hDAF-transgenic pig hearts transplanted orthotopically into baboons [Abstract P0313]. *18<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society*. 27.08-01.09.2000; Rom, Italien.
34. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Hinz M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Uchita S, Kriegeskorte S, Meiser B, Müller-Höcker J, Seidel D, Hammer C, Reichart B. Orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons after immunoadsorption (Ig-Therasorb column) [Abstract V108]. In: Teupser D, Enders G, Demant T, Seidel D, eds. *Research Festival 1999*. München: MMW Taschenbuch-Verlag Urban & Vogel; 1999:145.
35. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Hinz M, Wimmer C, Rucker A, **Eder V**, Uchita S, Kriegeskorte S, Meiser B, Müller-Höcker J, Seidel D, Hammer C, Reichart B. Immunoapheresis technique (Ig-Therasorb column) in heterotopic and orthotopic xenotransplantation of pig hearts into cynomolgus and rhesus monkeys [Abstract P296]. In: Teupser D, Enders G, Demant T, Seidel D, eds. *Research Festival 1999*. München: MMW Taschenbuch-Verlag Urban & Vogel; 1999:447.

## 8.4. Danksagung

Zuerst möchte ich meinen Eltern für die Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit und in der ganzen Zeit meines Studiums danken.

Mein Dank gilt außerdem allen, die zur Durchführung und Auswertung der Versuche beigetragen haben, den Ärzten der Herzchirurgischen Klinik sowie dem Personal des Instituts für Chirurgische Forschung.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. med. Paolo Brenner für die intensive Betreuung und Unterstützung, während diese Arbeit entstand, sowie bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Claus Hammer für die Mitbetreuung.

Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Bruno Reichart für die Überlassung des Themas danken.

Ohne das Institut für Chirurgische Forschung, das uns die Räumlichkeiten und die Ausrüstung zur Verfügung gestellt hat, wäre die Durchführung der Versuche nicht möglich gewesen. Mein Dank hierfür gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Konrad Meßmer.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Dietrich Seidel und dem Institut für Klinische Chemie danke ich für die Durchführung der Laborbestimmungen sowie dem Pathologischen Institut für die histologische Befundung.

Diese Studie entstand mit der finanziellen Unterstützung der Bayerischen Forschungsförderung. Die Firma Imutran Novartis (Cambridge, UK) stellte uns freundlicherweise kostenlos hDAF-transgene Schweine zur Verfügung.

Sachmittel wurden uns freundlicherweise von den Firmen Baxter Therasorb, Unterschleißheim (jetzt: PlasmaSelect AG, Martinsried), und Novartis AG, Erlangen, zur Verfügung gestellt.

## 8.5. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Veronika Edeltraud Theresia Eder  
Geburtsdatum: 8. Dezember 1975  
Geburtsort: München  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung:

09/1982-07/1986 Grundschole, München  
09/1986 - 07/1995 Altsprachliches Gymnasium, München  
Abschluss mit dem Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife

### Studium:

WS 1995/96 – WS 2002/03: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
09/1997 Ärztliche Vorprüfung  
06/1998 Erster Teil des Amerikanischen Staatsexamens (USMLE)  
08/1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
09/2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
10/2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr:

10/2001-02/2002 Radiologie, Institut für Klinische Radiologie, Klinikum der Universität München-Innenstadt  
02/2002-05/2002 Innere Medizin, Medizinische Poliklinik, Klinikum der Universität München-Innenstadt  
05/2002-09/2002 Chirurgie, Krankenhaus des Dritten Ordens München-Nymphenburg

### Ärztin im Praktikum:

Seit 06/2003 Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Universität München  
Wissenschaftliche Mitarbeit in der Forschungsgruppe BioSeparation (Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos):  
Untersuchung von Toxin-bindenden Adsorbentien für die Entwicklung von Aphereseverfahren bei Organversagen.