

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Vergleich der orthotopen mit der heterotopen kardialen  
Xenotransplantation im Schwein-Pavian-Modell unter  
Berücksichtigung von ein-/mehrfach transgenen Spenderorganen  
und verschiedenen immunsuppressiven Protokollen**

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

vorgelegt von  
Maureen Margaret Loewenthal  
aus  
Bochum  
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Robert Dalla Pozza

Prof. Dr. med. Simon Rothenfußer

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Paolo Brenner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2013

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	6
1.1.	Organspendemangel in der Transplantationsmedizin.....	6
1.2.	Definition und Geschichte der Xenotransplantation .....	8
1.3.	Das Schwein als Organspender für die xenogene Herztransplantation	11
1.4.	Abstoßungsmechanismen im diskordanten Transplantationsmodell ...	13
1.4.1.	Hyperakute Abstoßung.....	13
1.4.2.	Akute Abstoßung.....	16
1.4.3.	Chronische Abstoßung.....	18
1.4.4.	Akkommodation und Toleranz.....	18
1.5.	Strategien zur Überwindung xenogener Abstoßungsmechanismen ...	19
1.5.1.	Hyperakute Abstoßung.....	19
1.5.2.	Akute und chronische Abstoßung.....	20
1.5.3.	Der lösliche Fc-Rezeptor FcγRIIB.....	24
1.6.	Der Einsatz unterschiedlicher immunmodulatorischer Protokolle auf dem Weg zur klinischen Xenotransplantation.....	26
1.7.	Vom orthotopen zum heterotopen Transplantationsmodell.....	27
2.	Fragestellung.....	29
3.	Material und Methoden.....	30
3.1.	Versuchstiere .....	30
3.1.1.	Spendertiere.....	30
3.1.2.	Empfängertiere.....	32
3.2.	Durchführung der heterotopen abdominalen Herztransplantation.....	33
3.2.1.	Spenderoperation.....	33
3.2.1.1.	Anästhesie .....	33
3.2.1.2.	Herzexplantation .....	34
3.2.2.	Empfängeroperation.....	35
3.2.2.1.	Anästhesie .....	35
3.2.2.2.	Herzimplantation .....	36
3.3.	Postoperative Überwachung und Versorgung.....	38
3.3.1.	Klinisch-chemische Diagnostik.....	39
3.3.2.	Immunsuppressive Therapie .....	40

3.4. Abstoßungsdiagnostik.....	42
3.4.1. Zytotoimmunologisches Monitoring .....	42
3.4.2. Anti- $\alpha$ Gal-Antikörper-ELISA.....	43
3.4.3. Anti-Schwein-Antikörper-ELISA.....	45
3.4.4. Interleukin-6-Spiegel-Bestimmung .....	47
3.4.5. TNF $\alpha$ -Spiegel-Bestimmung .....	47
3.5. Endpunkte der Studie .....	47
3.6. Präparatentnahme und Pathologie .....	48
3.7. Statistik .....	49
4. Ergebnisse.....	50
4.1. Transplantatüberleben und Studienendpunkte .....	50
4.2. Abstoßungsdiagnostik.....	54
4.2.1. Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper .....	54
4.2.2. Anti-Schwein-Antikörper.....	55
4.2.3. Zytotoimmunologisches Monitoring .....	57
4.2.4. TNF- $\alpha$ .....	58
4.2.5. Interleukin-6-Spiegel.....	59
4.3. Klinisch-chemische Diagnostik.....	60
4.3.1. Troponin .....	60
4.3.2. Leukozyten .....	61
4.3.3. Hämoglobin .....	62
4.4. Pathologischer Befund.....	63
4.4.1. Herzgewichte.....	63
4.4.2. Transgenität der Spendertiere.....	64
4.4.3. Histopathologischer und immunhistochemischer Befund .....	65
5. Diskussion .....	72
5.1. Die Überwindung der hyperakuten xenogenen Abstoßung und die Bedeutung von hDAF in der Gal-knockout-Ära.....	72
5.2. Die Bekämpfung der nicht- $\alpha$ Gal-spezifischen Immunantwort zur Überwindung der akut vaskulären Abstoßungsreaktion.....	75
5.2.1. Die Bedeutung von B-Zell-Depletion und Antikörperelimination ....	75
5.2.2. Die Bedeutung des löslichen Fc-Rezeptors Fc $\gamma$ RIIb als Bestandteil des immunologischen Protokolls.....	77

5.2.3. Weitere Immunmodulatoren .....	78
5.3. Die Identifikation der nicht- $\alpha$ Gal(1,3)Gal-spezifischen Antikörper.....	79
5.4. Tacrolimus, Sirolimus, Methylprednisolon und ATG als immunsuppressive Basis gegen die akut zelluläre xenogene Abstoßung .....	80
5.5. Thrombotische Mikroangiopathie .....	82
5.5.1. Systemische Antikoagulanzien.....	82
5.5.2. Die Expression antikoagulativer Gene auf porcinen Endothelien ..	84
5.6. Vor- und Nachteile des orthotopen und heterotopen Transplantationsmodells .....	84
5.7. Schlussfolgerung .....	88
6. Zusammenfassung .....	90
7. Literaturverzeichnis .....	93
8. Anhang .....	112
8.1. Materialienliste .....	112
Versuchstiere .....	112
8.2. Untersuchungsprotokoll .....	119
8.3. Zytoimmunologisches Monitoring.....	121
8.4. Abbildungsverzeichnis .....	122
8.5. Abkürzungsverzeichnis .....	124
9. Danksagung .....	126

# 1. Einleitung

## 1.1. Organspendemangel in der Transplantationsmedizin

Täglich werden in Deutschland durchschnittlich 11 Organe in den bundesweit 50 erfassten Transplantationszentren übertragen. Ziel ist es, den derzeit rund 12.000 Patienten in Deutschland, die auf ein geeignetes Spenderorgan angewiesen sind, möglichst schnell mit einer Transplantation zu helfen. Trotz öffentlicher Aufklärungsarbeit und Aufruf zur Organspende liegt die Zahl der pro Jahr zur Transplantation neu angemeldeten Patienten deutlich höher als die jährlich realisierten Organtransplantationen (*Abbildung 1.1*). Dies liegt an dem weltweiten Organspendemangel (Hertz 2009).

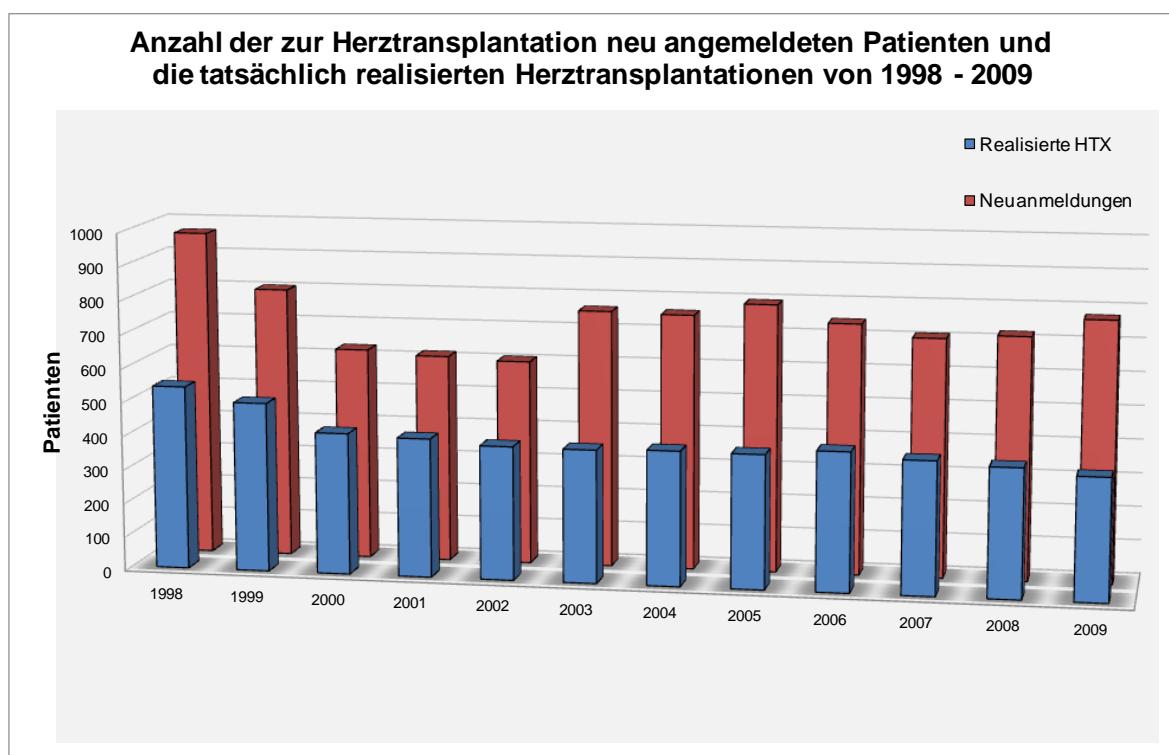


Abbildung 1.1: Anzahl der in Deutschland zur Herztransplantation (HTX) jährlich neu auf die Warteliste aufgenommenem Patienten im Vergleich zu der Anzahl der jährlich tatsächlich realisierten Herztransplantationen in den Jahren 1998 bis 2009.

Mit einer derzeitigen 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 66% (*Collaborative Transplant Study* 2009) ist die Herztransplantation zur Lebenserhaltung die einzige etablierte langfristige Therapiealternative bei endgültigem Herzversagen. Und der Bedarf an Spenderorganen ist dringlich: Ungefähr 1,6 Millionen Menschen in Deutschland leiden unter einer Herzinsuffizienz – dies sind ca. 2% der Gesamtbevölkerung und jährlich erkranken 130.000 Menschen neu (Beyersdorf 2005). Dabei liegt das 5-Jahresüberleben bei nur 35% (Roger 2010).

Insgesamt 773 Patienten wurden 2009 in Deutschland für eine Herztransplantation neu auf die Warteliste aufgenommen, von denen nur 363 ein Spenderorgan erhielten (DSO 2009) (*Abbildung 1.1*). Dies sind etwa 5% weniger als 2008 (382 Transplantationen) und die Anzahl an Herztransplantationen sinkt weiter. Derzeit müssen jährlich ungefähr 19% der angemeldeten Patienten durch die dramatische Zunahme an Wartezeit sterben (Smits 2010).

Am 7. Oktober 1984 wurde die gemeinnützige Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) gegründet mit dem Ziel, den Ablauf der Transplantationen in Deutschland effektiv zu koordinieren und damit die Durchführbarkeit einer höheren Anzahl an Transplantationen zu ermöglichen und zu fördern. Die DSO ist eine Koordinationsstelle, die dem Transplantationsgesetz von 1997 unterliegt. Dieses regelt die Spende, Entnahme, Vermittlung und Übertragung von Organen. Mit der Verabschiedung des Transplantationsgesetzes wurde vor allem eine Steigerung der Spenderbereitschaft durch den Abbau eventueller hinderlicher Rechtsunsicherheiten verfolgt. Zudem wurde am 25. Mai 2012 die Organspende im Bundestag neu geregelt. Durch die Entscheidungslösung wird die „erweiterte Zustimmungsregelung“ nach jahrelanger Diskussion abgelöst. Künftig wird jeder deutsche Bürger über 16 Jahren von seiner Krankenkasse aufgefordert sich im Vorfeld bezüglich einer Organspende nach dem Tod zu äußern.

Ursächlich für die seit einigen Jahren nicht mehr steigende Zahl an Herztransplantationen ist nicht nur eine mangelnde Spenderbereitschaft, obwohl zur Vergrößerung des Spenderpools die Spenderkriterien erweitert und das Spendermanagement intensiviert wurden (Zylka-Menhorn 2005, Wittwer 2008). Auch veränderte Indikationsstellungen zur Herztransplantation, die zunehmend besser werdenden Möglichkeiten eine Transplantation erfolgreich durchzuführen

und verbesserte konservative Therapien der Herzinsuffizienz führen zu einem stetig steigendem Empfängerpool.

Nach Ausschöpfen aller Möglichkeiten den Mangel an Spenderorganen entgegenzuwirken und die Patienten auf der Warteliste durch den Einsatz von uni- oder biventrikulären Unterstützungssystemen als „*bridge to transplantation*“ zu stabilisieren (Strüber 2007, Vegas 2008, Nicolini 2009), kann die fortbestehende Diskrepanz von Organbedarf und Organmangel nicht behoben werden. Würde man darüber hinaus alle Patienten, die von einer Herztransplantation profitieren würden, zur Transplantation anmelden, ginge die Schere noch weiter auseinander. Eine langfristige Lösung dem Organmangel entgegenzuwirken, stellt die Verfügbarkeit tierischer Spenderorganen dar. Durch diese könnte die Mortalität auf der Warteliste beseitigt und der Indikationsrahmen zur Herztransplantation erweitert werden. Darüber hinaus würde die Transplantation tierischer Organe einige Vorteile gegenüber der Allotransplantation bieten (Hammer 1994, Cascalho 2001, Cox 2005): Die Organübertragung wäre ein elektiver Eingriff, auf den die Patienten genauestens vorbereitet werden könnten. Eine verkürzte Ischämiezeit würde sich positiv in Hinblick auf das Langzeitüberleben der Transplantate auswirken. Die Qualität der tierischen Spenderorgane wäre bekannt und pathophysiologische Auswirkungen durch den Hirntod könnten ausgeschlossen werden. Zudem wäre die Verwendung von Organen vorerkrankter Spender nicht mehr notwendig. Neben der uneingeschränkten Anzahl an Spenderorganen wären zuletzt auch variable Organgrößen verfügbar, sodass sowohl Kinder als auch Erwachsene therapiert werden könnten.

## **1.2. Definition und Geschichte der Xenotransplantation**

Das Wort *xéno* stammt aus dem Griechischen und bedeutet Fremder. Der Brite Peter A. Gorer führte den Begriff der Xenotransplantation erstmals 1961 ein (Gorer 1961) als die Übertragung von Zellen oder Organen zwischen zwei Individuen verschiedener Spezies (Tier auf Mensch). Davon abzugrenzen ist die Allotransplantation, die definiert ist als die Übertragung von Zellen oder Organen

zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen der gleichen Spezies (Mensch auf Mensch).

Die Geschichte der Xenotransplantation zeigt, dass die Idee der Übertragung von tierischen Zellen und Geweben auf den Menschen bis in das 17. Jahrhundert zurückreicht und nicht immer mit Bedenken verbunden war (Denis 1667, Larner 1987, Roux 2007). Die ersten experimentellen Organübertragungen führte Alexis Carrel zur Entwicklung der Gefäßnaht 1904 an Hunden durch (Carrel 1912, Sade 2005). Dabei transplantierte Carrel Hundeherzen und -nieren nicht nur an denselben Ort zu dem ursprünglichen Empfängerorgan, d.h. in orthotoper Position, sondern auch in die anatomisch nicht mit dem ursprünglichen Empfängerorgan übereinstimmende heterotope Lage.

Bis heute werden in der experimentellen Transplantationsmedizin beide Operationstechniken angewandt.

Über die erste xenogene Organtransplantation berichtete Princeteau 1905, als er einem an Urämie erkrankten Kind Teile einer Kaninchenniere transplantierte (Princeteau 1905). In den darauffolgenden Jahren zeigte sich anhand zahlreicher xenogener Nierentransplantationen durch Jaboulay (Starzl 2000), Unger (Unger 1910) und Neuhof (Neuhof 1923) schon bald, dass die Abstoßung von Organen, die von nicht mit dem Empfänger verwandten Spendern stammen, auf immunologischen Prinzipien beruht. Erst nach Einführung immunsuppressiver Medikamente kehrte das Interesse an der Xenotransplantation zurück.

Als der Amerikaner James Hardy am 23. Januar 1964 die erste Herztransplantation am Menschen durchführte, übertrug er ein Schimpansenherz in den sich im kardiogenen Schock befindenden 68-jährigen Boyd Rush (Hardy 1964) – noch drei Jahre vor der ersten allogenen Herztransplantation am Menschen durch Christiaan Barnard am Groote Schuur Hospital in Kapstadt (Barnard 1969). Seit 1968 wurden weltweit zahlreiche xenogene Herzen unterschiedlicher Spenderspezies übertragen – jedoch ohne langfristigen Erfolg (*Tabelle 1.1*).

Der wahrscheinlich bekannteste Fall ereignete sich am 26. Oktober 1984 in Kalifornien, USA, als Leonard Bailey einem 12 Tage alten Baby namens „Fae“ mit hypoplastischem Linksherzsyndrom ein ABO-inkompatibles Pavianherz übertrug (Bailey 1985). Trotz einer passenden Herzgröße und der Verfügbarkeit von

Cyclosporin wurde das Herz am wahrscheinlichsten nach 20 Tagen abgestoßen und Baby Fae verstarb. Das Transplantat wies histopathologische Zeichen einer progradienten humoralen Abstoßungsreaktion auf, die auf die ABO-Inkompatibilität zurückgeführt wurde.

Der zuletzt datierte Versuch ein Schweineherz in einen Menschen zu übertragen erfolgte 1996 in Indien. Baruah transplantierte das porcine Herz in einen 32-jährigen Patienten mit Ventrikelseptumdefekt. Dieser verstarb am 7. postoperativen Tag im septischen Schock. Baruah wurde anschließend wegen Missachtung des *Human Organ Transplantation Act* von 1994 verhaftet (Deschamps 2005).

Jahr	Autor (Literatur)	Spenderspezies	Transplantatüberleben
1964	Hardy (Hardy 1964)	Schimpanse	90 Minuten
1968	Ross (Deschamps 2005)	Schwein	4 Minuten
	Cooley (Cooley 1968)	Schaf	10 Minuten
1969	Bertoye/Marion (Marion 1969)	Schimpanse	wenige Minuten
1977	Barnard (Barnard 1977)	Pavian	5 Stunden
		Schimpanse	4 Tage
1984	Bailey (Bailey 1985)	Pavian	20 Tage
1991	Religa (Czaplicki 1992)	Schwein	< 24 Std.
1992	Religa (Czaplicki 1992)	Schwein	23 Stunden
1996	Baruah (Deschamps 2005)	Schwein	7 Tage

Tabelle 1.1: Geschichte der xenogenen Herztransplantation. Überlebenszeiten der seit 1964 bislang durchgeführten Übertragungen tierischer Spenderherzen in den Menschen.

Heute werden das Abstoßungsverhalten und physiologische Konsequenzen von Xenotransplantationen in experimentellen Tiermodellen untersucht. Die klinische Relevanz des Langzeitüberlebens eines xenogenen Transplantates in einem Menschen kann nur in einem intakten Gesamtorganismus eines Primaten untersucht werden. Die *International Society of Heart and Lung Transplantation* legte 2000 die Rahmenbedingungen für den Beginn weiterer klinischer Studien fest. Dabei müssen im Primatenmodell in einer fortlaufenden Serie von Versuchen mindestens 60% der Empfängertiere (mindestens 10 Tiere) nach

lebenserhaltender orthotoper Herztransplantation ein Überleben von mindestens 90 Tagen aufweisen (Cooper 2000).

### **1.3. Das Schwein als Organspender für die xenogene Herztransplantation**

In der Xenotransplantation wird die Spender-Empfänger-Konstellation in Abhängigkeit von der phylogenetischen Verwandtschaft entweder als konkordant (lateinisch *concordans* = zusammenstimmend) oder als diskordant (lateinisch *discordans* = nicht übereinstimmend) bezeichnet (Calne 1970).

Organtransplantationen zwischen nahe verwandten Individuen, wie zwischen Maus und Ratte oder Primat und Mensch, werden als konkordant bezeichnet. Das Abstoßungsverhalten ähnelt dem bei Allotransplantationen. Die konkordante Spezieskombination zeichnet sich durch die Abwesenheit einer hyperakuten Abstoßungsreaktion aus. Demzufolge würden Primaten aufgrund ihrer phylogenetischen Nähe zum Menschen als Organspender favorisiert werden. Da die meisten Primaten unter Artenschutz stehen und die Organe selbst ausgewachsener nicht-humaner Primaten, wie beispielsweise von Pavianen, eine ausreichende Kreislauffunktion in einem Erwachsenen nicht aufrechterhalten könnten, ist der Primat als Organspender für Herztransplantationen ungeeignet (Hammer 1998a). Des Weiteren sind Primaten durch eine späte Geschlechtsreife, eine lange Tragezeit und mit nur durchschnittlich einem Nachkommen in nicht ausreichendem Maße reproduzierbar (Hammer 1994, Cooper 2000). Die Blutgruppe O tritt bei Pavianen sehr selten auf und schließt somit bereits einen Großteil potentieller Empfänger aus (Schmoeckel 2010). Ethische Vorbehalte durch die nahe Verwandtschaft zum Menschen lehnen die Organentnahme von Primaten zu Transplantationszwecken ab (Kennedy 1997, Stadlbauer 2010). Durch die genetische Ähnlichkeit könnten wiederum für den Menschen pathogene Krankheitserreger übertragen werden und zu nicht beherrschbaren Infektionen führen, wie anhand der Ausbreitung des HIV-Virus deutlich wurde (Hammer 1998b, Langat 2000).

Aufgrund der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit zum menschlichen Herzen definierten Cooper et al. das Hausschwein als optimalen Organspender

(Cooper 2002). Die Organübertragung zwischen Schwein und Primat oder zwischen Schwein und dem Menschen ist ein Beispiel für das diskordante Transplantationsmodell.

Mit einer frühen Geschlechtsreife, einer vergleichsweise kurzen Tragezeit und durchschnittlich 12 Nachkommen wäre eine ausreichende Anzahl an porcinen Spenderherzen verfügbar (Hammer 1994). Durch ein schnelles Wachstum und durch die Möglichkeit der Produktion so genannter Mini-Pig-Linien könnte sich die klinische Xenotransplantation variabler Organgrößen bedienen (Allan 2001, Cooper 2002, Sprangers 2008). Die Produktion und Haltung der Hausschweine wäre verhältnismäßig kostengünstig und überdies unter pathogenfreien Bedingungen möglich. Demzufolge könnten die meisten klinisch relevanten Zoonosen des Schweins ferngehalten werden (Cooper 2000). Die lang bestehende Domestizierung des Hausschweins und dessen landwirtschaftliche Verwendung als Nutztier reduzieren ethische Bedenken gegenüber einer Organentnahme für lebenserhaltende Transplantationen (Rubaltelli 2008). Schweineherzklappen und Schweine-Insulin kommen bereits in der klinischen Medizin zur Anwendung (Cooper 2000).

Die Diskordanz des Hausschweins gegenüber dem Menschen wurde von Hammer detailliert beschrieben (Hammer 1994, Hammer 1998a, Hammer 1998b, Hammer 2001). Physiologische Unterschiede bezüglich der Körpertemperatur, der Blutviskosität, des Hormonsystems und des enzymatischen Haushaltes wurden aufgezeigt und eine ausreichende Organfunktion in einem aufrechtgehenden Empfängerorganismus erwiesen (Bauer 2005). Der mikrobiologische Hauptsikofaktor stellt das porcine endogene Retrovirus (PERV) dar. Die Gefahr einer Übertragung auf die Bevölkerung konnte in der Vergangenheit durch experimentelle Tierversuche nicht bestätigt werden und wird mittlerweile als kontrollierbar eingeschätzt (Heneine 1998, Perico 2002, Cox 2005, Cooper 2000). Die Erzeugung eines erregerfreien Zuchtstammes wäre aufgrund der raschen und hohen Reproduzierbarkeit denkbar (Langat 2000).

## 1.4. Abstoßungsmechanismen im diskordanten Transplantationsmodell

### 1.4.1. Hyperakute Abstoßung

Trotz der insgesamt günstigen Voraussetzungen ist das diskordante Transplantationsmodell charakteristisch für eine durch präformierte Antikörper hervorgerufene hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) innerhalb von Minuten bis Stunden nach Implantation in den Empfängerorganismus, die der Abstoßung von ABO-inkompatiblen Organen ähnelt und sich deutlich von der progressiven vaskulären und zellulären Abstoßung nach Allotransplantation unterscheidet – sie erfolgt schneller und stärker (Platt 1991).

Verantwortliche präformierte natürliche Antikörper, ähnlich den Blutgruppenantikörpern (Isohämagglutinine), sind hauptsächlich der IgM-Klasse zugehörig (Lawson 1996) und machen ungefähr 1% der zirkulierenden Gesamt-Immunglobuline des Menschen aus (Sprangers 2008). Diese Antikörper im Serum von Menschen und Altweltaffen (Paviane, Rhesusaffen, Cynomolgusaffen) sind gegen das Gal- $\alpha$ 1,3Gal- $\beta$ 1,4GlcNAc-R-Epitop ( $\alpha$ (1,3)Gal-Epitop) auf Schweineendothelien gerichtet, ein Glykoprotein, das durch das Enzym  $\alpha$ -Galaktosyltransferase katalysiert wird und evolutionsgeschichtlich verloren gegangen ist (Galili 1988, Good 1992, Cooper 1993). Gebildet werden die natürlichen xenoreaktiven Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper in den ersten Lebenswochen als immunologische Antwort auf Mikroorganismen der Darmflora, die das  $\alpha$ (1,3)Gal-Epitop als Zellwandbestandteil tragen. Die Transplantation von Schweineherzen in neugeborene Paviane, bei denen natürliche Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper noch nicht messbar sind, führt somit nicht zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion (Kaplon 1994, Xu 1995).

Nach Implantation und Reperfusion eines porcinen Transplantates können die natürlichen Antikörper mit den  $\alpha$ (1,3)Gal-Epitopen der Schweineendothelien reagieren. Dadurch kommt es im Empfänger zu einer Aktivierung des klassischen Weges der Komplementkaskade, der durch die Antikörper-Antigen-Komplexbindung an C1 begonnen wird (Roos 2002) (Abbildung 1.2). Der weitere Ablauf führt zur Bildung der C3-Konvertase (C4b2b), dessen Spaltung schließlich zu der Entstehung des *membrane attack complex* (MAC; C5b-9) führt. Es kommt zur osmotischen Lyse der Endothelzelle und zur Zerstörung des Transplantates.

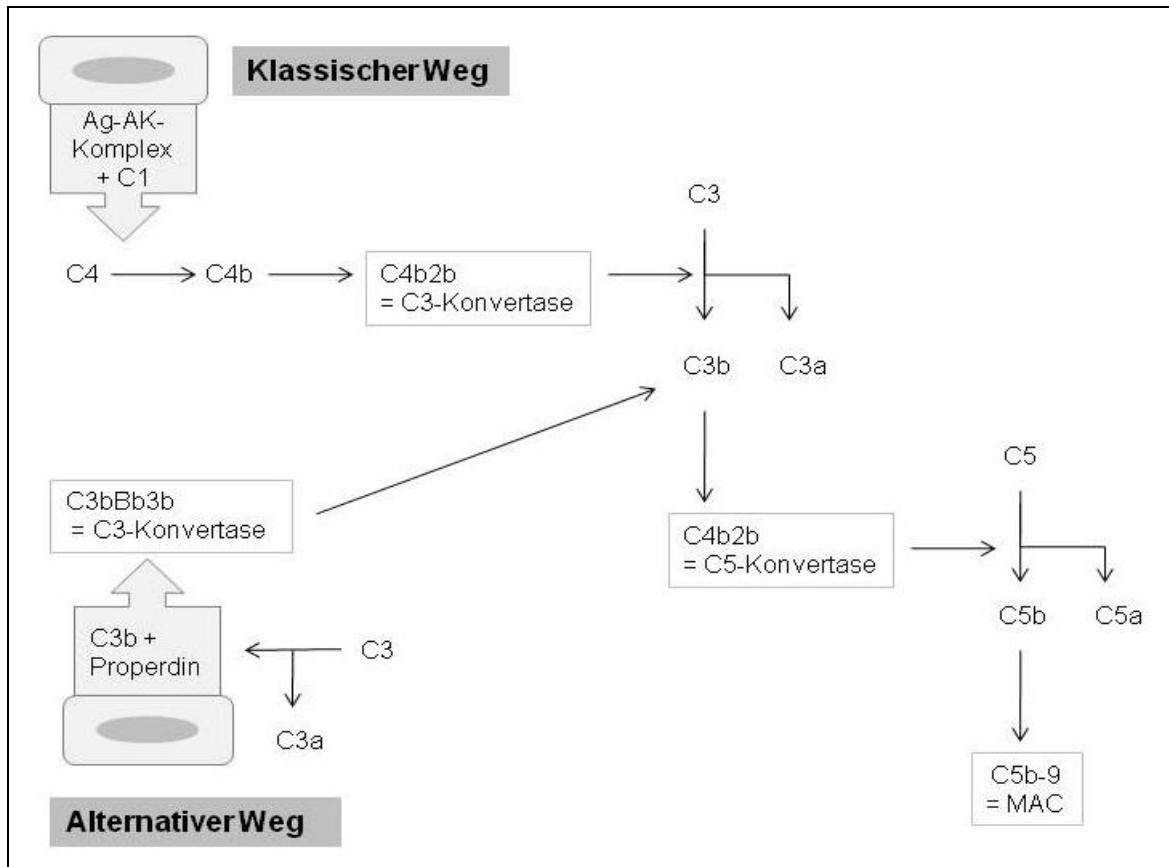


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der Komplementkaskade.

Es gibt Hinweise, dass auch der alternative Weg der Komplementkaskade aktiviert wird (Suckfüll 1994, Zhao 1994). Lösliches C3 wird durch spontane Hydrolyse stetig zu C3b aktiviert. Durch Ablagerung des C3b auf xenogenen Endothelzelloberflächen wird dieses durch Properdin (Faktor P) stabilisiert und führt durch positive Rückkopplung zur vermehrten C3b-Produktion. Weitere Komplementkomponenten werden bis zur Bildung des MAC aktiviert.

Die anaphylaktoiden Komplementspaltprodukte C3a, C4a und besonders C5a induzieren eine direkte Endothelzellaktivierung vom Typ I (Bach 1995). Innerhalb kürzester Zeit verlieren die aktivierte Endothelzellen antithrombotische Oberflächenproteine (Shimizu 2010). Darunter mehr als die Hälfte an Heparansulfat, einem sauren Polysaccharid, das unter physiologischen Bedingungen freie Radikale inaktiviert und durch die Bindung von Antithrombin III einer Thrombinproduktion entgegenwirkt (Platt 1990, Bach 1995). Der Verlust von CD39 fördert die Thrombozytenaggregation. Die aktivierte Endothelzellen

verlieren zudem Thrombomodulin, den antikoagulatorisch wirkenden *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) und das Ektoenzym ADPase, das durch den effizienten Abbau von aus Thrombozyten freigesetzten ADP die Amplifikationswege zur Thrombenbildung verhindert (Bach 1994, Robson 2000). Eine gesteigerte Produktion an Gewebsthrombokinase aktiviert schließlich die Gerinnungskaskade im exogenen System. Die normalerweise antikoagulatorische Beschaffenheit der Endothelzelloberfläche wechselt in einen prokoagulatorischen Zustand (Platt 1991, Bach 1994, Schuurman 2003).

Durch die Retraktion der Endothelzellen kommt es zum Verlust der Zellintegrität und zur Freisetzung subendothelialer Moleküle, wie dem von-Willebrand-Faktor (vWF) und dem Gewebefaktor (TF = *tissue factor*), die die Entstehung von Ödemen und Thrombosen begünstigen. Adhäsionsmoleküle, wie P-Selektin, werden in zunehmendem Maße exprimiert und ermöglichen eine zytokinunabhängige Bindung neutrophiler Granulozyten und Monozyten (Shimizu 2010). Eine vermehrte endotheliale Sekretion proinflammatorischer Mediatoren (Histamin, Thrombin, Zytokine, IL-1, TNF- $\alpha$ ) trägt zur Entstehung eines entzündlich-thrombotischen Milieus bei und bewirkt die Rekrutierung von Leukozyten (Platt 1991).

Das histopathologische Bild der hyperakuten xenogenen Abstoßungsreaktion ist charakterisiert durch eine bereits unmittelbar nach Reperfusion auftretende Endothellschwellung mit nachfolgender interstitieller Ödembildung und interstitiellen Hämorrhagien (Platt 1991, Rose 1996, Rose 2000, Schuurman 2003). Intravaskuläre Plättchen- und Fibrinthromben kleiner venöser Gefäße und Arteriolen führen zu einer massiven Beeinträchtigung der Mikrozirkulation (Cozzi 2004, Houser 2004). Das Transplantat wird innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden nach Reperfusion durch thrombotische Gefäßverschlüsse zerstört. Kennzeichnend sind ischämisch-nekrotische Myokardareale (Rose 1996). Immunhistochemisch können Komplementablagerungen (C4d) und IgM-Immunkomplexe entlang der endothelialen Oberfläche nachgewiesen werden (Platt 1991).

#### 1.4.2. Akute Abstoßung

Kann eine HAR erfolgreich überwunden werden, kommt es meist innerhalb von einigen Tagen bis Wochen zu einer akut vaskulären (humoralen) Abstoßungsreaktion (AVXR) (Leventhal 1993, Platt 2001), die auch als *delayed xenograft rejection* (DXR) bezeichnet wird (Blakely 1994, Bach 1997).

Durch Bindung natürlicher und hochaffiner induzierter Anti- $\alpha(1,3)$ Gal-IgG-Antikörper, aber mehr noch durch induzierte Anti-Schwein-Antikörper gegen non- $\alpha(1,3)$ Gal-Zelloberflächenantigene kommt es neben der Aktivierung des klassischen Weges der Komplementkaskade zu einer direkten komplementunabhängigen Endothelzellaktivierung vom Typ II (Palmethofer 1998, Gollackner 2004, Shimizu 2010). Diese ist im Gegensatz zu der Endothelzellaktivierung vom Typ I verbunden mit der Induktion von Genen, die mit einer Synthese und Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1), Zytokine (TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ) und Chemokine über NF $\kappa$ B (IL-1, IL-6, IL-8 und MCP-1 = *monocyte chemoattractant protein-1*) und prokoagulatorischen Molekülen (TF und PAI-1 = *plasminogen activator inhibitor-1*) einhergeht (Robson 1995, Kalady 1998, Knosalla 2009). Eine zellvermittelte Rolle wird Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zugesprochen (Blakely 1994, Inverardi 1997). Diese binden wie Makrophagen und Neutrophile Granulozyten an das aktivierte Endothel und transmigrieren in das Transplantat. Die direkte Bindung hängt teilweise mit der Erkennung von  $\alpha(1,3)$ Gal-Epitopen zusammen und erfolgt auch in Abwesenheit von endothelialen xenogenen natürlichen Antikörpern (Goodman 1996). Molekulare Inkompatibilitäten zwischen den killerzellhemmenden Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR = *killer cell immunoglobulin like receptor*) der NK-Zellen des Empfängers und den porcinen MHC-Klasse-I-Molekülen führen zur direkten Zelltötung (Seebach 1997, Dawson 2000). Darüber hinaus können NK-Zellen und Monozyten mit ihrem Fc-Teil an zellständige xenoreaktive Immunglobuline binden und porcine Endothelzellen über die antikörperabhängige Zytotoxizität (ADCC = *antibody dependent cellular cytotoxicity*) lysieren (Fujiwara 1998, Itescu 1998).

Auf das schon bei der HAR verdeutlichte Erscheinungsbild der disseminiert intravasalen Gerinnung (DIC) wirken sich spezies-spezifische Inkompabilitäten innerhalb des Gerinnungssystems begünstigend aus und verstärken den Faktor

der fortschreitenden Gerinnungskaskade (Schulte am Esch 2001): Porcines Thrombomodulin kann humanes Protein C nicht in ausreichendem Maße binden und aktivieren. Dadurch werden die Gerinnungsfaktoren V und VIII, die letztlich die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin fördern, nicht ausreichend inaktiviert. Eine intravasale Thrombosierung wird gefördert. Der porcine TFPI kann humanen Faktor Xa nur unzureichend neutralisieren. Zusätzlich können porcine Endothelzellen humanes Prothrombin und Faktor X direkt aktivieren (Siegel 1997). Der porcine vWF kann spontan mit dem humanen GPIb-Rezeptor auf Thrombozyten interagieren und direkt zur Plättchenaktivierung führen (Goodman 1998).

Durch die Interaktion zwischen Erkennungsrezeptoren auf T-Zellen des Empfängers (T-Zell-Rezeptor, CD4+, CD8+, Kostimulationsmoleküle/CD154 und CD28) und korrespondierenden Liganden antigenpräsentierender Zellen (CD40, CD80, CD86) wird die akut zelluläre Abstoßungsreaktion (ACXR) eingeleitet (Rogers 2003). Dabei erfolgt die Aktivierung xenoreaktiver T-Zellen nicht nur auf direktem Wege über aus dem Transplantat in das lymphatische Gewebe des Empfängers eingewanderte antigenpräsentierende Zellen, sondern auch auf indirektem Wege, auf dem antigenpräsentierende Zellen des Empfängers in das Transplantat einwandern, Fremdantigene aufnehmen und diese auf ihren MHC-Klasse-II-Molekülen naiven CD4+-Zellen präsentieren (Yamada 1995, Murphy 1996). Aufgrund der Vielzahl inkompatibler Antigene im diskordanten Xenotransplantationsmodell ist eine deutlich stärkere T-Zell-Antwort als bei Allotransplantationen zu erwarten (Sachs 1995, Buhler 2001, Lin 2008).

Histopathologisch unterscheidet sich das Bild der AVXR wenig von dem bei HAR. Durch den Verlust der Zellintegrität und dem massiven Austritt intravasaler Flüssigkeit kommt es zu interstitiellen Myokardödemen und disseminierten Einblutungen. Intravasale Mikrothromben kleiner und mittelgroßer Arterien verursachen Ischämien und Nekrosen (Schuurman 2003). Neben endothelialen Antikörper- und Komplementablagerungen zeigt sich vor allem bei der ACXR eine Gewebsinfiltration mononukleärer Zellen (Goddard 2001).

#### 1.4.3. Chronische Abstoßung

Kann eine akute xenogene Abstoßungsreaktion überwunden werden, wird das Langzeitüberleben des Transplantates durch die Ausbildung einer Vaskulopathie analog der Transplantatvaskulopathie allogener Transplantate limitiert (Shimizu 2010). Die anhaltende Antikörperproduktion, Adhäsionsmoleküle exprimierende Endothelzellen und stimulatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren führen zu einer Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen und zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Es entsteht ein chronisch-entzündliches Milieu im Sinne einer Vaskulitis, dass sich histopathologisch als progrediente Intimaproliferation und interstitielle Fibrosierung präsentiert. Durch Gefäßverschlüsse kommt es allmählich zum Transplantatversagen. Kardiovaskuläre Risikofaktoren, Ischämie- und Reperfusionsschäden, CMV-Infektionen und rezidivierende Abstoßungsreaktionen werden als mitwirkende Faktoren diskutiert (Day 1995).

#### 1.4.4. Akkomodation und Toleranz

Die bereits bei ABO-inkompatiblen Allotransplantationen erreichte Akkomodation beschreibt einen Zustand, in dem das Transplantat trotz der Anwesenheit von aktivierten Antikörpern und Komplement nicht abgestoßen wird (Stussi 2006, Lynch 2009). Man vermutet, dass wiederansteigende Antikörper nach intensiver Immunsuppression und Elimination strukturell verändert sind (Yu 1996). Eine schützende Funktion wird veränderten Endothelleigenschaften zugesprochen (Bach 1997). Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Hochregulation zytoprotektiver Gene mit antiapoptotischen Eigenschaften kommt (A20, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, hHO-1). Zusätzlich dominieren im akkomodierten Transplantat vorwiegend TH<sub>2</sub>-Zellen (Dehoux 2009). Diese sezernieren Interleukin-4 und -10 und inhibieren die Differenzierung von TH<sub>1</sub>-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen. Der Prozess der akut zellvermittelten Abstoßung wird gehemmt (McCurry 1997).

Als Toleranz wird die fehlende Immunantwort gegenüber Fremdantigenen bei normaler Immunkompetenz bezeichnet. Erste Erfolge konnten bereits durch Thymustransplantationen (Barth 2003, Shimizu 2010) und durch die Induktion gemischter Blutstammzell-Chimerismen nach Knochenmarktransplantationen erzielt werden (Kawai 1995). Unter dem Zustand der Toleranz wäre eine lebenslange immunsuppressive Therapie nicht erforderlich.

## 1.5. Strategien zur Überwindung xenogener Abstoßungsmechanismen

### 1.5.1. Hyperakute Abstoßung

Die Forschung der letzten Jahre konnte auf dem Gebiet der diskordanten Xenotransplantation erhebliche Fortschritte erzielen. Durch ein zunehmendes Verständnis der Mechanismen xenogener Abstoßungsreaktionen und die Möglichkeit Schweine gentechnologisch verändern zu können, konnte die hyperakute Abstoßungsreaktion als erste immunologische Hürde erfolgreich überwunden werden (Schmoeckel 1996, Alwayn 1999, Bhatti 1999, Brenner 2005a, Kuwaki 2005, Klymiuk 2010). Es lassen sich im Wesentlichen drei therapeutische Strategien herauskristallisieren:

#### *Strategien zur Regulierung, bzw. Hemmung des Komplementsystems*

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Kontrolle des Komplementsystems durch membrangebundene Komplementregulatoren. Solche Regulatorproteine sind der *human decay accelerating factor (hDAF/CD55)*, der die Ausbildung der C3-Konvertase sowohl des klassischen als auch des alternativen Weges der Komplementkaskade verhindert und das *human membrane cofactor protein (hMCP/CD46)*, das an der Inaktivierung von C3b und C4b des klassischen und C3b des alternativen Weges beteiligt ist. Die gentechnologische Modifikation von Spenderschweinen beruht auf der Annahme, dass Komplementregulatoren spezies-spezifisch sind, d.h. membrangebundene porcine Komplementregulatoren durch molekulare Inkompatibilitäten die humane Komplementkaskade nicht in ausreichendem Maße kontrollieren können (Atkinson 1991, Rollins 1991). Durch den Einsatz transgener Schweine, die einen humanen Komplementregulator auf den Endothelzellen überexprimieren, kann die Komplementkaskade effektiv inhibiert und eine HAR erfolgreich verhindert werden (Dalmasso 1991, Cozzi 1995). Dabei beruht die Effektivität der Inhibition eher auf der Quantität, also der Menge exprimierter Komplementregulatoren auf den porcinen Endothelien, als auf seiner Spezies-Spezifität (Schmoeckel 2000, Morgan 2005). Transgene hDAF-Schweine wurden erstmals von der Arbeitsgruppe um Cozzi et al. durch DNA-Mikroinjektionstechnik produziert (Cozzi 1995) und fanden seitdem zahlreichen

Einsatz in der experimentellen Xenotransplantation (Schmoeckel 1996, Bhatti 1999, Brenner 2005a).

Die Komplementinhibition des klassischen Weges kann alternativ durch die Applikation eines **C1-Esterase-Inhibitors** (Berinert®, ZLB Behring GmbH, Marburg, Deutschland) erfolgen.

#### *Strategien zur Eliminierung der natürlichen Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper*

Natürliche xenogene Antikörper im Plasma des Empfängers können mithilfe der **extrakorporalen Immunadsorption** (EIA) durch das Vorbeifließen an mit polyklonalen Schafantikörpern gebundenen Säulen absorbiert und eliminiert werden (Xu 1998, Watts 2000). Nach 4 Zyklen werden dabei ungefähr 94% der IgM- und 85,5% der IgG-Immunglobuline beseitigt (Brenner 2000a). Eine anhaltende Reduktion der Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper kann durch die tägliche Infusion von synthetisch hergestellten löslichen  $\alpha$ -Gal-Konjugaten wie **GAS914** (Brandl 2007) oder **TPC** erzielt werden (McGregor 2005).

#### *Bereitstellung von $\alpha$ (1,3)Gal-knockout Spenderschweinen*

Der entscheidende Vorteil das Gen für die  $\alpha$ -Galaktosyltransferase mittels Klonierung in Spenderschweinen eliminieren zu können, verhalf zum Durchbruch die HAR zu überwinden und verdrängte zuvor eingesetzte Strategien gänzlich (Kuwaki 2005, Cooper 2007). Durch die fehlende Enzymaktivität wird die Expression von  $\alpha$ (1,3)Gal-Epitopen verhindert, sodass präformierte natürliche Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper nicht mehr binden und zu einer Komplementaktivierung führen können.

#### 1.5.2. Akute und chronische Abstoßung

Nach erfolgreicher Überwindung der hyperakuten Abstoßung xenogener Transplantate bedarf es zunächst therapeutischer Strategien die verzögerte akut vaskuläre Abstoßung zu beherrschen. Da die Spezifität der bedeutungsvollen induzierten zytotoxischen Anti-Schwein-non- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper bisher nicht identifiziert werden konnte, richten sich diese Strategien vornehmlich gegen die antikörperproduzierenden B-Zellen. Mit der Applikation von löslichem **Anti-CD154-Antikörper** (Anti-CD40-Ligand) kann eine zur Differenzierung der B-Zellen

aktivierende Co-Stimulation durch die Interaktion zwischen CD40-Ligand auf T-Zellen und CD40 auf B-Zellen blockiert werden (Buhler 2001, Kuwaki 2004).

Einen depletierenden Einfluss zeigt auch der erstmals von Nagy et al. entwickelte lösliche humane **Anti-HLA-DR-spezifische monoklonale Antikörper 1D09C3**. Dieser bindet an MHC-Klasse-II-Moleküle auf aktivierten B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen und leitet gezielt den programmierten Zelltod ein (Nagy 2002). Durch die Apoptose aktiverter B-Zellen wird die Produktion nachgebildeter zytotoxischer Antikörper suffizient reduziert.

Der monoklonale Anti-CD20-Antikörper **Rituximab** kann direkt an zirkulierende B-Lymphozyten binden und diese eliminieren (Zhu 2007). Klinisch wird Rituximab vor allem in der Krebsimmuntherapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen, aber auch bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoide Arthritis oder der idiopathisch-thrombozytopenischen Purpura eingesetzt.

Das klinisch bei malignen Tumorerkrankungen und schweren Autoimmunerkrankungen eingesetzte Zytostatikum **Cyclophosphamid** wird als alkylierende Substanz in die DNA eingebaut und blockiert den Zellzyklus von immunkompetenten B- und T-Lymphozyten (Zhu 2007).

Die humane Hämoxygenase-1 (**hHO-1**) ist ein ubiquitär in allen Geweben vorkommendes Enzym, das den oxidativen Abbau von Häm zu Biliverdin unter Bildung von freiem Eisen und Kohlenstoffmonoxid katalysiert. Es hat eine antiinflammatorische, antiapoptotische, antioxidatorische und antiproliferative Wirkung (Soares 2004, Bach 2005, Ryter 2006). Multitransgene Schweine mit zusätzlicher Überexpression von hHO-1 sollen einen zytoprotektiven Effekt aufweisen und gegen Ischämie- und Reperfusionsschäden, vor akuten Abstoßungsmechanismen und chronischer Transplantatvaskulopathie schützen (Yet 2001, Akamatsu 2004, Camara 2005). Zusätzlich induziert die hHO-1 die Expression des Komplementregulators hDAF und kann damit additiv vor einer komplementvermittelten Endothelzellschädigung schützen (Kinderlerer 2009).

Gegen zelluläre Abstoßungsmechanismen können multitransgene Spenderschweine produziert werden, die neben humanen Komplementregulatorproteinen (hDAF, CD46) auch Transgene gegen die später auftretende ACXR auf den Endothelzellen überexprimieren. Ein solches Transgen

ist der *TNF- $\alpha$  related apoptosis inducing ligand (TRAIL)*. Nach Bindung an spezifischen Rezeptoren aktiviert es die Caspase-8-abhängige Apoptose und inaktiviert NK-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Zusätzlich inhibiert es den Zellzyklus von T-Zellen unabhängig von deren Differenzierungsgrad.

Ein weiteres Transgen ist das MHC-Klasse-I-Molekül **HLA-E**. Eine endotheliale Expression kann die durch xenogene NK-Zellen verursachte Zellschädigung zum Teil verhindern. Nach Bindung wirkt HLA-E als inhibitorischer Ligand schützend sowohl vor einer direkten als auch vor einer antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC) (Forte 2005, Sprangers 2008).

Entscheidend für den Erfolg zelluläre Abstoßungsmechanismen suffizient unterdrücken und das postoperative Transplantatüberleben verlängern zu können, ist eine rechtzeitige und moderate Basisimmunsuppression.

Das Glukortikoid **Methylprednisolon** hat eine suppressive Wirkung auf T-Zell-abhängige Immunreaktionen durch Hemmung chemotaktischer Substanzen, wie Interleukin-1 und -2, über NFkB. Weiterhin reduziert es die Makrophagenaktivität durch Hemmung des *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) und die humorale Immunabwehr durch Hemmung antikörperproduzierender B-Lymphozyten.

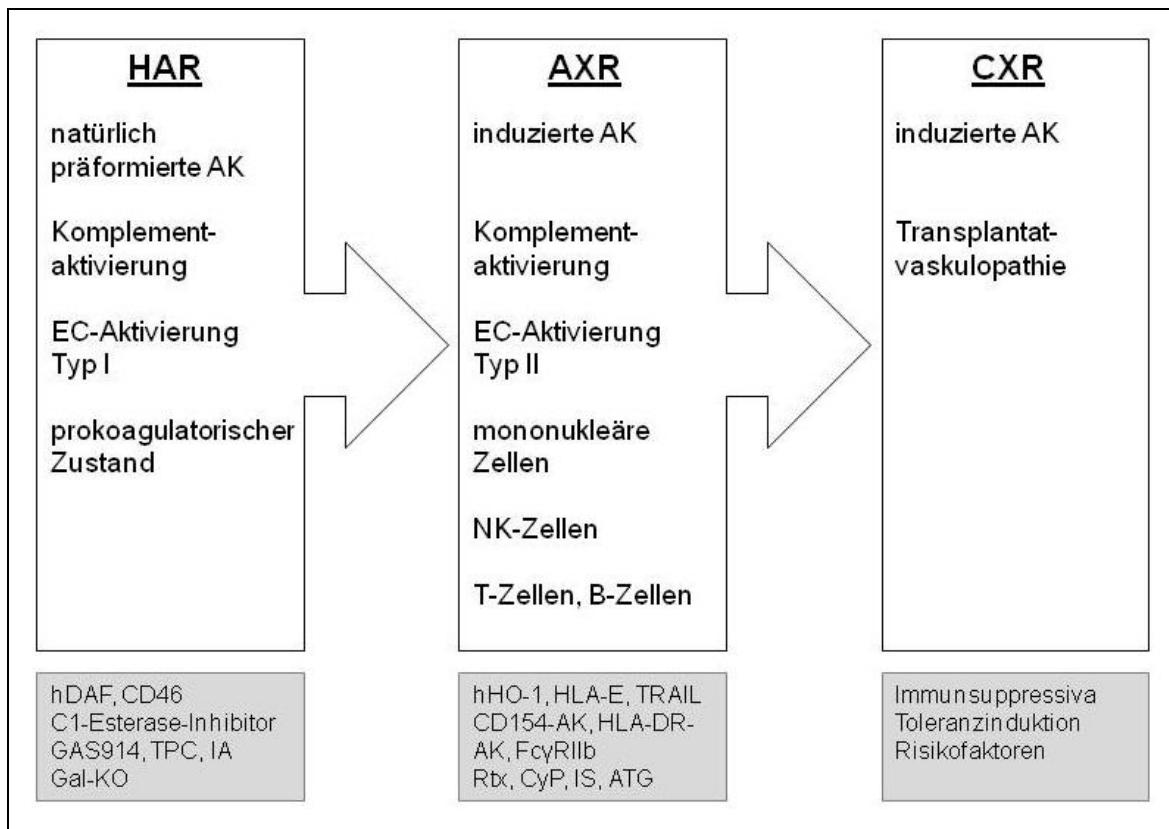
**Cyclosporin A** bindet an den zytosolischen T-Zell-Rezeptor Ciclophilin und blockiert über eine Calcineurininhibition die intrazelluläre Signalkaskade zur Ausbildung von T-Zell-Aktivator-Genen und deren Rezeptoren für bestimmte Zytokine (z.B. IL-2). Cyclosporin A wurde fast vollständig durch das in ähnlicher Weise, aber stärker wirkende, von dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* isolierte Makrolid **Tacrolimus** (FK 506) verdrängt. Nach Bindung an den zytosolischen Rezeptor FKBP-12 (*FK-binding protein-12*) hemmt es als Calcineurininhibitor die Bildung zytotoxischer T-Lymphozyten. Die Produktion von Lymphokinen (IL-2, IL-3 und IFN- $\gamma$ ) und die Expression des Interleukin-2-Rezeptors wird unterdrückt und dadurch die T-Zell-Aktivierung und die von T-Helfer-Zellen abhängige B-Zell-Proliferation unterbunden.

Der Purinantagonist **Mycophenolat Mofetil** hemmt als Ester der Mycophenolsäure das Schlüsselenzym der de-Novo-Synthese von Purinen, auf die vor allem T- und B-Lymphozyten während ihrer Proliferation angewiesen sind

(Allison 2005). Dadurch hemmt es sowohl vaskuläre als auch zelluläre Abstoßungsmechanismen. Eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und auf die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen schützt zusätzlich vor der Ausbildung einer Transplantatvaskulopathie (Morath 2003).

Der mTOR-Inhibitor **Sirolimus** ist ein von dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* produziertes Makrolid. Es bindet wie Tacrolimus an den zytosolischen Rezeptor FKBP-12, unterscheidet sich aber zu diesem in dessen spezifischem Zielprotein. Der Sirolimus/FKBP-Komplex bindet an den *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und hemmt dadurch die T-Zell-Aktivierung über eine Blockierung der Interleukin-2/Interleukin-2-Rezeptor-Reaktion und CD28 getriggerten Signalkaskade. Darüber hinaus werden Vorgänge im Zuge des Zellzyklus am Übergang der G1- auf die S-Phase blockiert, wodurch auch die Proliferation von B-Lymphozyten und die Differenzierung in antikörperbildende Zellen unterbunden werden. Zusätzlich hemmt Sirolimus die Zellzyklus-Progression auch in Hinblick auf glatte Muskelzellen und wirkt durch seine antiproliferative Eigenschaft protektiv gegenüber einer chronischen Transplantatvaskulopathie (Meiser 1991).

Der polyklonale Antikörper **ATG** (Anti-Thymozyten-Globulin) wird in mit humanen T-Lymphoblasten immunisierten Pferden oder Kaninchen hergestellt. Der im Serum enthaltene Antikörper bindet an Oberflächenantigene humaner T-Lymphozyten und führt über eine Aktivierung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität zur Lyse und Apoptose. Zusätzlich werden T-Suppressorzellen aktiviert. Durch die rasche T-Lymphozyten-Depletion kann ATG als Induktionstherapie zur Prophylaxe einer akuten Abstoßungsreaktion unmittelbar postoperativ oder zur Behandlung akuter Abstoßungsepisoden eingesetzt werden (McGregor 2004).



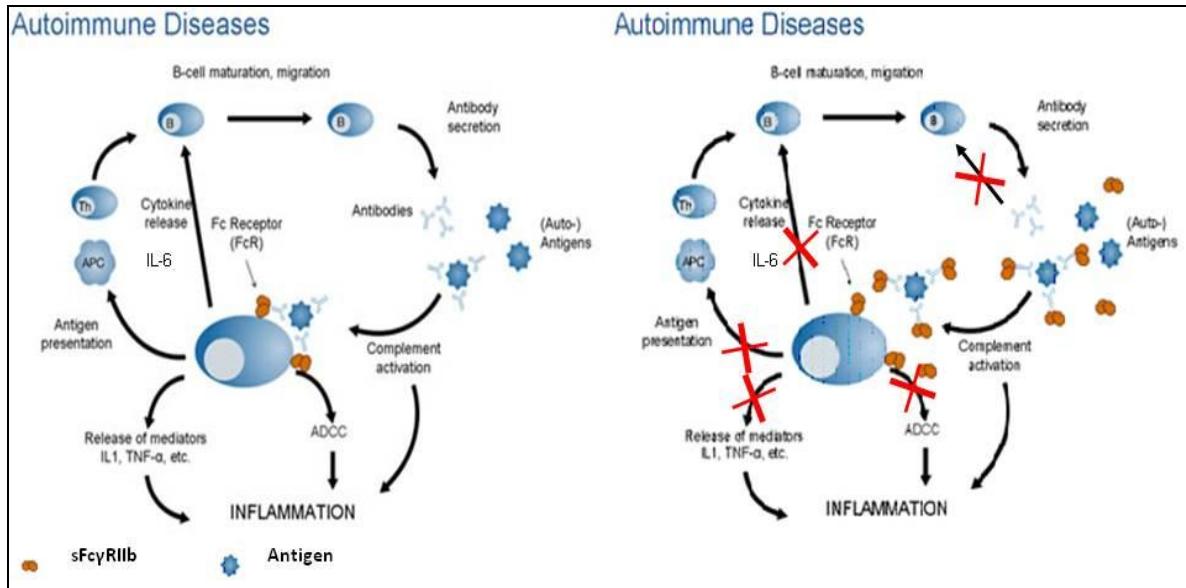
**Abbildung 1.3: Zusammenfassende Darstellung xenogener Abstoßungsreaktionen und möglicher Überwindungsstrategien.**

### 1.5.3. Der lösliche Fc-Rezeptor FcγRIIb

Der Fc-Rezeptor FcγRIIb (CD32) ist ein zellständiger Proteinkomplex auf den Zellen des Immunsystems und der einzige Rezeptor seiner Familie, der auf B-Zellen vorkommt und inhibitorisch wirkt (Baerenwaldt 2008). Er ist ein low-affinity-Rezeptor, der zwei IgG-Bindungsdomänen besitzt und nach Bindung eines Immunkomplexes zur Ausbildung des *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) führt (Sondermann 2001). Dadurch wird die Aktivierung von phagozytierenden Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten gehemmt, die Antikörperproduktion durch die Inaktivierung von B-Zellen blockiert, die Ausschüttung inflammatorischer Moleküle und eine ADCC verhindert (*Abbildung 1.4*). Durch die fehlende Bindung an antigenpräsentierenden Zellen wird eine T-Zell-Aktivierung blockiert (van Monfoort 2012).

Physiologisch liegt ein Teil des FcγRIIb-Rezeptors löslich im Körper vor (Sondermann 1999a). Nachdem erkannt wurde, dass die Serumkonzentration des Rezeptors mit dem Verlauf und dem Schweregrad einiger

Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus erythematos) korreliert, wurde ihm ein stark immunmodulatorisches Potential zugesprochen (Sondermann 1999b). Zu therapeutischen Zwecken wurde die lösliche Form des Fc $\gamma$ RIIb-Rezeptors rekombinant hergestellt (Sondermann 1999b). Dabei wurde der extrazelluläre Teil in E.coli Bakterien exprimiert und anschließend röntgenkristallographisch dargestellt. Der flexible zellmembranständige Teil und das Signalpeptid fehlen. Nach Applikation des löslichen Rezeptors konkurriert dieser mit den zellständigen Rezeptoren um die Immunkomplexbindung (Abbildung 1.4). Durch das Abfangen freier Immunkomplexe wird eine Aktivierung von Immunzellen blockiert und die Immunreaktion reguliert (Werwitzke 2007). Die ansteigende Konzentration an Immunkomplexen fungiert als natürlicher Inhibitor für antikörperproduzierende B-Zellen und für B-Gedächtniszellen, die den inhibitorisch wirkenden Rezeptor verstärkt exprimieren und nachhaltig die Antikörperproduktion weiter reduzieren. Da reguläre B-Zellen nicht gehemmt werden, besteht kein erhöhtes Infektionsrisiko.



**Abbildung 1.4: Blockade der Bindung von Immunkomplexen an Fc-Rezeptor-tragende Zellen durch den löslichen Fc-Rezeptors Fc $\gamma$ RIIb (Abbildung SuppreMol GmbH, Martinsried, München).**

Durch die Blockade von freien und gebundenen Anti-non- $\alpha(1,3)$ Gal-IgG-Antikörperbindungsstellen kann eine verzögert auftretende vaskuläre und zelluläre

Abstoßungsreaktion verhindert werden. Voruntersuchungen zeigten, dass die Bindung von Pavian-IgG an humanes Fc $\gamma$ RIIb vergleichbar, wahrscheinlich sogar besser als die Bindung von humanem IgG ist.

### **1.6. Der Einsatz unterschiedlicher immunmodulatorischer Protokolle auf dem Weg zur klinischen Xenotransplantation**

In den letzten Jahren wurden an der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München unterschiedliche immunmodulatorische Protokolle in einer Reihe orthotoper Xenotransplantationen hDAF-transgener Schweineherzen in Paviane auf ihre Effektivität, Abstoßungsprozesse zu unterdrücken und das Transplantatüberleben zu verlängern, getestet (*Tabelle 1.2*). Insgesamt wurden 12 Organe transplantiert. Das längste Überleben zeigte Pavian 10 mit 25 Tagen.

Es konnte gezeigt werden, dass das lösliche Gal-Konjugat GAS914 eine anhaltende Reduktion der Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper bewirkt und in Kombination mit für den Komplementregulator hDAF transgenen Spenderorganen eine HAR zuverlässig verhindern kann (Brandl 2007). Unter einer primären Basisimmunsuppression bestehend aus Tacrolimus, Sirolimus, Methylprednisolon und GAS914 und einer Induktionstherapie mit ATG zeigten drei Paviane mit 9 Tagen (Pavian 6), 14 Tagen (Pavian 12) und 25 Tagen (Pavian 10) das längste Transplantatüberleben. Das erprobte Behandlungsprotokoll konnte im Vergleich zu dem vorausgegangenen Schema aus Cyclosporin A, Mycophenolat Mofetil, Methylprednisolon und GAS914 zwar das Transplantatüberleben wesentlich verlängern, eine fortschreitende akut vaskuläre Abstoßung aber nicht verhindern. Insbesondere mit dem Einsatz von Cyclophosphamid (Gruppe A5 und A6) konnte das Auftreten einer akut vaskulären Abstoßungsreaktion hinausgezögert werden. Dabei konnten unter Verwendung der halben Medikamentendosis gefürchtete gastrointestinale und knochenmarkstoxische Nebenwirkungen vermieden werden.

Gruppe	Pavian	Spender	Immunsuppression	Überlebens-zeiten	Endpunkte
A1	P1	hDAF	CyA, MMF, Met, GAS914	4 Std.	keine XR, Blutungen
	P3	hDAF	CyA, MMF, Met, GAS914	5 Std.	keine XR, Hyperthermie
	P4	hDAF	CyA, MMF, Met, GAS914	<7 Std.	keine XR, Transplantatversagen
A2	P2	hDAF	CyA, MMF, Met, GAS914, C1-Esterase-Inhibitor	<3 Std.	keine XR, anaphylak-tischer Schock
A3	P5	hDAF	Tac, Sir, Met, ATG, GAS914	20 Std.	keine XR, Transplantatversagen, Lungenödem
	P6	hDAF	Tac, Sir, Met, ATG, GAS914	9 Tage	AVXR
A4	P7	hDAF	Tac, Sir, Met, ATG, GAS914, Rtx	<8 Std.	keine XR, Transplantatversagen
	P8	hDAF	Tac, Sir, Met, ATG, GAS914, Rtx	1 Tag	HAR, toxisches Lungenödem
A5	P9	hDAF	Tac, Sir, Met, ATG, GAS914, CyP	<6 Std.	milde HAR, Transplantatversagen
	P10	hDAF	Tac, Sir, Met, ATG, GAS914, CyP	25 Tage	AVXR
	P12	hDAF	Tac, Sir, Met, ATG, GAS914, CyP	14 Tage	AVXR
A6	P11	hDAF	Tac, Sir, Met, ATG, GAS914, CyP, Anti-CD154-AK	20 Std.	keine XR, Lungenödem

**Tabelle 1.2:** Überlebenszeiten und Studienendpunkte unter Einsatz verschiedener Immunsuppressionsprotokolle nach orthotoper Xenotransplantation hDAF-transgener Schweine in Paviane ( $n = 12$ ). P = Pavian; CyA = Cyclosporin A; MMF = Mycophenolat Mofetil; Met = Methylprednisolon; Tac = Tacrolimus; Sir = Sirolimus; ATG = Anti-Thymozytenglobulin; Rtx = Rituximab; CyP = Cyclophosphamid; XR = xenogene Abstoßung; Std. = Stunden

## 1.7. Vom orthotopen zum heterotopen Transplantationsmodell

Bei der orthotopen Herztransplantation im diskordanten Schwein-Pavian-Modell wird das ursprüngliche Herz des Pavians unter Belassung von Teilen beider Vorhöfe explantiert und durch ein porcines Spenderherz gemäß der atrialen Manschettentechnik nach Lower und Shumway (Lower 1960) unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine ersetzt. Obwohl dieses Modell aufgrund der größeren Aussagekraft als präklinisches Modell gefordert wird (Cooper 2000), bringt die Tatsache, dass das Transplantat eine von Anfang an volle lebenserhaltende

Aufrechterhaltung der Zirkulation gewährleisten muss, einige Nachteile mit sich (Zhu 2007). Im Gegensatz dazu übernimmt das bei der heterotopen Transplantation in den Bauchraum übertragene Spenderherz diese *life-supporting*-Funktion nicht. Die frühzeitige Beendigung der Versuche in der beschriebenen orthotopen Reihe (*Tabelle 1.2*) aufgrund von bereits in der postoperativen Phase auftretenden Transplantatdysfunktionen mit finalem Transplantatversagen ermöglichte nur eine eingeschränkte Beurteilung immunologischer Vorgänge. Histopathologisch wiesen die Transplantate meist keine Anzeichen einer xenogenen Abstoßungsreaktion auf.

Um die immunologischen xenogenen Abstoßungsprozesse und die Wirksamkeit neu entwickelter Transgene, bzw. neu zusammengestellter immunsuppressiver Regime über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, wurde auf das heterotop abdominale Transplantationsmodell, in dem die Pumpbelastung des Myokards fehlt, gewechselt.

## **2. Fragestellung**

Auf dem Weg zur klinischen Xenotransplantation wurden in den letzten Jahren an der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München der Einsatz immunmodulatorischer Strategien zur Überwindung xenogener Abstoßungsreaktionen von Schweineherzen in Pavianen kombiniert und immunsuppressive Protokolle weiterentwickelt. Da in dem orthotopen lebenserhaltenden Transplantationsmodell kein ausreichendes und konsistentes Langzeitüberleben erreicht werden konnte, wurde zur Untersuchung und Evaluierung der immunologischen Abstoßungsprozesse auf das heterotope Transplantationsmodell gewechselt. In einer Versuchsreihe von 11 Tieren wurden Schweineherzen unterschiedlicher Transgenität (darunter sieben α(1,3)Gal-knockout Tiere) in abdominaler Position in Paviane übertragen. Die Primärimmunsuppression wurde wahlweise mit Cyclophosphamid, einem monoklonalen Anti-HLA-DR-Antikörper und dem löslichen Fc-Rezeptor FcγRIIb kombiniert. Bei zwei Tieren wurde zusätzlich das Verfahren der extrakorporalen Immunadsorption zur Elimination präformierter Antikörper eingesetzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die heterotop abdominale kardiale Xenotransplantation im Primatenmodell unter Berücksichtigung von ein-, bzw. mehrfach-transgenen Spenderorganen und unterschiedlichen immunsuppressiven Protokollen mit dem lebenserhaltenden orthotopen Transplantationsmodell, basierend auf den Vorarbeiten von Michel (Brandl 2007) und Brenner et al. (Brenner 2005a), zu vergleichen.

Im ersten Teil der Arbeit soll die Effektivität von hDAF als Komplementregulator gegenüber mehrfach-transgenen Schweineherzen zur Kontrolle xenogener Abstoßungsreaktionen untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen anhand der verwendeten therapeutischen Protokolle Tendenzen von Kombinationen für ein geeignetes immunsuppressives Regime herausgestellt werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollen Vorteile und Problematiken beider Transplantationstechniken in Hinblick auf ein Transplantatlangzeitüberleben dargestellt und diskutiert werden.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Versuchstiere**

Die Haltung und Pflege der Versuchstiere erfolgte in den Tierstallungen des Walter-Brendel-Zentrums am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Kontrolle der Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen 6506, Versuchsgenehmigung am 01.08.2006) in Übereinstimmung mit den ‚*Principles of Laboratory Animal Care*‘ und dem ‚*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*‘ des ‚*Institute of Laboratory Animal Resources*‘ (NIH, National Institutes of Health, Publikation Nr. 23-86, 1985) und dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998, BGB II S.1105). Allen Tieren wurde eine kontinuierliche veterinärmedizinische Versorgung und eine tägliche intensive Betreuung durch geschultes tierpflegerisches Personal gewährleistet.

##### **3.1.1. Spendertiere**

Zur Organspende wurden männliche und weibliche transgene Landrasseschweine mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von  $15,8 \text{ kg} \pm 9,3 \text{ kg}$  verwendet. Hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Transgenitäten wurden die Tiere in fünf Gruppen eingeteilt (*Tabelle 3.1*):

Gruppe 1 (n = 2) hDAF/HLA-E (Genzentrum am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland),

Gruppe 2 (n = 2) hDAF/HLA-E/TRAIL (Genzentrum am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland),

Gruppe 3 (n = 2) Gal-KO (Laboratory of Developmental Engineering, Maiji University, Japan und Institut für Nutztiergenetik FLI, Mariensee, Neustadt, Deutschland),

Gruppe 4 (n = 3) Gal-KO/CD46 (Revivicor, Blacksburg, Virginia, USA und Genzentrum am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland),

Gruppe 5 (n = 2) Gal-KO/hHO-1 (Institut für Nutztierrgenetik FLI, Mariensee, Neustadt, Deutschland).

Gruppe	Pavian	Spenderschwein
B1	P19	hDAF, HLA-E
	P20	hDAF, HLA-E
B2	P21	hDAF, HLA-E, TRAIL
	P22	hDAF, HLA-E, TRAIL
B3	P23	Gal-KO
	P24	Gal-KO
B4	P25	Gal-KO, CD46
	P29	Gal-KO, CD46
	P30	Gal-KO, CD46
B5	P27	Gal-KO, hHO-1
	P28	Gal-KO, hHO-1

**Tabelle 3.1: Spender-Empfänger-Konstellationen in Bezugnahme auf die unterschiedlichen transgenen Merkmale der Spenderschweine.**

Voraussetzung für die Verwendung der transgenen Schweine als Organspender war eine ausreichende und suffiziente Expression der Transgene auf den Gefäßendothelien. Diese wurde vor allen Versuchen mittels Ohrbiopsien immunhistochemisch gesichert und nach ihrer Ausprägung mittels eines speziellen Scores von 0 (keine Expression) bis 3 (starke Expression) validiert. Für das HLA-E steht derzeit noch kein geeigneter Antikörper für einen immunhistochemischen Nachweis zur Verfügung. Die endotheliale Expression der humanen Hämoxygenase-1 (hHO-1) wurde mittels PCR bestimmt.

### 3.1.2. Empfängertiere

Organempfänger waren vier männliche und sieben weibliche Paviane der Gattung *Papio anubis* und *Papio hamadryasis* mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von  $19,5 \text{ kg} \pm 6,5 \text{ kg}$ , die aus dem Deutschen Primatenzentrum Göttingen (DPZ, Leibniz Institut, Göttingen, Deutschland) bezogen wurden. Bereits dort wurden die Tiere serologisch, bakteriologisch und parasitologisch auf humanpathogene Keime untersucht, eine Tollwut-, Hepatitis A, B und C – Infektion ausgeschlossen. Vor Versuchsbeginn wurde von allen Tieren ein Differentialblutbild veranlasst, die Blutgruppenzugehörigkeit identifiziert und Erythrozytenkonzentrate für eventuelle peri-, oder postoperative Komplikationen vorbereitet. Danach wurden die Tiere mit 2000 IE Erythropoetin s.c. behandelt, um einen für die Operation stabilen Hämoglobinwert sicherzustellen.

Für eine artgerechte Haltung wurde im Frühjahr 2007 der Bau einer separaten Primatenanlage in der Versuchstierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums begonnen. Es entstanden fünf  $2,15 \text{ m} \times 1,75 \text{ m} \times 2,60 \text{ m}$  große Käfige. Einer der Käfige stand als Quarantänevorrang in einem abgetrennten Raum zur Verfügung.

Da eine Narkotisierung zur täglichen Blutentnahme und Medikamentenapplikation stets eine Belastungs- und Stresssituation für die Tiere bedeutete, wurde ein spezielles Tethering-System, d.h. ein fest installierter venöser Zugang, verwendet. Dieses System bestand aus einem Schlauchsystem aus Aluminium (Lomir Biomedical Inc.), das an die Käfigdecke montiert wurde und über ein speziell angefertigtes *Primaten-Jacket* (Lomir Biomedical Inc.) mit dem jeweiligen Tier in Verbindung stand. Die Jacken wurden jedem Primaten individuell angepasst und enthielten auf der Rückseite eine kleine geschützte Vorrichtung, über die ein Kathetersystem angeschlossen werden konnte, das dann auf dem Rücken des Tieres zu liegen kam. Ein 8 French großer einlumiger Groshong® - Zentralvenenkatheter (Bard Access Systems, Salt Lake City, Utah, USA) wurde in der V. jugularis interna so platziert, dass seine Spitze unmittelbar vor dem rechten Vorhof zu liegen kam. Dieser spezielle Katheter war mit einem Drei-Positionen-Ventil ausgestattet, welches den Ein- und Auslass von Flüssigkeiten gestattete, bei Nichtverwendung jedoch geschlossen blieb. Es erlaubte die Infusion von Flüssigkeiten und die Aspiration von Blut durch Öffnen des Ventils bei Erzeugung

eines Unterdrucks, blieb aber bei Drücken zwischen -7 und 80 mmHg geschlossen. Die Verwendung von Heparin wurde nicht benötigt, da aufgrund des geschlossenen Ventils kein Blut in den Katheter eindringen und dort gerinnen konnte. Die Anschlussmanschette wurde mit zwei Perfusorleitungen verlängert und durch das Schlauchsystem an der Käfigdecke ausgeleitet, wo die Blutentnahmen und Medikamentenapplikationen dann über einen Drei-Wege-Hahn erfolgen konnten. Die Perfusorleitungen wurden zwischen den Blutabnahmen prophylaktisch mit Natriumchlorid/Heparin geblockt.

Über die beschriebene Vorrichtung fand das tägliche Procedere somit ohne zusätzliche Belastung der Tiere durch sich ständig wiederholende Analgosedierungen statt. Gleichwohl konnte eine uneingeschränkte Bewegungsmöglichkeit in den Käfigen gesichert werden.

Des Weiteren wurde ein 3,63 m x 3,58 m großer Auslauf angelegt, der über die Käfige erreicht werden konnte. Um einen möglichst natürlichen Lebensraum zu simulieren, befand sich sowohl in der Käfiganlage als auch im Auslaufbereich in der Raumdecke eine große Glaskuppel, die einen natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus ermöglichte. Luftfeuchtigkeit und Temperatur wurde entsprechend reguliert. Frisch- und Trockenfutter sowie Trinkwasser war den Tieren jederzeit zugänglich.

### **3.2. Durchführung der heterotopen abdominalen Herztransplantation**

#### **3.2.1. Spenderoperation**

##### **3.2.1.1. Anästhesie**

Die Sedierung der Spendertiere erfolgte mit einer intramuskulären Injektion von 10 mg/kg KG Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 10 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pfizer Pharmacia GmbH, Berlin, Deutschland). Nach Ruhigstellung wurde ein peripher venöser Zugang (BD Insyte-W™ 24 GA, Becton Dickinson Infusion Therapie Systems Inc., Sandy, USA) in

eine Ohrvene gelegt, über den alle weiteren Medikamente appliziert und Volumen substituiert werden konnte.

Die Narkose wurde mit 5-10 mg Midazolamhydrochlorid i.v. (Midazolam-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) und 0,1-0,2 mg Fentanyldihydrogencitrat i.v. (Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) eingeleitet und mit 3-5 ml/h Propofol p.i. (Disoprivan® 2%, MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) aufrechterhalten. Zur weiteren Analgesie wurden vor Thorakotomie und Kardioplegie wiederholt 0,1 mg Fentanyldihydrogencitrat i.v. appliziert.

Nach Relaxation mit 0,1 mg/kg KG Pancuroniumbromid i.v. (Pancuronium CuraMED®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte die endotracheale Intubation mit einem Spiraltrachealtubus der Größe 5.0 (Safety-Flex™, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland). Die Tiere wurden mit einem Beatmungsgerät (Servo Ventilator 900B, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) volumenkontrolliert beatmet. Die Beatmung wurde durch regelmäßige Blutgasanalysen (Gas Analyser 348®, Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) angepasst, sodass ein PaCO<sub>2</sub> von 35 – 45 mmHg erzielt werden konnte.

Die Tiere wurden in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Zur intraoperativen Überwachung der Vitalfunktionen wurde ein Elektrokardiogramm angeschlossen (Sirecust 304D, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) und eine invasive Blutdruckmessung mittels arteriellen Druckdoms (Single Transducer Set, Becton Dickinson, Critical Care Systems Ltd., Singapur) in der A. carotis interna durchgeführt.

### 3.2.1.2. Herzexplantation

Nach Desinfektion und steriler Abdeckung des Operationsgebietes wurde das Spenderherz durch mediane Sternotomie und Längseröffnung des Perikards freigelegt, anschließend Aorta ascendens und beide Vv. cavae angeschlungen.

In vollheparinisiertem Zustand (400 I.E./kg KG Heparin-Natrium 25000-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) wurde eine 5 French große Aortenwurzelkanüle (DLP® Aortic Root Cannula, Medtronic Inc., Minneapolis, USA) eingebracht, dann V. cava superior und inferior ligiert (Ethibond 2-0,

Ethicon/Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA) und die Aorta zur Unterbrechung des Koronarflusses quergeklemmt.

Der Herzstillstand wurde durch Infundierung von 4°C kalter Bretschneider-Kardioplegieflösung (Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) und topischer Kühlung mit Ringer-Spüllösung (4°C, Fresenius Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) herbeigeführt. Die Entnahme des Herz-Lungen-Blocks erfolgte nach Durchtrennung der Vv. cavae, der Aorta descendens und der Trachea. Unter Sicht wurde die Lunge abgesetzt und die Gefäßstiele den anatomischen Verhältnissen des Empfängertieres angepasst.

Nach Erfassung des Herzgewichts (Mettler Feinwaage PL1200, Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz) und Entnahme einer Endomyokardbiopsie (Biopsiestanze 1 mm, Kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland) wurde das Spenderherz zur Verlängerung der Ischämietoleranz bis zur Implantation kontinuierlich gekühlt.

### 3.2.2. Empfängeroperation

#### 3.2.2.1. Anästhesie

Die Empfängertiere wurden mit 10 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid i.m. und 2-5 mg Midazolamhydrochlorid i.m. sediert. Nach Anlage eines peripher venösen Zugangs wurde die Narkose mit 80 mg/h Propofol p.i. und 0,05-1,0 mg Fentanylhydrogencitrat i.v. eingeleitet und aufrechterhalten. Nach Fixierung der Tiere auf dem Operationstisch erfolgte die Intubation mit einem Endotrachealtubus der Größe 6.0 (Hi-Lo Lanz™, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland) und der Anschluss an das Beatmungsgerät (Servo Ventilator 900 C, Siemens-Elema, Schweden).

Während der Operation wurde eine hämodynamische Überwachung durch EKG-Messungen (Sirecust 960, Siemens AG, Erlangen, Deutschland), Pulsoxymetrie und regelmäßige Blutgasanalysen durchgeführt. Die invasive arterielle Blutdruckmessung und die Überwachung der Herzfunktion erfolgte kontinuierlich über einen 5 French großen Thermodilutionskatheter (Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland) in der A. femoralis, der über einen Druckaufnehmer und eine Temperatursonde (PiCCO Monitoring Kit, Pulsion Medical Systems AG,

München, Deutschland) an ein PiCCO-Gerät (Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland) angeschlossen wurde. Ein zweilumiger zentralvenöser Katheter der Größe 7 French (Arrow Deutschland GmbH, Erding, Deutschland) in der V. femoralis diente zur Volumensubstitution und Medikamentenapplikation. Es wurden 30 mg/kg KG Cefuroxim-Natrium (Cefuroxim-saar®, MIP Pharma GmbH, Blieskastel, Deutschland) als perioperative Antibiotikaprophylaxe verabreicht. Zur Aufrechterhaltung der Körperkerntemperatur, die über eine rektale Sonde erfasst wurde, wurden elektrische Heizdecken eingesetzt.

### 3.2.2.2. Herzimplantation

Nach Rasieren, Desinfizieren und sterilem Abdecken des Operationsfeldes wurde das Abdomen mit longitudinaler Schnittführung bis zur Symphyse eröffnet. Aorta abdominalis und V. cava inferior wurden freipräpariert und angeschlungen.

Nach systemischer Heparinisierung (130 I.E./kg KG) wurde die erste Gefäßanastomose zwischen A. pulmonalis des Spenderherzens und V. cava inferior des Empfängerherzens durchgeführt. Dabei wurde die V. cava inferior zunächst mit einer Gefäßklemme quergeklemmt, inzidiert und mit einer fortlaufenden ACC-6/0 Prolene-Naht (Ethicon/Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA) mit der A. pulmonalis Seit-zu-End anastomosiert. Die zweite Gefäßanastomose zwischen Aorta ascendens des Spenderherzens und Aorta abdominalis des Empfängertieres erfolgte in gleicher Technik (*Abbildung 3.1*).

Durch Lösen der Gefäßklemmen wurde die Reperfusion eingeleitet und nach rascher Wiedererwärmung des Transplantates konvertierte dies meist spontan in den Sinusrhythmus oder wurde durch externe Defibrillation (Internal Paddles for Children, Lohmeier Medizin Elektronik GmbH & Co., München, Deutschland) in diesen versetzt. Unter bestehender suffizienter Herztätigkeit konnte die Blutstillung erfolgen und das Abdomen mittels Subkutannaht (3/0 Vicryl, Ethicon/Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA) und Intrakutannaht (3/0 Monocryl, Ethicon/Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA) verschlossen werden. Die Entfernung aller Gefäßzugänge und die Wundversorgung beendeten den Eingriff.

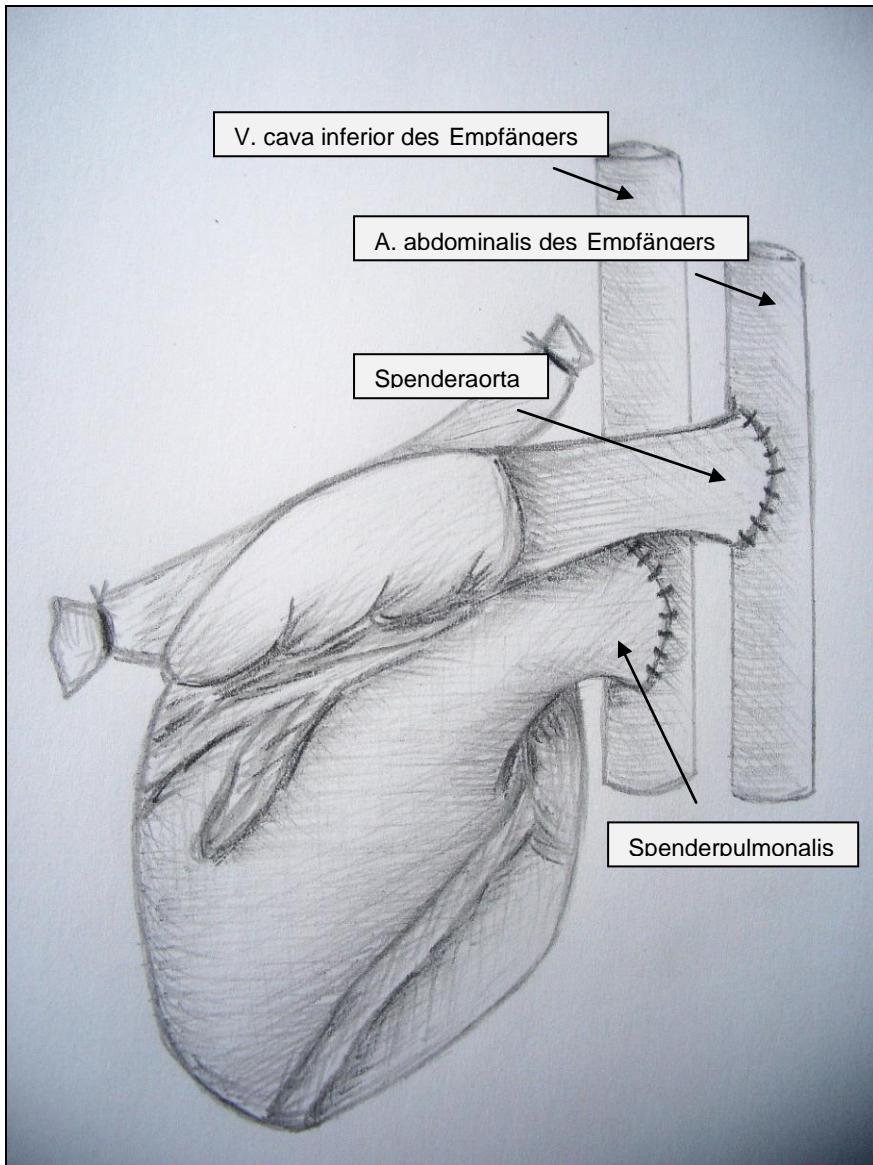


Abbildung 3.1: Anastomosenverhältnisse bei heterotop abdominaler Herztransplantation.

Anschließend wurde der für die postoperativ täglich durchzuführenden Blutentnahmen und Medikamentenapplikationen notwendige Groshong® Zentralvenenkatheter in die V. jugularis interna platziert, nach dorsal interskapulär ausgeleitet und durch das *Primate-Jacket* am Tier gesichert.

In leicht sediertem Zustand wurden die Paviane in den Käfigen gelagert und unter Sauerstoffangebot in die Versuchstierhaltung zurücktransportiert.

### **3.3. Postoperative Überwachung und Versorgung**

Ab dem ersten postoperativen Tag wurde täglich der Gesundheitszustand der Empfängertiere anhand eines standardisierten Untersuchungsprotokolls erfasst (siehe Anhang). Beurteilt wurde neben dem Allgemeinzustand und dem Verhalten der Tiere auch der neurologische Status. Frequenz und Quantität von Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, Defäkation und Miktion wurden notiert. Auf dem Untersuchungsprotokoll befand sich außerdem Platz für die Dokumentation des Volumenbedarfs und aller verabreichten Medikamente.

Nach klinischen Erfordernissen wurden die Paviane mit 10 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid i.m. analgosediert, um das Transplantat auf seine Pumpfunktion hin palpatorisch (Score 0/keine Herzleistung bis 3/kräftige Pumpleistung) und echokardiographisch (Sonos 5500, Hewlett Packard, Andover, Massachusetts, USA) zu untersuchen, die Wundverhältnisse zu begutachten, die Vitalparameter zu erheben und das aktuelle Körpergewicht zu bestimmen.

Die Tiere erhielten täglich 300 ml Vollelektrolytlösung p.i. (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und bedarfsweise 5 oder 10%ige Glucose-Lösung p.i. (G-Lösung B.Braun, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Neben den immunsuppressiven Medikamenten wurden täglich 1 mg/kg KG Metochlopramidhydrochlorid i.v. (Paspertin®, Solvay Arzneimittel GmbH, Hannover, Deutschland) und 0,1 mg/kg KG Odansetronhydrochlorid i.v. (Zofran®, GlaxoSmithKline, München, Deutschland) zur Antiemesis und in den ersten 5 Tagen nach Operation 50 mg/kg KG Cefuroxim-Natrium i.v. zur antibiotischen Therapie verabreicht. Außerdem wurden täglich noch 20 mg Pantoprazol i.v. (Pantozol®, Nycomed GmbH, Konstanz, Deutschland) und 4 mg Dimentindenmaleat i.v. (Fenistil®, Novartis Consumer Health GmbH, München, Deutschland) appliziert. Gegen die Schmerzen erhielten die Tiere in den ersten drei postoperativen Tagen 0,1 mg Buprenorphin s.c. (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland), darauffolgend 500 mg Metamizol-Natrium i.v. (Novaminsulfon-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland).

Die Bedarfsmedikation umfasste 30 mg Tramadol (Tramal-ratiopharm® supp, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), 40 mg Eisen(II)-Glycin-Sulfat-Komplex i.v. (Ferro-Sanol® duodenal, SANOL GmbH, Monheim, Deutschland), 2000 IE

Erythropoetin s.c. (NeoRecormon®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), 2 Ampullen Vetophos® i.v. (Bela-Pharm® GmbH, Vechta, Deutschland), 1 Ampulle Vitamin-B-Komplex N Jenapharm® i.v. (Jenapharm GmbH, Jena, Deutschland) und 2 Kapseln Perenterol® p.o. (UCB GmbH, Monheim, Deutschland).

### 3.3.1. Klinisch-chemische Diagnostik

Ab dem ersten postoperativen Tag erfolgte die tägliche Blutabnahme von 2 ml EDTA- und 2 ml Citrat-Blut. Dieses wurde am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern, aufbereitet. Neben den wichtigsten laborchemischen Parametern (*Tabelle 3.2*) wurden sowohl der Interleukin-6-Spiegel als Bestandteil der Abstoßungsdiagnostik als auch die Medikamentenspiegel der Immunsuppressiva zur Dosisregulation bestimmt.

Die Laborparameter stellten wichtige Messwerte zur Objektivierung des Allgemeinzustandes der Tiere sowie zur Evaluation einer beginnenden Abstoßungsreaktion der Transplantate dar – nur so war ein frühzeitiges Intervenieren möglich.

Serumchemie	Hämatologie	Gerinnung	Medikamentenspiegel
Natrium	Kleines Blutbild	Quick / INR	Tacrolimus
Kalium	Differentialblutbild	aPTT	Sirolimus
Kreatinin		Fibrinogen	
Harnstoff			
GPT/GOT			
CK-Gesamt			
CK-MB			
Troponin			
CRP			
IL-6			
Glukose			

**Tabelle 3.2: Tägliche klinisch-chemische Diagnostik.**

### 3.3.2. Immunsuppressive Therapie

#### *Basisimmunsuppression:*

Alle Paviane erhielten nach Implantation des Spenderherzens die gleiche primäre Basisimmunsuppression bestehend aus Tacrolimus, Sirolimus und Methylprednisolon (*Tabelle 3.3*). Alle Medikamente wurden täglich verabreicht. Die erste Gabe erfolgte noch intraoperativ zum Zeitpunkt der Reperfusion des Spenderorgans im Empfängerorganismus. Die Dosierungen waren im Einzelnen: **Tacrolimus** (FK 506; Prograf®, Astellas Pharma GmbH, Tokyo, Japan) wurde anfänglich mit 0,1 mg/kg KG als 24-Stunden-Dauerinfusionslösung appliziert, jede weitere Dosierung erfolgte nach täglicher Medikamentenspiegelbestimmung (Zielspiegel 20-30 ng/ml).

**Sirolimus** (Rapamycin; Rapamune®, WyethPharma GmbH, Münster, Deutschland) wurde je nach Medikamentenspiegel (Zielspiegel 10-20 ng/ml) als intramuskuläre Injektion in einer anfänglichen Dosis von 1 mg/kg KG verabreicht.

**Methylprednisolon** (Urbason soluble®, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland) wurde in einer anfänglichen Dosierung von 1,5 mg/kg KG i.v. appliziert. Es erfolgte eine tägliche Dosisreduktion von 0,15 mg/kg KG bis zu einer Erhaltungsdosis von 0,15 mg/kg KG.

Lediglich die Dosierungen und der Einsatz des **ATG**-Präparates (Anti-Thymozyten-Globulin; ATG-Fresenius S®, Fresenius HemoCare Immune Therapy GmbH, Gräfelfing, Deutschland) als *Rescue*-Therapie wurden individuell angepasst. Abhängig vom Lymphozytengehalt im Blut wurde ATG in einer Dosierung von 1,5 mg/kg KG i.v. für insgesamt fünf Tage appliziert.

*Antikörperelimination und B-Zell-Depletion:*

Vor der Verfügbarkeit und sicheren Erprobung von  $\alpha(1,3)$ Gal-knockout Spenderorganen wurde das Galactosylpolyethylen-Glycol-Konjugat **TPC** (Nextran, Princeton, New Jersey, USA) zur Anti- $\alpha(1,3)$ Gal-Antikörperelimination in einer täglichen Dosierung von 50 mg/kg KG i.v. verabreicht (Pavian 19 bis 25).

Bei Pavian 29 und 30 wurde am Operationstag und nach ansteigenden Antikörperspiegeln im postoperativen Verlauf - bei Pavian 29 am 5. postoperativen Tag und bei Pavian 30 an den postoperativen Tagen 9, 13, 18 und 23 - die **extrakorporale Immunadsorption** (Life-18, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) durchgeführt mit einem Adsorber (Ig Flex Adsorber, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland), der alle IgG-Subklassen sowie IgM, IgA und IgE binden und eliminieren kann.

Zur gezielten Suppression der Aktivierung von B-Zellen wurden Pavian 19, 20 und 21 mit dem humanen **HLA-DR-spezifischen monoklonalen Antikörper 1D09C3** (GPC Biotech, Martinsried/München, Deutschland) alle sieben Tage, beginnend am Tag der Transplantation, in einer Dosierung von 10 mg/kg KG als Kurzinfusion behandelt. Pavian 20 und 21 erhielten eine zusätzliche Dosis am 2. postoperativen Tag. Die anderen Empfängertiere (Pavian 22 bis 30) erhielten alle sieben Tage eine Behandlung mit dem monoklonalen Anti-CD20-Antikörper **Rituximab** (MabThera®, Roche Registration Limited, Welwyn Garden City,

Hertfordshire, United Kingdom) in einer Dosierung von 19 mg/kg KG i.v. beginnend zwei Wochen vor Transplantation.

#### *Weitere Immunmodulatoren:*

Pavian 23 bis 30 erhielten den löslichen Fc-Rezeptor **FcyRIIb** (SM101, SuppreMol, Martinsried/München, Deutschland), der ab dem 3. postoperativen Tag alle drei Tage als Einzeldosis von 5 mg/kg KG i.v. appliziert wurde.

Zusätzlich wurde Pavian 30 eine einmalige Cyclophosphamid-Dosis (Endoxan®, Baxter Oncology GmbH, Halle, Deutschland) von 5 mg/kg KG p.i. am 15. postoperativen Tag verabreicht.

Gruppe	Pavian	Spender	Immunsuppression
B1	P19	hDAF, HLA-E	Tac, Sir, Met, TPC, Anti-HLA-DR-Ak
	P20	hDAF, HLA-E	Tac, Sir, Met, TPC, Anti-HLA-DR-Ak
B2	P21	hDAF, HLA-E, TRAIL	Tac, Sir, Met, TPC, Anti-HLA-DR-Ak, ATG
	P22	hDAF, HLA-E, TRAIL	Tac, Sir, Met, TPC, Rtx
B3	P23	Gal-KO	Tac, Sir, Met, TPC, Rtx, sFcR, ATG
	P24	Gal-KO	Tac, Sir, Met, TPC, Rtx, sFcR
B4	P25	Gal-KO, CD46	Tac, Sir, Met, TPC, Rtx, sFcR, ATG
	P29	Gal-KO, CD46	Tac, Sir, Met, Rtx, sFcR, ATG, IA (Tag 0, 5)
	P30	Gal-KO, CD46	Tac, Sir, Met, Rtx, sFcR, ATG, IA (Tag 0, 9, 13, 18, 23), CyP
B5	P27	Gal-KO, hHO-1	Tac, Sir, Met, Rtx, sFcR, ATG
	P28	Gal-KO, hHO-1	Tac, Sir, Met, Rtx, sFcR

**Tabelle 3.3: Das immunsuppressive Regime.** P = Pavian (n = 11); Tac = Tacrolimus; Sir = Sirolimus; Met = Methylprednisolon; ATG = Anti-Thymozytenglobulin; Rtx = Rituximab; sFcR = löslicher Fc-Rezeptor FcyRIIb; IA = Immunadsorption; CyP = Cyclophosphamid

## 3.4. Abstoßungsdiagnostik

### 3.4.1. Zytoimmunologisches Monitoring

Das zytoimmunologische Monitoring (ZIM) ist ein nicht-invasives Verfahren zur frühzeitigen Diagnose der akuten Abstoßungsreaktion. Dabei werden im peripheren Blut zirkulierende Lymphozyten subtypisiert und quantitativ erfasst. Das Verfahren wurde in den 80er Jahren u.a. von Prof. Dr. Dr. C. Hammer am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München

entwickelt, um die hohe Anzahl notwendiger Endomyokardbiopsien bei herztransplantierten Patienten zu reduzieren (Hammer 1989).

In einen Eppendorf-Tube wurde das Blut über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten mit einer Dichte von  $d = 1,077$  nach der Methode von Böyum getrennt. Dabei wurden zu 0,5 ml heparinisiertem Vollblut und 0,5 ml PBS vorsichtig 0,5 ml Ficoll Solution (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gegeben und die Lösung anschließend mit 3200 U/min für 2 Minuten zentrifugiert.

Der sich dabei bildende Interphasering aus mononukleären Zellen wurde abpipettiert und in einen neuen Eppendorf-Tube mit 0,5 ml PBS gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Zellen und Zentrifugieren bei 3200 U/min für je 1 Minute wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das entstandene Pellet aus mononukleären Zellen wurde in eine Küvette der Zyro-Zentrifuge gegeben und durch Zentrifugieren bei 500 U/min für 5 Minuten auf einen Objekträger übertragen. Anschließend wurde das Präparat luftgetrocknet und konnte nach May-Grünwald-Giemsa angefärbt werden:

May-Grünwald-Lösung für 4 Minuten,

Spülung mit destilliertem Wasser für 2 Minuten,

Giemsa-Lösung (1/20) für 20 Minuten,

abschließende Spülung mit destilliertem Wasser für 2 Minuten.

Unter dem Mikroskop wurden 2x100 Zellen ausgezählt und protokolliert (s. Anhang). Die Auswertung basierte auf den Kenntnissen aus „*Cytology in Transplantation*“ von Prof. Dr. Dr. C. Hammer, Verlag R.S. Schulz 1989.

### 3.4.2. Anti- $\alpha$ Gal-Antikörper-ELISA

Die Anti- $\alpha$ Gal-Antikörper-Bestimmung diente der Messung zirkulierender Antikörper im Empfängerorganismus, die sich gegen Gal- $\alpha(1,3)$ -Gal-Epitope auf porcinen Endothelzellen richten und eine maßgebliche Rolle bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion spielen.

Die Bestimmung der Anti- $\alpha$ Gal-Antikörper-Spiegel erfolgte täglich, sowie intraoperativ zu drei verschiedenen Zeitpunkten:

Z1: Vor Herzimplantation

Z2: Nach Reperfusion

Z3: Bei Operationsende.

Vor dem Versuchstag wurden zwei Mikrotiterplatten (Nunc Polysorb 96-Well-Platten) über Nacht bei 4 °C vorbeschichtet, eine mit dem Gal- $\alpha$ (1,3)-Gal-Antigen in Form des Linear-B-Trisaccharid-(Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ 1(1,4)GlcNAc)-HSA-Komplexes (Dextra Labs, Reading, United Kingdom, 5 µg/ml in Karbonpuffer pH 9,6 + 4% bovines Serumalbumin) und die andere mit PBS-Puffer (*phosphate-buffered saline*, Dulbecco's PBS, MP Biomedicals, Solon, Ohio) als Negativkontrolle.

Ansatz der Waschlösung:

2250 ml Aqua dest.

250 ml PBS (Dulbecco's PBS, MP Biomedicals, Solon, Ohio)

2,5 ml Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Ansatz der blocking solution:

90 ml Aqua dest.

10 ml PBS

0,5 ml Tween 20

Am Versuchstag wurden beide Platten einmal mit der angesetzten Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 300 µl/Well *blocking solution* versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, danach ausgeklopft. Human- und Pavianserum wurde 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert, mit *blocking solution* verdünnt (1:2,5), in einer Verdünnungsreihe auf die Platten aufgetragen und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert.

Die inkubierten Platten wurden insgesamt sieben Mal mit der angesetzten Waschlösung gewaschen und anschließend mit der 1:1000 verdünnten Peroxidase-konjugierten Antikörperlösung (*goat anti-human IgG/IgM*, Dextra Labs, Reading, UK) versetzt. Es folgte eine weitere Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

Abschließend wurden die Platten nochmals sieben Mal gewaschen bevor mit 100 µl/Well Phenylediaminedihydrochlorid (Sigma-Fast-Phenyldiamin-Kit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) eine Farbreaktion induziert wurde, die nach 5 Minuten mit 50 µl/Well 1 M Schwefelsäure fixiert wurde.

Die photometrische Messung erfolgte bei 490 nm. Mit Hilfe eines Computerprogrammes (Novartis Pharmaceuticals Corporation, New Jersey, USA) wurden die AUC (*area under the curve*) - Werte für die Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-IgG und -IgM - Antikörperkonzentrationen berechnet. Dabei wurden die Werte der gebundenen, unspezifischen Serumantikörper der PBS-Kontrollplatte subtrahiert. Die gemessene Absorption der humanen Kontrollseren wurde als Standard mit 1000 AUC-Einheiten notiert.

### 3.4.3. Anti-Schwein-Antikörper-ELISA

Der Anti-Schwein-Antikörper-ELISA diente der Bestimmung von hämolytischen Anti-Schwein-Erythrozyten-Antikörpern im Empfängerorganismus. Dabei wurden sowohl vorhandene präformierte natürliche Antikörper als auch die nach Transplantation infolge der Immunreaktion gebildeten induzierten Antikörper gegen das porcine Spenderorgan gemessen. Die Bestimmung der Anti-Schwein-Antikörper war essentiell für die Diagnosestellung einer akut vaskulären Abstoßungsreaktion.

Die Bestimmung der Anti-Schwein-Antikörper-Spiegel erfolgte täglich, sowie intraoperativ zu drei verschiedenen Zeitpunkten:

Z1: Vor Herzimplantation

Z2: Nach Reperfusion

Z3: Bei Operationsende.

Zur positiven Kontrolle diente Humanserum, dass in einem Pool aliquotiert und bei -70 °C gelagert wurde. Das Pavianserum wurde durch 20-minütiges Zentrifugieren von Vollblut bei 4000 U/min gewonnen. Humanes Serum und Pavianserum wurden bei 56 °C für 30 Minuten hitzeinaktiviert und anschließend bei 17000 G für 5 Minuten nochmals zentrifugiert um kleinste Partikel zu entfernen.

Ansatz des CFD-Puffers:

200 ml Aqua dest.

50 ml CFD (*complement fixation test diluent*, Oxoid, Ltd., Basingstoke, UK)

Gewinnung von Schweineerythrozyten (PRBC):

3-5 ml Schweineblut wurden mit 30 ml CFD-Puffer verdünnt und anschließend bei 750 G für 6 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden erneut 30 ml CFD-Puffer hinzugefügt. Die Pufferlösung wurde insgesamt vier Mal gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das noch leicht flüssige Pellet aus Schweineerythrozyten bei 1700 G für 2 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden 100 µl des Pellets zu 9,9 ml CFD-Puffer in einen Tube gegeben (PRBC = *pig red blood cells*).

Auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde von jeder Serumprobe mit dem Komplementfixationsverdünnner (CFD-Puffer) eine Verdünnungsreihe von 1:2,5 bis 1:1280 hergestellt. Nach Zugabe von 50 µl PRBC wurden die Proben verschlossen und unter automatischem Schütteln eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Nach Zugabe von 100 µl CFD-Puffer in alle Proben wurden die Platten bei Raumtemperatur und 500 G für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und zu den entstandenen Pellets je 200 µl CFD-Puffer hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten erneut bei Raumtemperatur und 500 G für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 150 µl Baby-Rabbit-Komplement (AbD Serotec, North Carolina, USA) wurden die Proben verschlossen und unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Schließlich wurden die Proben bei 500 G für 10 Minuten zentrifugiert und jeweils 100 µl des Überstandes in nicht-konische 96-Well-Photometerplatten gegeben. Die photometrische Messung erfolgte bei 420 nm in einem Plattenablesegerät (Tecem Spectra Rainbow, Madein, Österreich). Für jede Probe wurde die mittlere Absorption berechnet und mit Hilfe eines Computerprogrammes (Novartis Pharmaceuticals Corporation, New Jersey, USA) in AUC (*area under the curve*) -

Einheiten übertragen. Die gemessene Absorption der humanen Kontrollseren wurde dabei als Standard mit 1000 AUC-Einheiten notiert.

Als positive Kontrolle diente eine vollständige Hämolyse der Schweineerythrozyten induziert durch Hinzugabe von Aqua dest. . Die negative Kontrolle bestand aus Schweineerythrozyten und Komplement in Abwesenheit von Antikörpern, d.h. ohne Serumzugabe und zeigte keine Zelllyse.

#### 3.4.4. Interleukin-6-Spiegel-Bestimmung

Die Bestimmung des Interleukin-6-Spiegels erfolgte täglich mittels ELISA am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern.

#### 3.4.5. TNF $\alpha$ -Spiegel-Bestimmung

Die tägliche Bestimmung des TNF $\alpha$ -Spiegels bei Pavian 25, 27 und 28 erfolgte mit einem vorbeschichteten ELISA-Kit (Human TNF $\alpha$  Ready-SET-Go! ELISA Kit, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA). Nach Hinzugabe des Pavianserums sowie der mitgelieferten Lösungen und mehreren Waschvorgängen erfolgte die photometrische Messung bei 450 nm. Die TNF $\alpha$ -Spiegel wurden in pg/ml angegeben.

### 3.5. Endpunkte der Studie

Als Studienendpunkte galten folgende zwei Kriterien:

1. Ein Sistieren der Pumpfunktion des Transplantates, durch die ein ausreichender Blutfluss durch das Organ nicht mehr gewährleistet wird.
2. Eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Empfängertiere, die ein unzumutbares Leiden verursacht (durch das Transplantat selbst, durch die Abstoßungsreaktion, durch postoperative Komplikationen, therapierefraktäre Infektionen und Medikamententoxizitäten eingeschlossen). In diesem Fall

wurden die Tiere mit 10 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid sediert und nach Gabe von Fentanyl und Propofol mit einer Überdosis Phenobarbital/Kaliumchlorid euthanasiert.

### **3.6. Präparatentnahme und Pathologie**

Das heterotope Transplantationsmodell sieht eine Explantation des Spenderorgans nach Erreichen des Studienendpunktes ohne Euthanasie der Empfängertiere vor. Diese konnte bei unzumutbarem Leiden aber nicht immer vermieden werden. Die Sektion der Tiere erfolgte dann durch einen in der Transplantationsmedizin erfahrenen Pathologen des Pathologischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern. Dabei wurden nach Explantation des Spenderorgans Gewebeproben aller vier Herzkammern entnommen, auf Korkplättchen mit Gewebekleber (Tissue Tek, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Neuseeland) fixiert, in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bis zur weiteren Verwertung bei -80 °C gelagert. Das restliche Transplantat wurde in 4%-gepuffertem Formalin konserviert. Zusätzlich wurden Gewebeproben von Eigenherz, Leber, Lunge, Niere und Darm des Empfängertieres genommen.

Bei der Spenderoperation wurden nach Transplantatentnahme ebenfalls Gewebeproben entnommen. Dabei wurden Proben von Lunge, Leber, Niere und Haut vom Ohr jeweils in Formalin konserviert und in Stickstoff schockgefroren.

Die histopathologische Untersuchung erfolgte ebenfalls durch den Pathologen.

Die Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

Zur immunhistochemischen Analyse wurden Verdünnungsreihen monoklonaler Antikörper gegen C4d (1:10, Biozol, Eching, Deutschland), IgM (1:300, Dako, Hamburg, Deutschland), Fibrin (1:5500, American Diagnostica, Pfungstadt, Deutschland) und CD3+ (1:500, ThermoScientific, Fremont, California, USA) angesetzt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Detektion der gebundenen primären Antikörper wurde ein spezielles

Immunoperoxidase-Polymer mit gebundenen Anti-Ratte-IgG-Antikörper-Fab-Fragmenten (Histofine® Simple Stain Rat MAX PO Kit, Medac, Wedel, Deutschland) und einem Sekundärantikörper (Kaninchen) als Bindung zwischen Primärantikörper und Peroxidase-Komplex verwendet. Anschließend erfolgte die Färbung mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, DAKO, Hamburg, Deutschland). CD3 wurde unter Verwendung eines Färbeautomaten (Ventana BenchMark®) und dem dazugehörigen Färbesets (XT ultraView DAB Kit®, Ventana Medical Systems) dargestellt.

### **3.7. Statistik**

Zwar wurden die Versuchstiere bezüglich ihrer Transgenität in fünf unterschiedlichen Gruppen zugeordnet, dies erlaubte aber keinerlei statische Analysen. Aufgrund der aufwendigen Versuchsdurchführung und der erheblichen Kosten jedes einzelnen Versuches ist dieses Vorgehen im Sinne einer Orientierungsstudie unvermeidbar und allgemein anerkannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden rein deskriptiv als Fallberichte dargestellt und diskutiert. Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel (MS Office 2007) wurden Daten verschiedenen Kriterien zugeordnet und grafisch erfasst.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Transplantatüberleben und Studienendpunkte

Gruppe	Pavian	Spender	Immunsuppression	Transplantat- überleben	Endpunkte
B1	P19	hDAF, HLA-E	Tac, Sir, Met, TPC, Anti-HLA-DR-Ak	14 Tage < 1 Std.	Transplantatversagen, intraventrikulärer Thrombus
			Tac, Sir, Met, TPC, Anti-HLA-DR-Ak		HAR
B2	P21	hDAF, HLA-E, TRAIL	Tac, Sir, Met, TPC, Anti-HLA-DR-Ak, ATG	17 Tage 3 Std.	Transplantatversagen, AVXR wahrscheinlich, intraventrikulärer Thrombus
			Tac, Sir, Met, TPC, Rtx		Intraabdominelle Blutung
B3	P23	Gal-KO	Tac, Sir, Met, TPC, Rtx, sFcR, ATG	8 Tage	Ileus, keine XR, kein Transplantatversagen
			Tac, Sir, Met, TPC, Rtx, sFcR		Ileus, keine XR, kein Transplantatversagen
B4	P25	Gal-KO, CD46	Tac, Sir, Met, TPC, Rtx, sFcR, ATG	17 Tage	milde AVXR, Sepsis, kein Transplantatversagen,
			Tac, Sir, Met, Rtx, sFcR, ATG, IA (Tag 0, 5)		milde AVXR, intraventrikulärer Thrombus
	P29	Gal-KO, CD46	Tac, Sir, Met, Rtx, sFcR, ATG, IA (Tag 0, 9, 13, 18, 23), CyP	7 Tage	keine XR, intraventrikulärer Thrombus
B5	P27	Gal-KO, hHO-1	Tac, Sir, Met, Rtx, sFcR, ATG	13 Tage	moderate ACXR, Transplantatversagen
	P28	Gal-KO, hHO-1	Tac, Sir, Met, Rtx, sFcR	8 Tage	moderate AVXR, Transplantatversagen, GI-Blutung

**Tabelle 4.1:** Transplantatüberlebenszeiten und Studienendpunkte nach heterotoper abdominaler Xenotransplantation ein- und mehrfach-transgener Spenderherzen in Paviane (n = 11). P = Pavian; Tac = Tacrolimus; Sir = Sirolimus; Met = Methylprednisolon; ATG = Anti-Thymozytenglobulin; Rtx = Rituximab; sFcR = löslicher Fc-Rezeptor FcγRIIb; IA = Immunadsorption; CyP = Cyclophosphamid; Std = Stunden; XR = xenogene Abstoßung; GI = gastrointestinal

Das Spenderherz wurde in 4 von 11 Fällen abgestoßen (*Tabelle 4.1*). Darunter fand sich ein Fall von hyperakuter Abstoßung (**Pavian 20**). Zwei Transplantate unterlagen einer akut vaskulären (**Pavian 21 und 28**) und ein Transplantat einer akut zellulären (**Pavian 27**) Abstoßung. Eine beginnende milde akut vaskuläre Abstoßungsreaktion konnte histopathologisch bei **Pavian 25 und 29** diagnostiziert werden. Die längste Überlebenszeit mit 29 Tagen konnte unter Verwendung eines Gal-KO/CD46-transgenen Spenderherzens und der Kombination aus löslichem Fc $\gamma$ RIIb-Rezeptor, extrakorporaler Immunadsorption und Cyclophosphamid in **Pavian 30** erzielt werden.

Die Explantation der porcinen Spenderherzen, der präoperative Verlauf mit Einleitung der Narkose und Narkoseführung verlief bei allen heterotopen Herztransplantationen komplikationslos. Die durchschnittliche Ischämiezeit der transplantierten Organe betrug  $116 \pm 49$  Minuten.

Bei **Pavian 19** war die Kontraktion des Spenderherzens ab dem 10. postoperativen Tag nur noch schwach palpabel. Nach vollständigem Sistieren der Transplantatfunktion erfolgte die Explantation am 14. postoperativen Tag. Es bestanden schwere Verwachsungen des gesamten Spenderherzens mit dem Darm des Empfängertieres, die durch Präparation komplikationsfrei gelöst werden konnten. Die Anastomosierungsstelle der abdominalen Empfängeraorta wurde durch eine direkte Gefäßnaht wieder verschlossen und die Kontinuität der abdominalen V. cava durch Einnahrt eines Gefäßpatches wiederhergestellt. Nach Extubation und unter suffizienter Schmerztherapie erfolgte der Rücktransport in die Tierstallungen. Das Transplantat zeigte eine ausgedehnte myokardiale Totalnekrose und massive Thromben in beiden Vorhöfen und Ventrikeln. Neben einer Perfusionsproblematik als Ursache des Transplantatversagens konnte eine akut vaskuläre Abstoßungsreaktion aufgrund mangelhafter Beurteilbarkeit des nekrotischen Präparates nicht bestätigt werden.

Bei der Reperfusion des Spenderorgans in **Pavian 20** stellte sich das Spendermyokard nach initialer fleckig-livider Verfärbung unauffällig dar. Während der Eingriff beendet wurde, kam es plötzlich zum Sistieren der Kontraktion des

Transplantates, das deutlich an Größe zugenommen hatte und sich ausgeprägt dunkel verfärbt darstellte. Das Transplantat wurde in gleicher Sitzung explantiert, die Gefäßsituation wie bei Pavian 19 rekonstruiert und das Tier nach Extubation in die Tierstallung zurücktransportiert. Die histopathologische Untersuchung bestätigte die Diagnose einer hyperakuten Abstoßungsreaktion.

Bei **Pavian 21** kam es ab dem 14. postoperativen Tag zur Verschlechterung der Transplantatfunktion. Die Explantation erfolgte am 17. postoperativen Tag nach vollständigem Sistieren der Kontraktion unter Wiederherstellung der Gefäßverhältnisse wie bei Pavian 19 und 20. Es zeigten sich schwere Verwachsungen des gesamten Spenderherzens mit dem Darm des Tieres. Wie bei Pavian 19 konnte die Ursache für das Transplantatversagen aufgrund der mangelhaften Beurteilung des nekrotischen Präparates nicht geklärt werden. Eine akut vaskuläre Abstoßungsreaktion wurde als wahrscheinlich angenommen.

Bei **Pavian 22** stellte sich die intraoperative Gefäßsituation als extrem problematisch dar. Immer wieder kam es zu Gefäß- und Gewebezerreißen, die mehrfach übernäht werden mussten. Nach Implantation des Spenderherzens wurde die Operation bei trockenem Operationssitus und Kreislaufstabilität beendet. Das Tier verstarb ungefähr drei Stunden postoperativ. In der anschließenden Obduktion konnte eine schwere intraabdominelle Blutung als Ursache des Versterbens nachgewiesen werden. Histopathologische Zeichen einer hyperakuten Abstoßung lagen nicht vor.

**Pavian 23** und **24** mussten am 8. postoperativen Tag aufgrund einer massiven Ileussymptomatik und einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes euthanasiert werden. Beide Transplantate zeigten final eine gute palpatorische Pumpfunktion (Score 2-3) und wiesen histopathologisch keinerlei Zeichen einer Abstoßungsreaktion auf.

**Pavian 25** wurde nach postoperativem Absetzen von blutigem Stuhl mit Erythrozytenkonzentraten und einer Antibiotikatherapie für eine Woche therapiert. Nach Absetzen von Sirolimus verbesserte sich der Allgemeinzustand. Im Verlauf stiegen die Entzündungsparameter sowie Herz-, Nieren- und Leberwerte stetig an, sodass das Tier bei Verdacht auf ein therapeutisch nicht beherrschbares septisches Geschehen am 17. postoperativen Tag euthanasiert werden musste. Final zeigte das Transplantat palpatorisch nur eine schwache Pumpfunktion

(Score 1-2) und post mortem morphologische Zeichen einer beginnenden akut vaskulären Abstoßungsreaktion.

Bei **Pavian 27** zeigte sich ab dem 9. postoperativen Tag ein Anstieg der Anti-Schwein-Antikörperspiegel im Serum, der trotz ATG-rescue-Therapie nicht gesenkt werden konnte. Elektrokardiographisch konnte am 13. postoperativen Tag ein großer linksventrikulärer Thrombus dargestellt und das Sistieren der Pumpfunktion des Transplantates bestätigt werden. Histopathologisch wurde die Diagnose einer akut zellulären Abstoßungsreaktion gestellt.

**Pavian 28** verstarb am 8. postoperativen Tag an einer ischämischen Enterokolopathie mit Absetzen von blutigem Stuhl. Neben steigenden Anti-Schwein-Antikörperspiegeln und einer echokardiographisch gesicherten schwachen Pumpfunktion des Transplantates wurde histopathologisch eine akut vaskuläre Abstoßungsreaktion diagnostiziert.

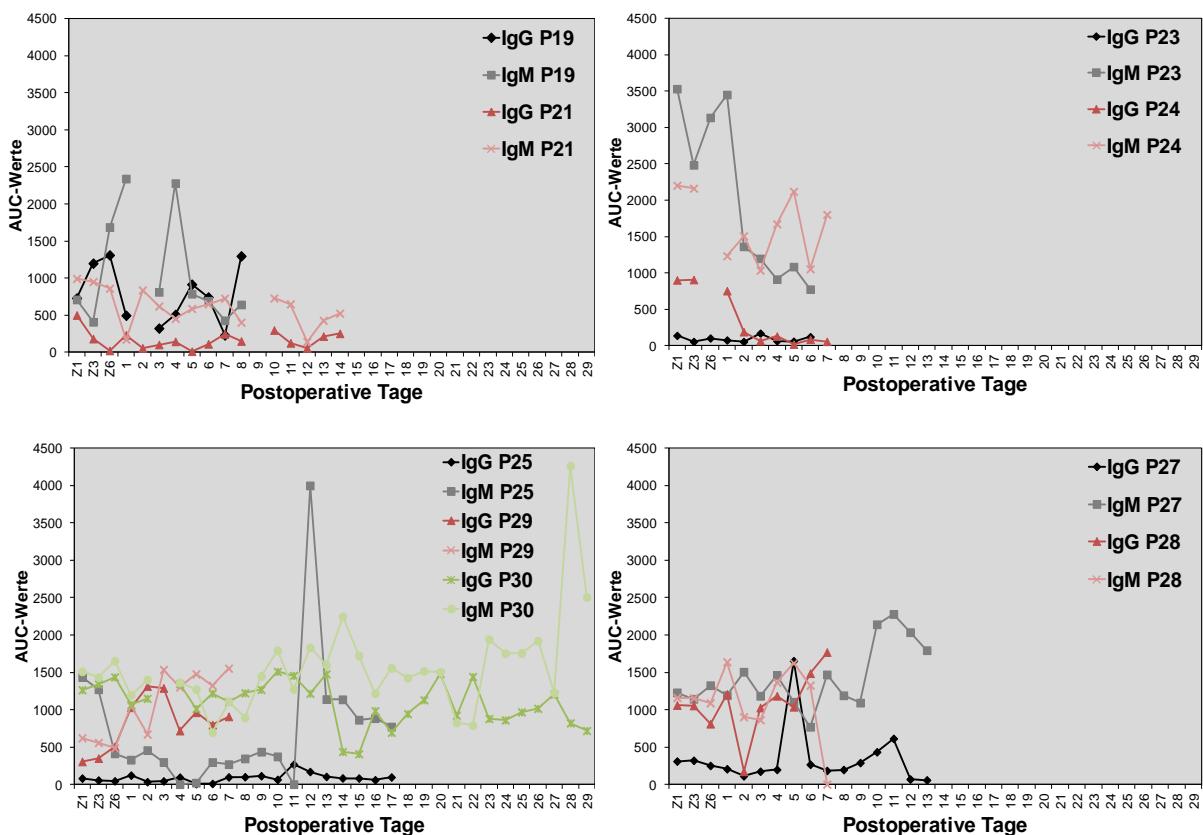
Bei **Pavian 29** wurde das Sistieren der Pumpfunktion des Transplantates am 7. postoperativen Tag echokardiographisch nachgewiesen. Histopathologisch wurde eine ischämische Schädigung für das Transplantatversagen verantwortlich gemacht. Daneben wies das Präparat zum Teil Zeichen einer akut vaskulären Abstoßungsreaktion auf.

**Pavian 30** wies das längste Transplantatüberleben von 29 Tagen auf. Ab dem 26. postoperativen Tag stiegen die Leberwerte stark an und der Allgemeinzustand des Tieres verschlechterte sich deutlich, sodass alle entbehrbaren Medikamente sowie das ATG-Präparat nicht weiter verabreicht wurden. Am 29. postoperativen Tag erfolgte die Explantation des Transplantates nachdem zuvor echokardiographisch ein Fehlen der Kontraktilität des Spenderorgans nachgewiesen werden konnte. Histopathologisch zeigten sich ausgedehnte ischämische Schädigungen und Myokardnekrosen, aber keine Anzeichen einer verzögerten oder zellulären Abstoßungsreaktion.

## 4.2. Abstoßungsdiagnostik

### 4.2.1. Anti- $\alpha(1,3)$ Gal-Antikörper

Die Anti- $\alpha(1,3)$ Gal-IgG- und -IgM-Antikörperspiegel fielen nach Transplantation meist unter deren Ausgangstiter - der von Tier zu Tier stark variierte - und blieben im postoperativen Verlauf mit einzelnen Ausnahmen (Pavian 19, 28 und 29) konstant niedrig (*Abbildung 4.1*).



**Abbildung 4.1:** Anti- $\alpha(1,3)$ Gal-Antikörperspiegel im postoperativen Verlauf (Angabe in AUC-Werten = *area under the curve*; den humanen Kontrollseren wurde eine Wert von 1000 AUC-Einheiten zugeordnet). (Z1 = vor Herzimplantation, Z2 = nach Reperfusion, Z3 = bei Operationsende). Die Empfängertiere wurden anhand des jeweiligen immunologischen Protokolls in Gruppen zusammengefasst: Oben links Pavian 19 (hDAF, HLA-E) und 21 (hDAF, HLA-E, TRAIL) unter Verwendung des humanen HLA-DR-Antikörpers. Oben rechts Pavian 23 und 24 (Gal-KO), unten links Pavian 25, 29 und 30 (Gal-KO, CD46) und unten rechts Pavian 27 und 28 (Gal-KO, hHO-1) je unter therapeutischer Behandlung mit dem löslichen Fc $\gamma$ RIIb-Rezeptor.

Erlag das Transplantat einer akuten Abstoßungsreaktion, wie bei Pavian 27 und 28, ließ sich präfinal ein Anstieg der Anti- $\alpha(1,3)$ Gal-IgM-Antikörperspiegel beobachten. Die deutliche Abweichung des gemessenen Anti- $\alpha(1,3)$ Gal-IgM-

Antikörpertiters an Tag 12 bei Pavian 25 ließ sich nicht plausibel erklären und muss als Messfehler gewertet werden. Bei allen anderen Tieren konnte die Anti- $\alpha(1,3)$ Gal-Antikörperproduktion im postoperativen Verlauf erfolgreich supprimiert werden.

#### 4.2.2. Anti-Schwein-Antikörper

Der Ausgangstiter der Anti-Schwein-Antikörper (APA) variierte stark von Tier zu Tier (*Abbildung 4.2*).

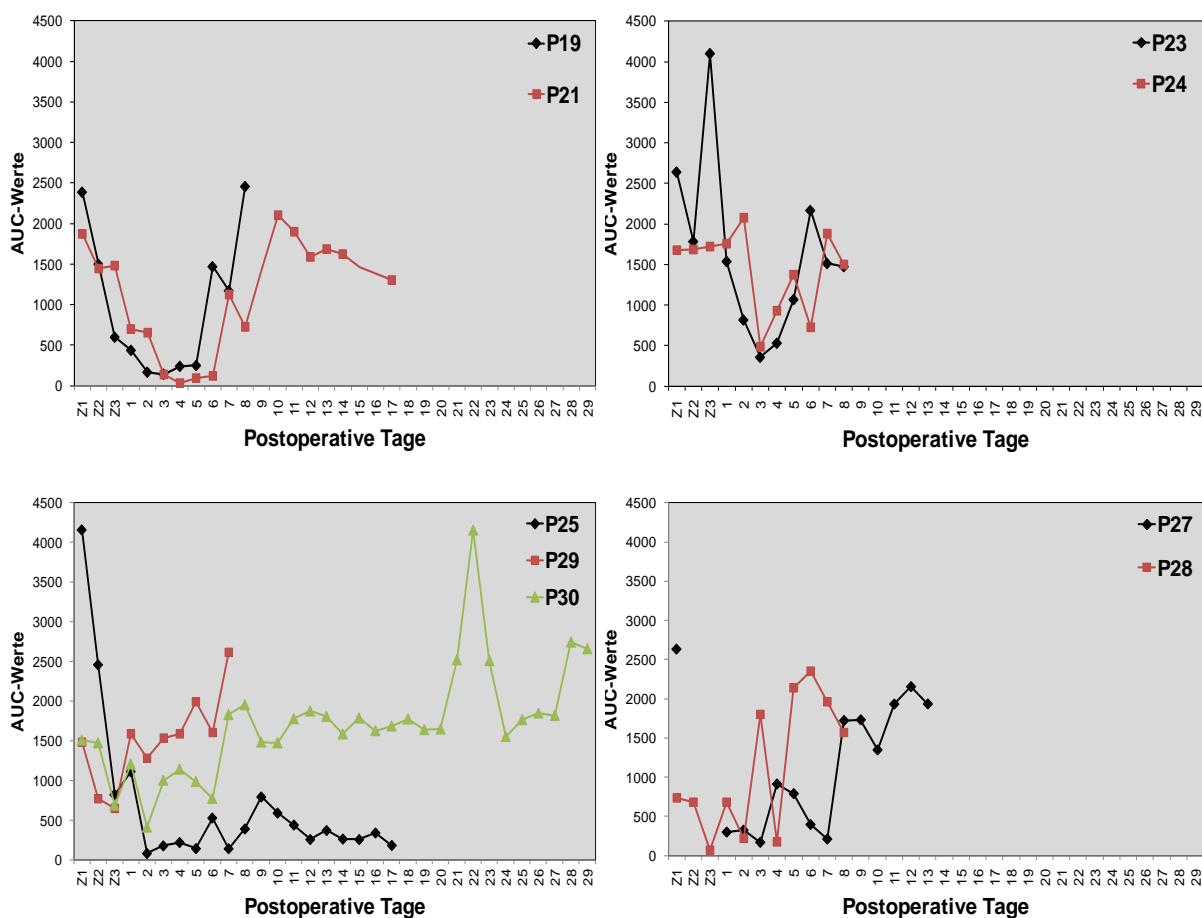
**Pavian 19** und **21** erhielten den humanen HLA-DR-Antikörper 1D09C3 zum Zeitpunkt der Reperfusion und postoperativ in einem Intervall von sieben Tagen. Bei beiden Tieren konnte ab dem 5. postoperativen Tag ein Anstieg der Antikörper über den Ausgangswert beobachtet werden (*Abbildung 4.2*, oben links). Obwohl bei Pavian 21 am 14. postoperativen Tag mit der Gabe des ATG-Präparates begonnen wurde, sanken die Antikörperspiegel nur unzureichend ab und die Transplantatfunktion verschlechterte sich in den darauffolgenden Tagen.

Die postoperativen APA-Spiegel im Serum von **Pavian 23** und **24** blieben unter Gabe des Fc $\gamma$ RIIb-Rezeptors bis zum 8. postoperativen Tag unterhalb der Antikörper-Ausgangstiter (*Abbildung 4.2*, oben rechts). Pavian 23 erhielt zusätzlich ab dem 6. postoperativen Tag das ATG-Präparat. Beide Tiere mussten aufgrund einer Ileussymptomatik am 8. postoperativen Tag euthanasiert werden.

Das längste Transplantatüberleben zeigte sich in der Gal-KO/CD46-Gruppe bei **Pavian 30** (*Abbildung 4.2*, unten links). Bis zum 20. postoperativen Tag konnte der APA-Spiegel durch die Kombination aus Fc $\gamma$ RIIb-Rezeptor, ATG und Cyclophosphamid konstant gehalten werden. Das ATG-Präparat wurde vom 8. bis zum 13. postoperativen Tag und vom 19. bis zum 26. postoperativen Tag und damit länger als üblich verabreicht. Ansteigende Antikörperspiegel konnten erfolgreich mittels der extrakorporalen Immunadsorption (30-40 Zyklen) an Tag 0, 9, 13, 18 und 23 gesenkt werden. Bei **Pavian 29** kam es im postoperativen Verlauf zu einem kontinuierlichen Anstieg der APA-Spiegel. Der Versuch diesen durch ATG-Gabe ab dem 2. postoperativen Verlauf zu senken, blieb erfolglos. Auch die extrakorporale Immunadsorption (40 Zyklen) am 5. postoperativen Tag führte nur zu einer temporären Reduktion der Antikörperspiegel. Es folgte ein Rebound am 7. postoperativen Tag. Bei **Pavian 25** konnten die APA-Spiegel deutlich unterhalb

des Ausgangsniveaus gesenkt und im postoperativen Verlauf konstant niedrig gehalten werden (Abbildung 4.2, unten links). Ab dem 12. postoperativen Tag wurde bei laborchemisch steigenden Herzenzymen zusätzlich ATG verabreicht.

Bei **Pavian 27** und **28** kam es nach einem initial niedrigem Antikörpertiter zu intervallartigen Anstiegen im postoperativen Verlauf. Pavian 27 erhielt ab dem 9. postoperativen Tag das ATG-Präparat. Trotzdem wurde das Transplantat am 13. postoperativen Tag akut zellulär abgestoßen. Das Spenderorgan von Pavian 28 zeigte histopathologisch eine akut vaskuläre Abstoßung.



**Abbildung 4.2:** Anti-Schwein-Antikörperspiegel im postoperativen Verlauf (Angabe in AUC-Werten = area under the curve; den humanen Kontrollseren wurde eine Wert von 1000 AUC-Einheiten zugeordnet). (Z1 = vor Herzimplantation, Z2 = nach Reperfusion, Z3 = bei Operationsende). Die Empfängertiere wurden anhand des jeweiligen immunologischen Protokolls in Gruppen zusammengefasst: Oben links Pavian 19 (hDAF, HLA-E) und 21 (hDAF, HLA-E, TRAIL) unter Verwendung des humanen HLA-DR-Antikörpers. Oben rechts Pavian 23 und 24 (Gal-KO), unten links Pavian 25, 29 und 30 (Gal-KO, CD46) und unten rechts Pavian 27 und 28 (Gal-KO, hHO-1) je unter therapeutischer Behandlung mit dem löslichen Fc<sub>Y</sub>RIIb-Rezeptor.

#### 4.2.3. Zytoimmunologisches Monitoring

Das mononukleäre Konzentrat zeigt im Normalbefund einen Monozytenanteil von 50-60% und einen Lymphozytenanteil von 30-40% (Abbildung 4.3). Aktivierte Lymphozyten und Lymphoblasten fehlen. Ihr Anteil im Konzentrat, das mit peripheren Blutzellen auffallend kontaminiert ist, steigt bei einer beginnenden Abstoßungsreaktion. Das Bild einer akut vaskulären Abstoßung ist charakterisiert durch die Zunahme an aktivierten B-Lymphozyten und Plasmazellen. Bei der akut zellulären Abstoßung hingegen dominieren prozentual vor allem aktivierte T-Lymphozyten und Granulozyten das Zellbild. B-Lymphozyten und Plasmazellen sind kaum vorhanden. Auch eine Infektion kann mittels ZIM von einer Abstoßung differenziert werden. Bei viralen Infektionen dominieren LGL-Lymphozyten (*large granular lymphocytes*). Bei bakteriellen Infektionen zeigen sich vor allem eine Linksverschiebung und eine Kontamination mit Myelozyten.

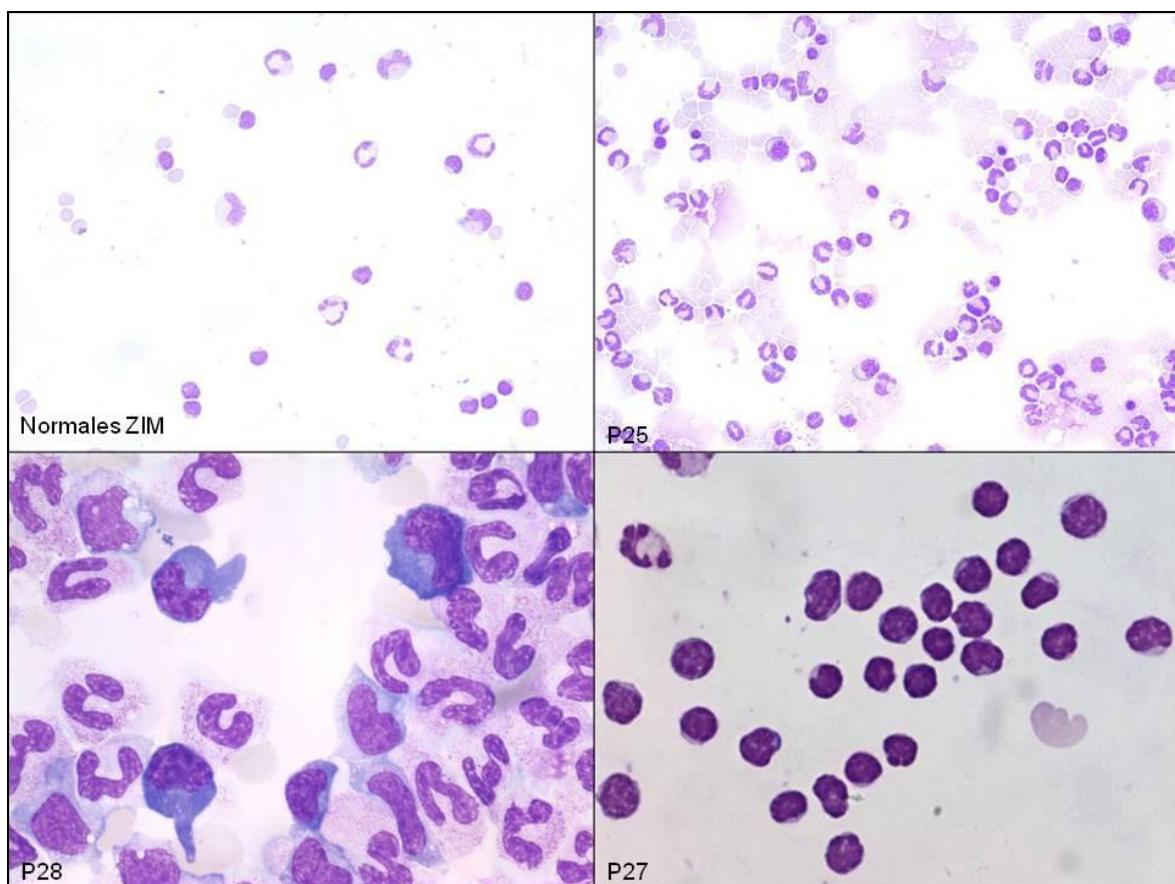


Abbildung 4.3: Zytoimmunologisches Monitoring (ZIM). Normalbefund (links oben). Beginnende akut vaskuläre Abstoßung Pavian 25 (6. postoperativer Tag, oben rechts). Akut vaskuläre Abstoßung Pavian 28 (5. postoperativer Tag, unten links). Beginnende akut zelluläre Abstoßung Pavian 27 (7. postoperativer Tag, unten rechts).

Am 6. postoperativen Tag zeigten sich bei **Pavian 25** eine moderate Aktivierung des Zellbildes mit steigender Lymphozytenzahl im mononukleären Konzentrat und eine Kontamination mit peripheren Blutzellen als Zeichen einer beginnenden akut vaskulären Abstoßungsreaktion. Am 14. postoperativen Tag betrug der Plasmazellanteil 35% und es kam zu einer Zunahme der B-Lymphozytenzahl. Der präfinale Lymphoblastenanteil betrug 10% des Konzentrates.

Bei **Pavian 28** schlug sich das Bild einer akut vaskulären Abstoßungsreaktion am 5. postoperativen Tag mit einem Lymphoblastenanteil von >10% nieder.

Bei **Pavian 27** zeigte sich am 7. postoperativen Tag bei beginnender akut zellulärer Abstoßungsreaktion ein dominierender T-Lymphozytenanteil. Nebenbefundlich fiel ein hoher Anteil an Eosinophilen und Basophilen Granulozyten auf.

#### 4.2.4. TNF- $\alpha$

Der TNF- $\alpha$ -Gehalt im Serum steigt bei einer Endothelzellaktivierung vom Typ II. Ein Anstieg ist auch bei lokalen oder systemischen Entzündungen zu beobachten. Die Bestimmung des TNF- $\alpha$ -Spiegels erfolgte bei Pavian 25, 27 und 28 additiv zum Nachweis eines akuten Abstoßungsgeschehens.

Bei **Pavian 25** bestand klinisch und laborchemisch der Verdacht auf ein septisches Geschehen. Es zeigte sich ein erhöhter, aber im Verlauf konstanter TNF- $\alpha$ -Spiegel ab dem 4. postoperativen Tag.

Bei **Pavian 27** kam es am 10. postoperativen Tag zu einem Peak-förmigen Anstieg des TNF- $\alpha$ -Wertes, der sich am 12. postoperativen Tag wieder auf seinen Ausgangswert normalisierte. Ein erneuter Anstieg am 13. postoperativen Tag zum Zeitpunkt der akut zellulären Abstoßung blieb aus. Zu einem Anstieg der APA-Spiegel kam es bereits am 7. postoperativen Tag, sodass sich hier keine zeitliche Korrelation beider Erhöhungen ergab.

Trotz moderater akut vaskulärer Transplantatabstoßung blieb der TNF- $\alpha$ -Spiegel im Serum von **Pavian 28** konstant niedrig zum präoperativen Ausgangswert.

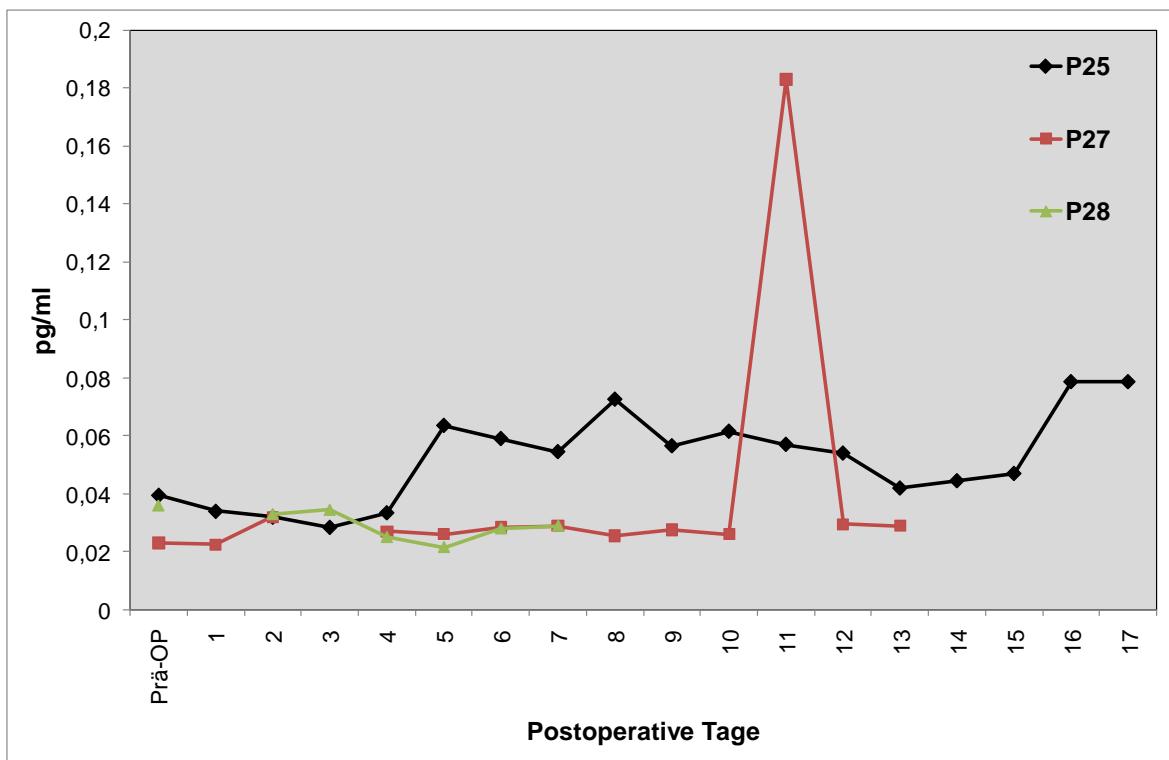


Abbildung 4.4: TNF- $\alpha$ -Spiegel (pg/ml) im postoperativen Verlauf von Pavian 25, 27 und 28.

#### 4.2.5. Interleukin-6-Spiegel

Der Referenzwert von Interleukin-6 im Serum lag bei 25-35 ng/ml. Als Aktivator der Akute-Phase-Proteine und als Stimulator für Lymphozyten steigt IL-6 im Serum bei infektiösen und entzündlichen Geschehen. Wie der TNF- $\alpha$ -Spiegel kann es zur Abstoßungsdiagnostik hinzugezogen werden. Bei Pavian 19 bis 22 wurde kein IL-6-Spiegel bestimmt.

**Pavian 23 und 24** zeigten im Rahmen des entzündlichen Geschehens bei klinischer Ileussymptomatik einen massiven Anstieg der IL-6-Spiegel im Serum. Bei **Pavian 28** stieg der IL-6-Spiegel deutlich progradient ab dem 7. postoperativen Tag an bevor das Transplantat am 8. postoperativen Tag akut vaskulär abgestoßen wurde. Bei **Pavian 25, 27, 29 und 30** blieb der IL-6-Spiegel im gesamten postoperativen Verlauf leicht oberhalb des Referenzwertes erhöht.

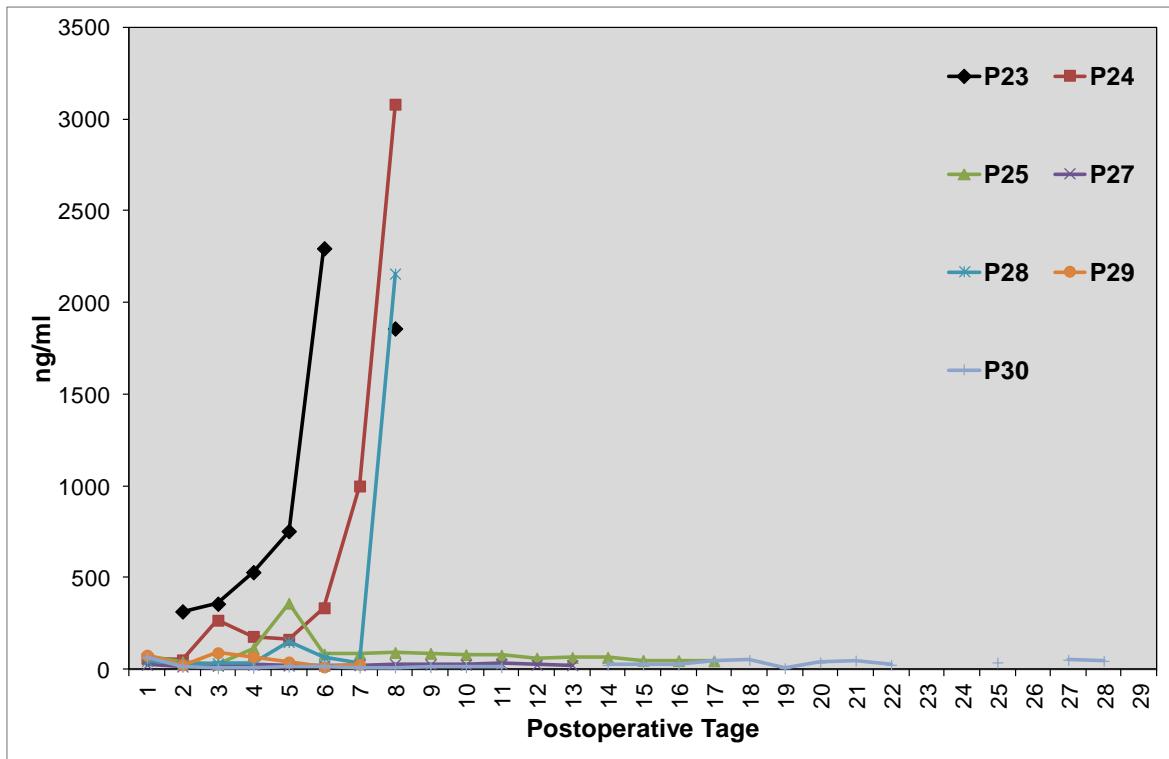
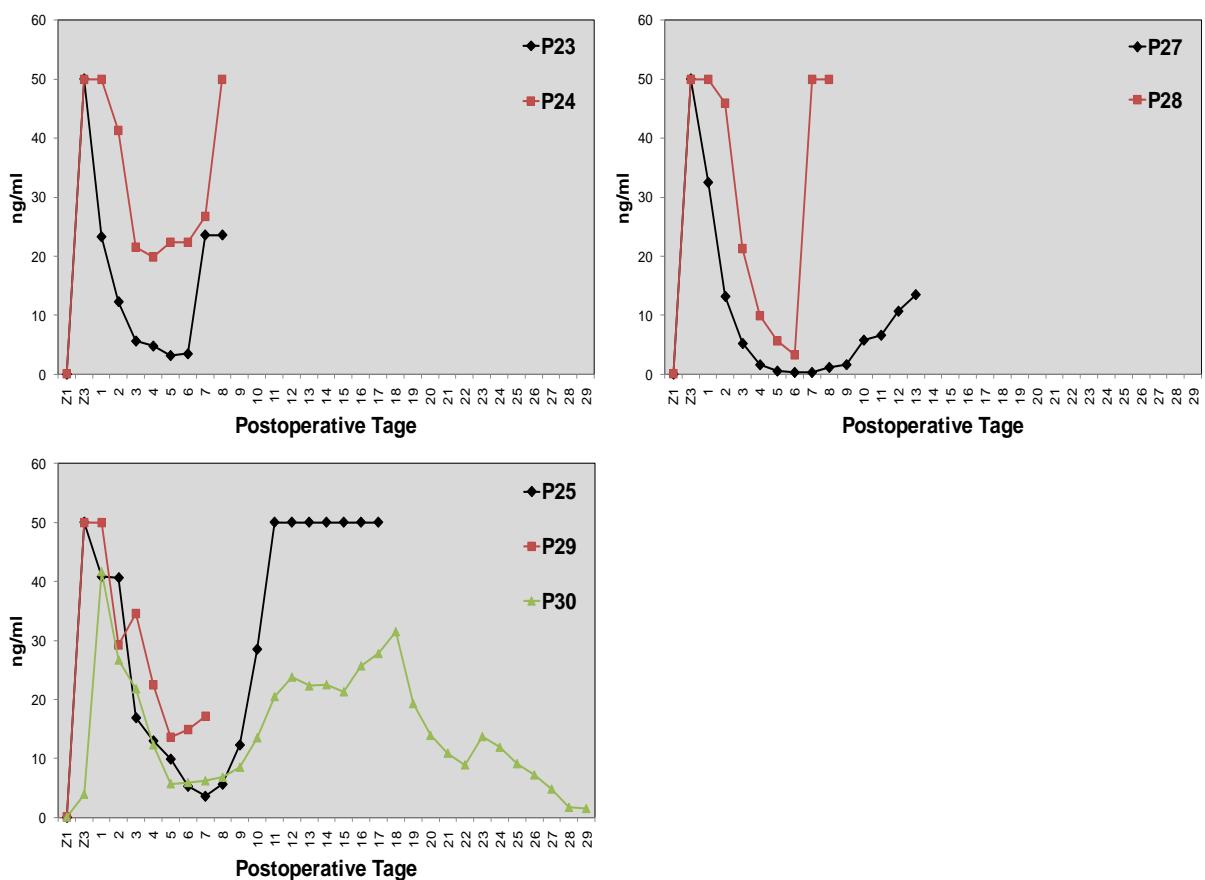


Abbildung 4.5: Interleukin-6-Spiegel (ng/ml) im postoperativen Verlauf.

#### 4.3. Klinisch-chemische Diagnostik

##### 4.3.1. Troponin

Der Serum-Normwert des Troponins lag bei < 0,05 ng/ml. Bei allen Tieren konnte intraoperativ ein Anstieg der Troponin-Werte gemessen werden. Dieser war hauptsächlich bedingt durch den Ischämie-Reperfusionsschaden und normalisierte sich meist innerhalb der ersten postoperativen Tage (Abbildung 4.6). Im Rahmen einer Abstoßungsreaktion stieg der Troponin-Spiegel im Serum deutlich an. Zur Abgrenzung von ischämiebedingten Schädigungen erfolgte die Beurteilung dabei stets unter Hinzuziehung der entsprechenden Anti-Schwein-Antikörper-Titer. Bei **Pavian 23** und **24**, bei denen es nicht zu einer Transplantatabstoßung kam, führte die heterotope Lage des Transplantates neben der bereits beschriebenen Ileussymptomatik zu einer verminderten Koronarperfusion mit ansteigenden Troponin-Werten.



**Abbildung 4.6:** Troponin I Ultra-Spiegel (ng/ml) im postoperativen Verlauf von Pavian 19 und 21 (oben links), Pavian 27 und 28 (oben rechts) und Pavian 25, 29 und 30 (unten links). (Z1 = vor Operationsbeginn; Z3 = bei Operationsende).

#### 4.3.2. Leukozyten

Der Referenzbereich der Leukozytenzahl lag bei 4.0-11.0 G/l. Aufgrund der Gabe des Methylprednisolons vor Öffnen der Aortenklemme stieg der Leukozytengehalt im Empfängerserum unmittelbar nach der Herzimplantation an (*Abbildung 4.7*). Durch die Gabe der Primärimmunsuppression und des ATG-Präparates wurde versucht einem übermäßigen Leukozytenanstieg entgegenzuwirken und einer zellulären Transplantaterstörung vorzubeugen. Der deutliche Leukozytenanstieg ab dem 8. postoperativen Tag bei **Pavian 25** unterstützte neben progredient steigenden Entzündungsparametern, erhöhten Herz-, Leber- und Nierenwerten und niedrig verlaufenden Anti-Schwein-Antikörper-Titern die Verdachtsdiagnose eines septischen Geschehens mit Multiorganversagen.

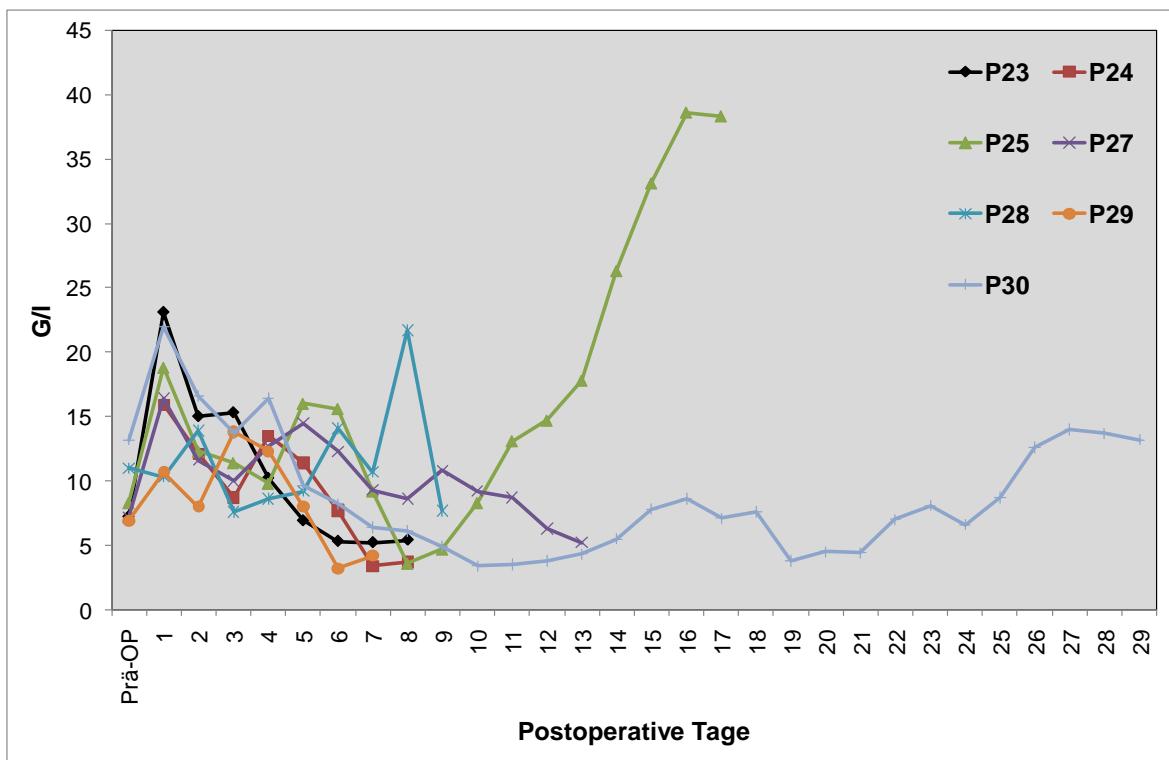


Abbildung 4.7: Leukozyten-Spiegel (G/I) im postoperativen Verlauf.

#### 4.3.3. Hämoglobin

Die Durchführung der heterotopen Operationstechnik machte den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine nicht notwendig, sodass der perioperative Blutverlust gering blieb (*Abbildung 4.8*). Bei **Pavian 29** und **30** fiel der Hämoglobinspiegel durch die Anwendung der extrakorporalen Immunadsorption und konnte im postoperativen Verlauf auf einem konstant niedrigen Niveau gehalten werden. **Pavian 25** setzte am 4. postoperativen Tag blutigen Stuhl ab und erhielt autologe Erythrozytenkonzentrate (4., 5. und 7. postoperativer Tag), mit denen der Hämoglobinspiegel im weiteren Verlauf langsam stabilisiert werden konnte. Unterstützend wurden Eisenpräparate verabreicht. **Pavian 28** erhielt nach einem postoperativen Abfall des Hämoglobinwertes auf 7,1 mg/dl einmalig ein autologes Erythrozytenkonzentrat. Nach Wiederanstieg auf Normwerte setzte das Tier am 7. postoperativen Tag blutigen Stuhl ab. Bei allen anderen Empfängertieren zeigten sich trotz der täglichen Blutentnahmen und der starken Immunsuppression durchweg stabile Hämoglobinwerte.

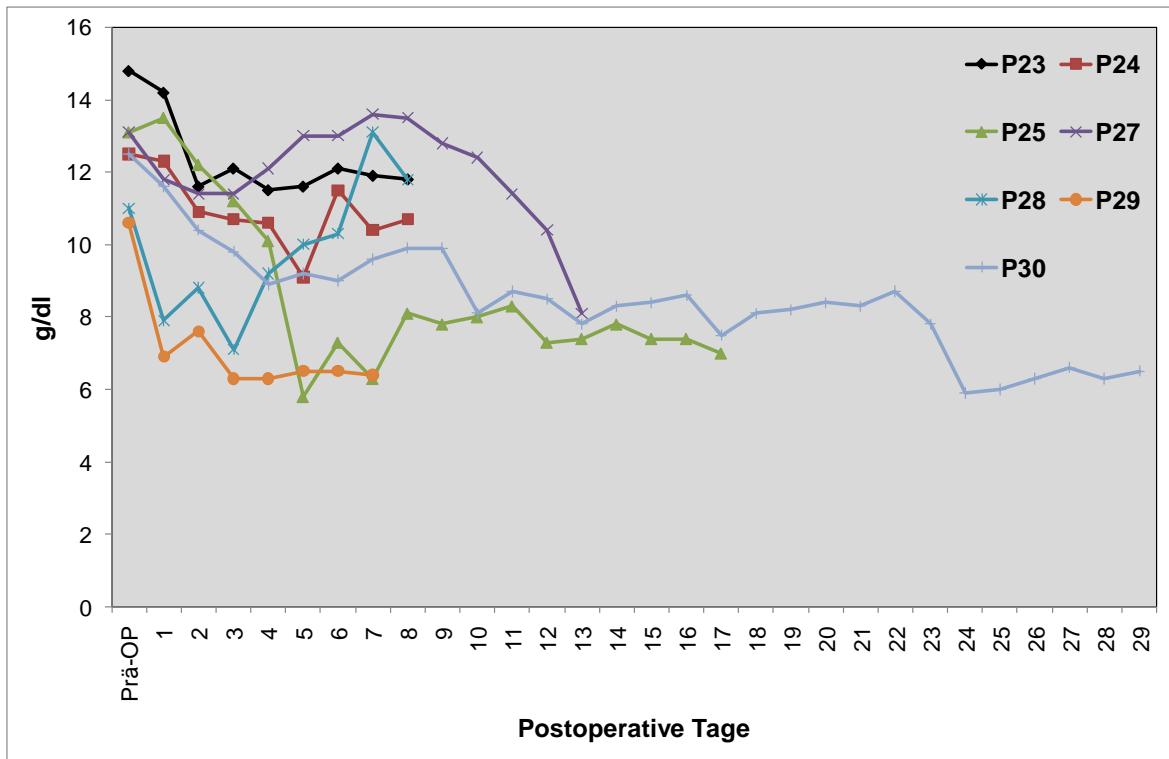


Abbildung 4.8: Hämoglobin-Spiegel (g/dl) im postoperativen Verlauf.

#### 4.4. Pathologischer Befund

##### 4.4.1. Herzgewichte

Bei **Pavian 20, 21, 27 und 28** kam es durch ödematöse Schwellungen, Hämorrhagien und Thrombosierungen im Rahmen einer xenogenen Abstoßung zu einer deutlichen Gewichtszunahme des explantierten Spenderherzens (*Tabelle 4.2*). Dagegen blieb das Gewicht der Spenderorgane bei Pavian 22, 23 und 24 unverändert. Die stärkste Gewichtszunahme zeigte sich bei **Pavian 19**. Aufgrund massiver Ausgussthromben in beiden Vorhöfen und Ventrikeln lag das Gewicht des Transplantats nach Explantation um 150 g höher als vor Implantation.

Gruppe	Pavian	Herzgewicht [g] vor	Herzgewicht nach	Gewichtszunahme [g]
		Implantation	Explantation [g]	
B1	P19	87	237	150
	P20	26,3	110	83,7
B2	P21	112	195	83
	P22	114,5	100	-
B3	P23	83	85	2
	P24	134	145	10
B4	P25	78	125	47
	P29	53	122	69
	P30	46	180	134
B5	P27	68	140	72
	P28	46	130	84

**Tabelle 4.2: Herzgewicht (g) vor Implantation und nach Explantation.**

#### 4.4.2. Transgenität der Spendertiere

Nach Explantation der Spenderherzen wurde die kardiale Expression der Transgene immunhistochemisch nachgewiesen und mittels eines Scores validiert (*Tabelle 4.3*):

0: Keine Expression

1: Schwache Färbeintensität

2: Mäßige bis starke Färbeintensität

3: Starke Färbeintensität.

Die Endothelexpression der hHO-1 wurde mittels PCR nachgewiesen. Für HLA-E steht derzeit noch kein geeigneter Antikörper für einen immunhistochemischen Nachweis zur Verfügung.

	hDAF	TRAIL	Gal-KO	CD46
P19	2	-	-	-
P20	2-3	-	-	-
P21	3	0	-	-
P22	2	0	-	-
P23	-	-	0	3
P24	-	-	0	3
P25	-	-	0	3
P27	-	-	0	3
P28	-	-	0	3
P29	-	-	0	-
P30	-	-	0	-

**Tabelle 4.3: Endothelialer Expressionsnachweis der Transgene hDAF, TRAIL, CD46 und des α(1,3)Gal-Epitopes nach Explantation der Spenderherzen (0 = keine Expression bis 3 = starke Expression).**

#### 4.4.3. Histopathologischer und immunhistochemischer Befund

Makroskopisch zeigten sich im explantierten Spenderherzen bei **Pavian 19** massive Ausgussthromben beider Vorhöfe, wandständige Thromben in beiden Ventrikeln und langstreckige lumenobliterierende Thromben in sämtlichen Koronargefäßen. Mit Ausnahme des rechten Vorhofs lag eine Totalnekrose des Myokards mit Einblutungen und beginnender granulozytärer Abräumreaktion vor. Als Ursache für die starke Thrombenbildung kam neben einer Perfusionsproblematik vor allem eine akut vaskuläre Abstoßungsreaktion in Betracht. Eine genaue Beurteilung war anhand des nekrotischen Gewebes nicht möglich. Bei **Pavian 21** zeigte sich der gleiche histopathologische Befund.

Das Spenderherz bei **Pavian 20** zeigte eine kapilläre Blutstauung (Sludge), ein geringgradig interstitielles Ödem und mehrere kleine venöse Thromben. Die auffällige Granulozytensequestration mit Margination und Leukozytenrollen sprachen für eine Endothelzellschädigung und waren Ausdruck einer hyperakuten Abstoßungsreaktion.

Bei **Pavian 22** lag im Interventrikularseptum des Spenderherzens ein nicht mehr frischer Myokardinfarkt mit Kernverlusten und beginnender granulozytärer Extravasation vor, der bereits präoperativ entstanden sein musste. Es zeigten sich frische, diffus verteilte Nekrosen, die auf eine Reperfusionsschädigung zurückgeführt wurden. Zeichen einer hyperakuten Abstoßung lagen nicht vor.

Bei der Obduktion von **Pavian 23** präsentierte sich ein mit dem Spenderherz verwachsenes Kolon. Das freipräparierte Spenderherz zeigte makroskopisch eine fibrinöse Perikarditis und kleine Thromben in beiden Vorhöfen. Histopathologisch konnte eine sich über allen Herzhöhlen mittelgradige, fibrinös-granulozytäre Epikarditis mit zum Teil angrenzenden epikardialen Fettgewebsnekrosen nachgewiesen werden. Linksventrikulär betont stellten sich multifokale in Außen- und Innenschichten gelegene frische Myokardnekrosen (ca. 15-20% des untersuchten Myokards) dar. Zeichen einer Vaskulitis, vaskuläre Thromben und lymphozytäre Infiltrate konnten nicht nachgewiesen werden. Nebenbefundlich zeigten sich in der Leber geringe perzentrale Schocknekrosen und ein ausgeprägtes intraalveoläres und interstitielles Lungenödem, am ehesten verursacht durch Aspiration von Nahrung. Immunhistochemisch fehlten Zeichen einer vaskulären und zellulären Abstoßung.

Ähnlich zeigte sich der pathologische Befund bei **Pavian 24**. Auch hier wurde das Kolon durch das Transplantat eingeengt. Histopathologisch präsentierte sich über allen Herzhöhlen eine mittelgradige, fibrinös-granulozytäre Epikarditis mit zum Teil angrenzenden epikardialen Fettgewebsnekrosen. Es lagen weder mikroskopisch noch immunhistochemisch Hinweise für eine akute Abstoßungsreaktion vor.

Bei **Pavian 25** fielen makroskopisch eine akute Blutstauung der Lunge und multifokale Nekrosen und Hämorrhagien des Eigenherzens auf. Ein Fokus für das septische Geschehen konnte nicht nachgewiesen werden. Am Transplantatherz demonstrierten sich drei bis vier gut demarkierte, lehmgelbe Infarktareale an der linken Herzhinterwand. Mikroskopisch zeigte sich eine fibrinös-granulozytäre Epikarditis mit zum Teil angrenzenden epikardialen Fettgewebsnekrosen. Die Infarktareale des linken Ventrikels (10-20% des untersuchten Myokards) stellten sich ohne Abräumreaktion dar. Das Septum und die linke Vorderwand wiesen ebenfalls multifokale Nekrosen auf. Im histopathologischen Befund beider Ventrikel zeigten sich typische Zeichen einer akut vaskulären Abstoßungsreaktion:

Myokardnekrosen, intravaskuläre Fibrin thromben der kleinen postkapillären Venolen, ein mäßiggradiges interstitielles Ödem und fokale interstitielle Hämorrhagien (*Abbildung 4.10*). Lymphozytäre Infiltrationen des Myokards und Anzeichen einer Vaskulitis fehlten. Immunhistochemisch konnten keine CD 3+ T-Zellen angefärbt werden (*Abbildung 4.10*). Eine akut zelluläre Abstoßung konnte ausgeschlossen werden.

Das Transplantat bei **Pavian 27** zeigte ausgedehnte frische hämorrhagische Nekrosen des linken Ventrikelmyokards ohne eine granulozytäre Abräumreaktion. Die deutliche Zunahme des Herzgewichtes war bedingt durch ein massives, fibrinreiches, interstitielles Ödem und durch einen großen Thrombus im linken Ventrikel. Auch rechtsventrikulär präsentierten sich frische Myokardnekrosen und venöse und venuläre Fibrin- und Plättchen thromben (*Abbildung 4.11*). In der CD 3+ Färbung zeigte sich eine deutliche myokardiale Infiltration von T-Lymphozyten mit perivaskulärer Akzentuierung (*Abbildung 4.11*). In der IgM-Färbung konnte nur eine minimale Reaktion an den Gefäßendothelien nachgewiesen werden. In der C4d-Färbung stellte sich keine Reaktion dar. Intravaskulär bestand kaum Positivität für Fibrin (*Abbildung 4.11*). Das immunhistochemische Bild bestätigte das Vorliegen einer akut zellulären Abstoßungsreaktion.

Bei **Pavian 28** zeigte sich der Situs mit wenig serösem Aszites. Das Transplantat war im Bereich der Anastomosenfläche sichelförmig mit einer Dünndarmschlinge verklebt, wodurch diese U-förmig abgeknickt wurde (*Abbildung 4.9*). Das Spenderherz war prall gespannt und dunkelrot verfärbt. Beide Vorhöfe und der linke Ventrikel waren mit einem wandadhärenten Thrombus ausgefüllt und durch diesen dilatiert (*Abbildung 4.9*). Der rechte Ventrikel stellte sich durch das stark vorgewölbte Kammerwandseptum spaltförmig komprimiert dar. Die Koronargefäße waren frei. Nebenbefundlich konnten minimale Pleuraergüsse und ein leichter Perikarderguss nachgewiesen werden. Mikroskopisch zeigten sich eine ausgedehnte, insbesondere das linke Herz betreffende, frische Nekrose ohne nennenswerte granulozytäre Abräumreaktion, intravaskuläre Fibrin thromben der kleinen postkapillären Venolen und fokale Hämorrhagien (*Abbildung 4.10*). Immunhistochemisch konnte keine wesentliche zelluläre Entzündungsreaktion in der CD 3+ Färbung nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich an den Gefäßendothelien kleiner und mittelgroßer Gefäße eine kräftig positive Reaktion in

der IgM- und C4d-Färbung. Infolgedessen konnte das Bild einer schweren vaskulären Abstoßung diagnostiziert werden. Es bestand kein Anhalt für eine zelluläre Abstoßungsreaktion. Als Todesursache war eine ischämische Enterokolopathie mit multifokalen, teils konfluierenden Schleimhautnekrosen anzunehmen, zu der auch das klinische Bild von Absetzen blutigen Stuhls passte. Es gab keine Hinweise für eine Gerinnungsstörung oder ein Schockgeschehen.

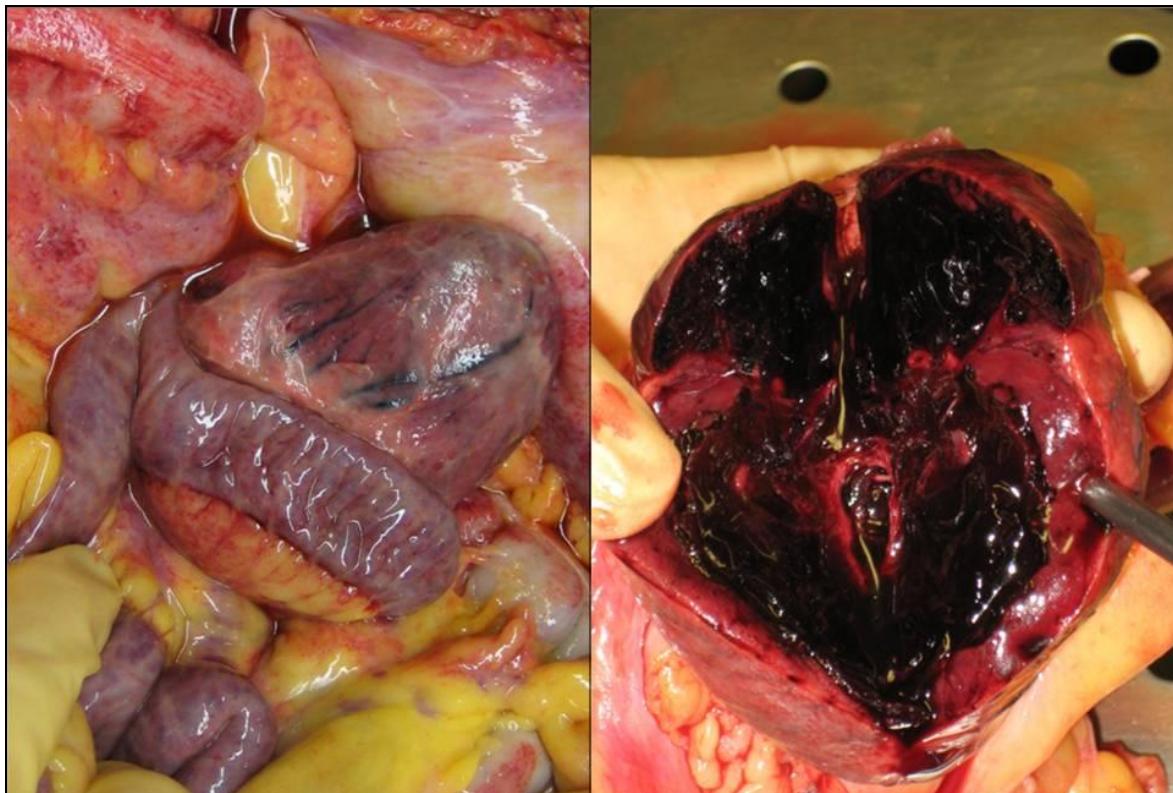
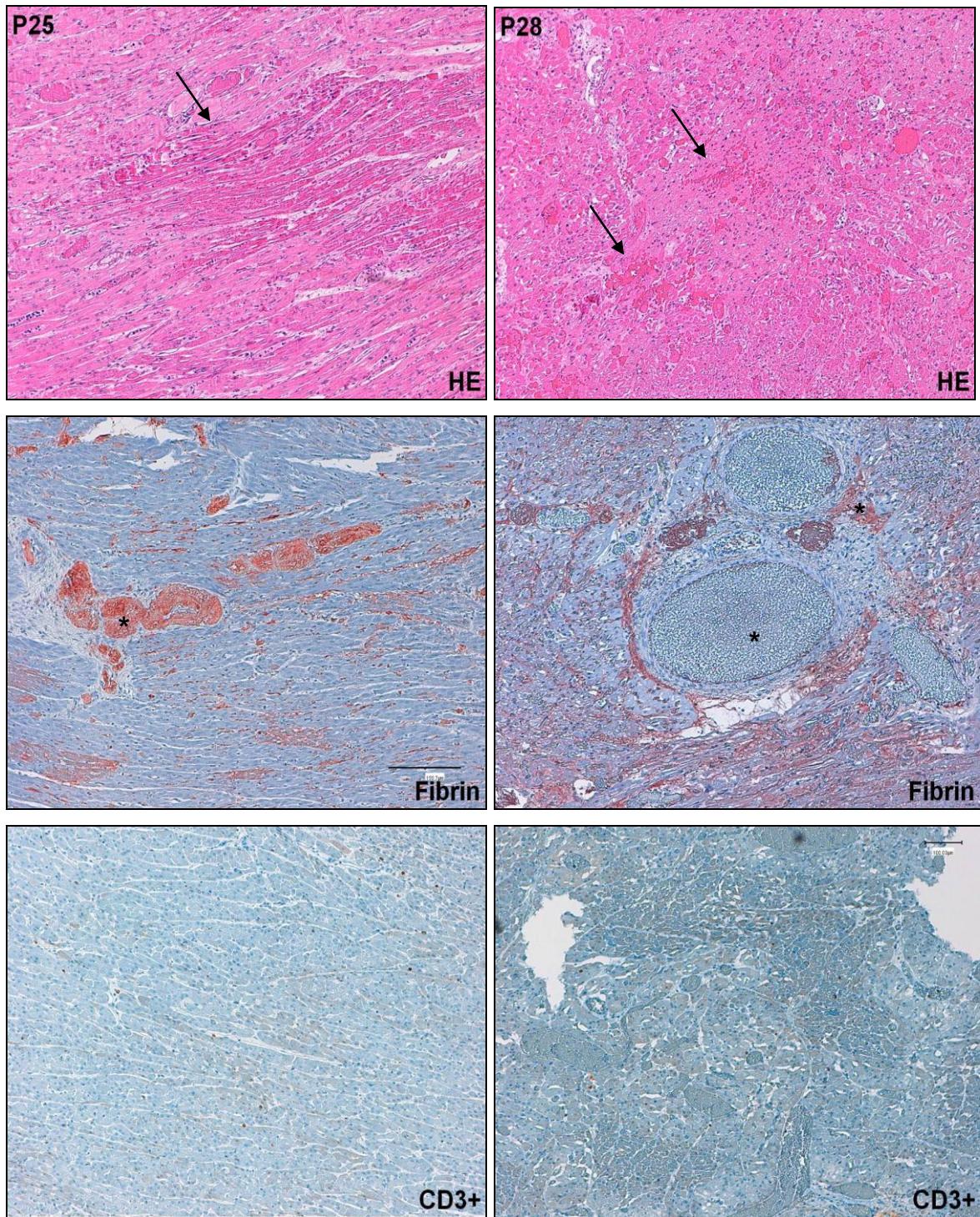


Abbildung 4.9: Makroskopischer Befund des Spenderherzens bei Pavian 28 nach akut vaskulärer Abstoßung: Mit dem Transplantat verwachsene Dünndarmschlinge (links) und mit Thromben ausgefüllter linker Vorhof und linker Ventrikel (rechts).

Bei **Pavian 29** zeigten sich der linke Vorhof und Ventrikel des Transplantatherzens subtotal ausgefüllt durch einen wandadhärenten Parietalthrombus. Der rechte Vorhof und die Koronarien stellten sich ebenfalls thombusgefüllt dar. Im linken Ventrikel zeigte sich ein beginnender frischer Myokardinfarkt, betont im Bereich der Papillarmuskeln. Ein mäßiggradiges, fleckförmiges, interstitielles Ödem in allen Teilen des Herzens und subendokardial betonte Nekrotisierungen ließen auf eine ischämische Schädigung des Transplantates schließen. Der fehlende C4d-Nachweis an den Endothelien und eine nur mäßige immunhistochemische IgM-

Reaktion bestätigten eine ischämische Genese. Eine akut zelluläre Abstoßungsreaktion konnte ausgeschlossen werden.

Das Transplantatherz bei **Pavian 30** zeigte sich makroskopisch deutlich vergrößert und hämorrhagisch, zum Teil multifokal lehmgelb verfärbt. Das linke Herz war von einem wandadhärenten Parietalthrombus subtotal ausgefüllt. Im rechten Herzen befand sich dagegen nur wenig Thrombusmaterial. Die Koronarien waren von nicht-wandadhärenten Thromben gefüllt. Mikroskopisch zeigten sich im Ventrikelmyokard subendokardial betonte, frische Infarkte ohne granulozytäre Abräumreaktion. Eine lymphozytäre Gewebsinfiltration fehlte. Die immunhistochemische C4d-Reaktion an den Endothelien fiel negativ aus. Eine wesentliche IgM-Reaktion zeigte sich nicht. Da eine akut vaskuläre und zelluläre Abstoßungsreaktion ausgeschlossen werden konnte, wurde eine ischämische Genese mit subendokardial akzentuierten Myokardnekrosen für die Gewebeschädigung verantwortlich gemacht.



**Abbildung 4.10: Akut vaskuläre Abstoßung.** Histopathologischer (HE = Hämatoxylin-Eosin-Färbung; 10fach vergrößert) und immunhistochemischer (Fibrin und CD 3+ T-Lymphozyten, 10fach vergrößert) Befund des Transplantates bei Pavian 25 (linke Spalte) und Pavian 28 (rechte Spalte). Myokardnekrosen (HE-Färbung, Pfeil), intravaskuläre Fibrinthromben (Fibrin-Färbung,\*). Keine Infiltration von T-Lymphozyten in der CD3+ Färbung.

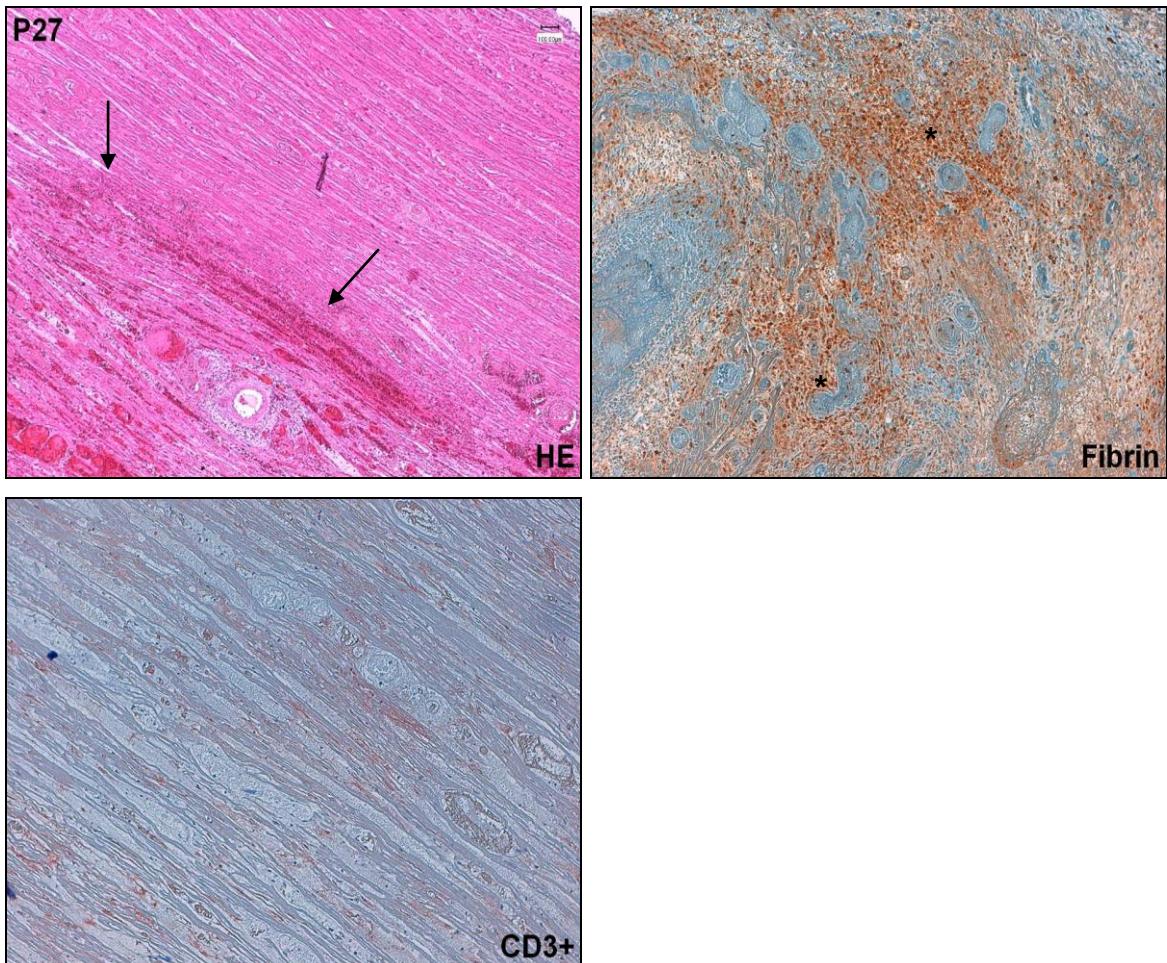


Abbildung 4.11: Akut zelluläre Abstoßung. Histopathologischer (HE = Hämatoxylin-Eosin-Färbung; 10fach vergrößert) und immunhistochemischer (Fibrin und CD 3+ T-Lymphozyten, 10fach vergrößert) Befund des Transplantates bei Pavian 27. Myokardnekrosen, perivaskulär akzentuierte Zellinfiltrationen und thrombotisches Material in den kleinen Gefäßen (HE-Färbung, Pfeil; Fibrin-Färbung, \*). Deutlich interstitielle, perivaskulär akzentuierte Infiltration von T-Lymphozyten in der CD 3+ Färbung.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Die Überwindung der hyperakuten xenogenen Abstoßung und die Bedeutung von hDAF in der Gal-knockout-Ära**

Die HAR innerhalb von Minuten bis Stunden nach Transplantation galt lange Zeit in der experimentellen Xenotransplantation als größte immunologische Barriere. Das zunehmende Verständnis von immunologischen Mechanismen um die Rolle präformierter xenogener Antikörper und die Fähigkeit, Schweine gentechnologisch verändern zu können, erzielten einen erheblichen Fortschritt auf dem Weg diese Barriere erfolgreich überwinden zu können. Durch eine gezielte genetische Modifikation konnte die Expression humaner Regulatoren der Komplementaktivität in transgenen Schweinen verfügbar gemacht werden. Ziel ist, die Aktivierung der Komplementkaskade, als Schlüsselereignis bei Abstoßungsreaktionen, in einer frühen Phase zu blockieren. Durch DNA-Mikroinjektionstechnik wurden erstmalig von der Arbeitsgruppe um Cozzi et al. eine Reihe hDAF-transgener Schweine für den Einsatz in der experimentellen Xenotransplantation produziert (Cozzi 1995). In der Vergangenheit konnten viele Arbeitsgruppen eine sichere und zuverlässige Verhinderung der HAR durch den Einsatz hDAF-transgener Schweineherzen im heterotopen Schwein-Pavian-Modell beweisen. Bhatti et al. konnte eine mittlere Überlebenszeit von 26 Tagen und eine maximale Überlebenszeit von 99 Tagen ohne einen Fall einer HAR verzeichnen (Bhatti 1999). Kuwaki et al. erzielte ebenfalls im heterotopen Transplantationsmodell eine mittlere und eine maximale Überlebenszeit von 27 und 139 Tagen (Kuwaki 2004). Kein Spenderherz wurde hyperakut abgestoßen.

Auch in unserer Versuchsreihe wurden vier hDAF-transgene Spenderherzen übertragen. Von diesen wurde eines zum Zeitpunkt der Reperfusion noch vor Beendigung des operativen Eingriffs in Pavian 20 hyperakut abgestoßen. Schuurman et al. erfasste eine Inzidenz des Auftretens einer HAR nach Übertragung hDAF-transgener Schweineherzen in Paviane von insgesamt 6-11% (Schuurman 2002). Dies lässt vermuten, dass die hDAF-Transgenität keinen alleinigen Schutz vor einer HAR bietet und demonstriert das bedeutende

pathogene Potential präformierter Anti-non- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper eine HAR induzieren zu können. Zudem zeigte sich bei Pavian 20 im Vergleich zu den anderen Empfängertieren ein erhöhter Ausgangstiter natürlicher, präformierter Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-IgM-Antikörper. Supportiv applizierten wir täglich das  $\alpha$ -Galactosyl-Polyethylen-Glykol-Konjugat TPC um präformierte Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper zu reduzieren und einer weiteren Induktion entgegenzuwirken. Mit Ausnahme von Pavian 20 konnte in den anderen Tieren mit einer maximalen Überlebenszeit von 14 (Pavian 19) und 17 Tagen (Pavian 21) eine HAR nicht nur histopathologisch, sondern alleine aufgrund der deutlich über dem Abstoßungszeitraum von 24 Stunden liegenden Überlebenszeiten eindeutig ausgeschlossen und die Effektivität von hDAF in Kombination mit TPC belegt werden. Schon in vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte im orthotopen Modell mit dem Einsatz hDAF-transgener Schweineherzen eine HAR erfolgreich verhindert und eine durchschnittliche Überlebenszeit von  $14,6 \pm 2,6$  Tagen erreicht werden (Brenner 2005a). Konsolidierend konnte in der historischen, vorangegangenen orthotopen Versuchsreihe eine HAR durch den Einsatz von hDAF in Kombination mit dem synthetisch hergestellten, löslichen  $\alpha$ -Gal-Konjugat GAS914 erfolgreich inhibiert werden (Brandl 2005).

Alternativ zu hDAF verwendete die Arbeitsgruppe um McGregor Schweineherzen im heterotopen Modell, die transgen für den humanen Komplementregulator hCD46 waren. In zwei Versuchsreihen konnte eine HAR ebenso effektiv verhindert werden wie durch den Einsatz von hDAF in zuvor gezeigten Versuchen anderer Arbeitsgruppen. Auf diese Weise konnten mittlere und maximale Überlebenszeiten von 96 und 137 Tagen erzielt werden (McGregor 2004, McGregor 2005).

Die neue Technik des Kerntransfers für die Erstellung transgener Tiere ermöglichte gegenüber der bis dahin etablierten Methode der DNA-Mikroinjektion die gezielte genetische Modifikation von Zellen und damit den Knockout (KO) von Genen. Durch den Einsatz von Gal-KO-Schweineherzen wurden zuvor eingesetzte Strategien zur Überwindung der HAR verdrängt und somit die Menge an täglichen Applikationen sowie möglichen Nebenwirkungen verabreichter Substanzen zur Depletion präformierter Antikörper reduziert.

In unserer Versuchsreihe verwendeten wir Gal-KO-Spenderherzen ohne (B3) und in Kombination mit weiteren Transgenen (B4 und B5). In allen Fällen konnte eine

HAR erfolgreich verhindert und ein Mindesttransplantatüberleben von 7 Tagen erreicht werden. In der Gruppe B4 (Gal-KO/CD46) konnten die längsten Überlebenszeiten mit 17 und 29 Tagen verzeichnet werden. Bei Pavian 25 wiesen beide Ventrikel ausgedehnte Myokardnekrosen, intravaskuläre Fibrin thromben und interstitielle Ödeme und Hämorrhagien als Zeichen einer AVXR auf. Bei Pavian 30 wies das Transplantat histologisch keinerlei Zeichen einer xenogenen Abstoßungsreaktion auf. In der Gruppe B3 (Gal-KO) mussten beide Versuche am 8. Tag aufgrund eines Ileus terminiert werden. Histologisch konnten auch hier keinerlei Anzeichen eines Abstoßungsgeschehens nachgewiesen werden. Tseng et al. konnten im heterotopen Modell unter Verwendung einfacher Gal-KO-Schweineherzen eine mittlere und maximale Überlebenszeit von 63 und 179 Tagen ohne einen Fall einer HAR erzielen (Tseng 2005). Wie in unserer Versuchsreihe blieb ein Anstieg von Anti- $\alpha$ (1,3)Gal-IgM und -IgG-Antikörpern im postoperativen Verlauf aus. McGregor verglich in einer Versuchsreihe von insgesamt 11 heterotopen Herztransplantationen die Effektivität von Gal-KO gegenüber der Kombination aus Gal-KO/hDAF (McGregor 2012). Ein Transplantat in der Gal-KO Gruppe wurde hyperakut abgestoßen. Dies illustriert erneut das bedeutungsvolle Potenzial präformierter und induzierter Anti-non- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper frühe Transplantatschäden und sogar eine HAR verursachen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass eine endotheliale Ablagerung von C5b im histologischen Präparat durch die Kombination Gal-KO/hDAF wesentlich verringert und die Aktivierung der Komplementkaskade effizient begrenzt wird. Ein Überlebensvorteil zwischen beiden Gruppen zeigte sich jedoch nicht. Azimzadeh et al. vermerkte in der Kombination Gal-KO/CD46 eine Reduktion früher Transplantatabstoßungen innerhalb der ersten drei Tage auf 7% im Vergleich zu 43% bei Gal-KO-Organen ohne einen weiteren Komplementregulator (Gock 2011). Der Nachweis von Komplementablagerungen am Endothel von Gal-KO Spenderherzen macht somit die zusätzliche Expression eines humanen Komplementregulators nicht nur zur Überwindung der HAR, sondern auch zur Verzögerung einer akut humoralen Abstoßung erforderlich.

## **5.2. Die Bekämpfung der nicht- $\alpha$ Gal-spezifischen Immunantwort zur Überwindung der akut vaskulären Abstoßungsreaktion**

### **5.2.1. Die Bedeutung von B-Zell-Depletion und Antikörperelimination**

Da die Spezifität der für die AVXR bedeutungsvollen induzierten Anti-non- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper bislang nicht eindeutig identifiziert werden konnte, muss sich die Therapie zur Bekämpfung dieses komplexen Abstoßungsgeschehens vornehmlich auf die Suppression und Inaktivierung antikörperproduzierender B-Zellen richten.

Der monoklonale Anti-HLA-DR-Antikörper 1D09C3 wurde erstmalig von unserer Arbeitsgruppe zur gezielten Einleitung eines programmierten Zelltodes aktiverter B-Zellen zur Vermeidung einer Nachbildung zytotoxischer induzierter Antikörper im Kombination mit hDAF-transgenen Spenderherzen eingesetzt. Dem Einsatz gingen spezies-spezifische Untersuchungen voraus, die eine Kreuzreaktivität des humanen Antikörpers mit Pavian-B-Zellen bestätigten konnte. Trotz eines maximalen Überlebens von 14 (Pavian 19) und 17 Tagen (Pavian 21) konnte bei beiden Tieren im postoperativen Verlauf die Spiegel der Anti-Schwein-Antikörper nicht suffizient supprimiert werden und stiegen ab dem 5. postoperativen Tag sogar weiter an. Zudem muss der Antikörper bei individuell vorbestehenden hohen Ausgangstitern präformierter Anti-Schwein-Antikörper wohl ineffektiv hinsichtlich der Vermeidung einer AVXR innerhalb der ersten Tage nach Transplantation sein. Bessere Erfolge konnte die Arbeitsgruppe um Cooper et al. durch die Verwendung des Anti-CD154-Antikörpers im heterotopen Transplantationsmodell unter Verwendung von sowohl hDAF- als auch Gal-KO-Schweinen erzielen (Kuwaki 2004, Kuwaki 2005, Tseng 2005, Shimizu 2008). Durch die suffiziente Unterbindung der B-Zell-Differenzierung durch eine Co-Stimulationsblockade zwischen T- und B-Zellen konnte die AVXR zwar nicht vollständig verhindert, aber dennoch deutlich hinausgezögert werden. Aufgrund von beobachteten Thromboembolien als Nebenwirkung dieser Antikörpertherapie wurde zusätzlich Aspirin, humanes Antithrombin und Heparin zur Antikoagulation verabreicht. So muss der Einsatz des Antikörpers, v.a. im orthotopen Transplantationsmodell, hinsichtlich möglicher Blutungskomplikationen vorher genauestens überdacht

werden. Die Wirkung des Anti-CD154-Antikörpers bewährte sich auch erfolgreich nach porcinen Inselzelltransplantationen im Primatenmodell (Cardona 2007).

Anstelle des Anti-HLA-DR-Antikörpers wurde in unseren darauffolgenden Versuchen, gemäß dem Immunsuppressionsschema von McGregor et al. (McGregor 2005), der monoklonale Anti-CD20-Antikörper Rituximab 14 Tage vor Transplantation als Induktionstherapie und im weiteren postoperativen Verlauf alle 7 Tage zur B-Zell-Depletion eingesetzt. Dennoch trat ein Fall von moderater AVXR in Pavian 28 nach 8 Tagen auf. Eine suffiziente Reduktion der Anti-Schwein-Antikörper konnte nicht beobachtet werden, ganz im Gegenteil kam es zu weiteren Antikörperanstiegen (*Abbildung 4.2*). Myokardnekrosen, intravaskuläre Fibrinthromben sowie interstitielle Ödembildung und Hämorrhagien als Zeichen einer AVXR konnten geringfügig auch im Transplantat von Pavian 25 und 29 unter der Therapie mit Rituximab nachgewiesen werden. Rituximab kann zwar zirkulierende B-Zellen zuverlässig eliminieren (Gonzalez-Stawinski 2001), zeigt aber keinen Effekt auf aktivierte B-Zellen/Plasmazellen oder ruhende B-Zellen in Lymphknoten (Alwayn 2001, McGregor 2005). Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen konnte kein Überlebensvorteil der Transplantate beobachtet werden. Eine alleinige Induktionstherapie mit Rituximab muss demnach als unzureichend hinsichtlich eines längeren Transplantatüberlebens gewertet werden. Dem gegenüber erreichten Mohiuddin et al. ein Transplantatüberleben von 236 Tagen in der Kombination Gal-KO/CD46, anti-CD154-Antikörper und Rituximab-Induktionstherapie und beurteilten letztere als ausschlaggebend für den erzielten Erfolg (Mohiuddin 2012).

Bei Pavian 29 und 30 wurde bei einem messbaren Anstieg der Anti-Schwein-Antikörpertiter im postoperativen Verlauf unterstützend eine unspezifische extrakorporale Immunadsorption (EIA) durchgeführt. Bislang wurde die EIA vornehmlich präoperativ zur Abwendung einer HAR sowohl im orthotopen als auch im heterotopen Modell erfolgreich angewendet (Brenner 2000a, Brenner 2000b, Brenner 2005b). Erhöhte Antikörpertiter und die Komplementaktivität konnten durch den postoperativen Einsatz reduziert und eine bevorstehende Abstoßung verhindert werden. Dieser Effekt hielt jedoch nur kurzzeitig bis zu einem sich anschließenden Antikörperrebound an. Nebenwirkungen wie Anämien und Thrombozytopenien können die Anwendungsfrequenz der EIA limitieren. Auch der

nicht außer Acht zulassende technische Aufwand, verbunden mit hohen Kosten, machen die EIA nicht zum optimalen Therapieverfahren, aber als Notfalltherapie unverzichtbar.

In der historischen orthotopen Versuchsreihe konnte mit der Applikation von Cyclophosphamid eine AVXR bis auf 25 Tage verzögert werden. Die bei anderen Arbeitsgruppen (Brenner 2005a, Schmoekel 1998) aufgetretenen limitierenden, knochenmarkstoxischen Nebenwirkungen zeigten sich unter Halbierung der üblichen Dosis auf 20 mg/kg nicht so ausgeprägt. Der vielversprechende Effekt von Cyclophosphamid auf die Inhibition der B-Zell-Synthese und -Differenzierung und auf eine signifikant verlängerte Transplantatfunktion ist lange bewiesen (Bhatti 1999, Brandl 2005, Brenner 2005a, Cozzi 2000; Morschheuser 1997). In unserer Versuchsreihe erhielt Pavian 30, mit dem längsten Transplantatüberleben von 29 Tagen, einen einmaligen Bolus von 5 mg/kg Cyclophosphamid am 16. postoperativen Tag. Spekulativ bleibt letztlich die Wirkung auf das erzielte Transplantatüberleben. Die weitere Gabe wurde aufgrund des reduzierten Allgemeinzustandes des Tieres nicht fortgesetzt.

#### 5.2.2. Die Bedeutung des löslichen Fc-Rezeptors FcγRIIb als Bestandteil des immunologischen Protokolls

Ein vielversprechender Ansatz zur Unterdrückung einer nicht- $\alpha$ Gal(1,3)Gal-spezifischen Immunantwort stellt die Verwendung des löslichen Fc-Rezeptors FcγRIIb dar. Durch die Bindung an Anti-Schwein-IgG-Antikörpern soll eine B- und T-Zell-Aktivierung supprimiert und eine akut vaskuläre und zelluläre Abstoßungsreaktion verhindert werden. FcγRIIb wurde weltweit im Schwein-Primaten-Modell erstmalig in unserer Versuchsreihe eingesetzt und auf seine Effektivität getestet (Pavian 23 bis 30). Als biologische Substanz soll es die überreagierende Immunreaktion beruhigen und gezielt die andauernde Antikörperproduktion beseitigen. Eine messbare signifikante Reduktion der Anti-Schwein-Antikörperspiegel ließ sich in unseren Versuchen nicht zeigen. Leider kann durch den verwendeten Anti-Schwein-Antikörper-ELISA nur die Gesamtmenge an Immunglobulinen und nicht der Anteil an IgG, bzw. der Anteil an mit FcγRIIb gebundenem, ineffektivem IgG selektiv bestimmt werden. Somit bleiben die Effektivität der verabreichten Dosierung und die genaue Wirkung des

Fc<sub>Y</sub>RIIb unklar. Jacob et al. beschreiben im Mausmodell eine messbare Antikörperreduktion erst nach zwei Wochen (Magnusson 2008). Verantwortlich scheint zunächst das notwendige Erreichen eines bestimmten Fc<sub>Y</sub>RIIb-Spiegels im peripheren Blut zu sein, bevor es zu einem sichtbaren Effekt kommt. Die TNF- $\alpha$ -Produktion sowie die Menge an IL-6 mRNA konnte signifikant reduziert werden. Mit Ausnahme steigender IL-6-Spiegel bei Pavian 23 und 24, bei denen ein akuter Ileus auftrat, und bei Pavian 27, bei dem das Transplantat einer ACXR erlag, zeigten sich in unseren Versuchen kongruente Befunde. Jedoch konnte auch durch die Gabe des Fc<sub>Y</sub>RIIb-Rezeptors ein akutes Abstoßungsgeschehen nicht verhindert werden.

### 5.2.3. Weitere Immunmodulatoren

Die endotheliale Expression der humanen Hämoxxygenase-1 (hHO-1) stellt einen weiteren Ansatz für den Schutz des xenogenen Transplantates vor einer Abstoßungsreaktion dar. Es konnte gezeigt werden, dass sich dadurch das Transplantatüberleben signifikant verlängert (Soares 1998). Die hHO-1 schützt das Transplantat durch seine antiinflammatorische, antiapoptotische, antioxidatorische und antiproliferative Wirkung effektiv vor Ischämie- und Reperfusionsschäden, einer Abstoßungsreaktion und vor einer Transplantatvaskulopathie. Eine wichtige Komponente scheint hierbei die induzierte, um 60% gesteigerte endotheliale hDAF-Expression zu spielen (Kinderlerer 2009). Das Transplantatüberleben konnte in unserer Versuchsreihe durch den Einsatz von Gal-KO/hHO-1 transgenen Schweineherzen nicht signifikant verlängert werden.

Protektive Gene, wie A1 und A20, wurde eine antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkung zugesprochen (Oropeza 2009, Stroka 1999). A1 ist ein antiapoptotisches bcl-Gen, das als Antwort auf einen inflammatorischen Stimuli zum Schutz der Zelle exprimiert wird. Es inhibiert die Endothelzellaktivierung und die damit assoziierte Expression proinflammatorischer Proteine durch die Hemmung von NF $\kappa$ B. Das Gen A20 hemmt die TNF- $\alpha$ -vermittelte Apoptose. Die kombinierte endotheliale Expression beider Gene führt zu einem wirkungsvollen Effekt (Kunter 2005).

CTLA-4 (CD152, LEA29Y) blockiert das co-stimulatorische Signal zwischen endothelialen sowie antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen und verhindert so nachhaltig deren Aktivierung und die damit verbundene T-Zell-abhängige Antikörperproduktion (Matthews 2003).

Bortezomib ist ein Proteasominhibitor, der über einen Abbau intrazellulärer Proteine und Aminosäuren zur Apoptose von B- und Plasmazellen führt und so effizient zu einer Antikörperreduktion beitragen kann (Harousseau 2006).

### **5.3. Die Identifikation der nicht- $\alpha$ Gal(1,3)Gal-spezifischen Antikörper**

Bislang konnte eine Spezifität der nicht- $\alpha$ Gal(1,3)Gal-spezifischen Antikörper vor allem gegen Kohlenhydratverbindungen mit einem terminal gebundenen N-Glykolyneuraminsäure-Rest (Neu5Gc, Hanganutziu-Deicher-Antigen) identifiziert werden, die auf menschlichen Zellen nicht exprimiert wird (Zhu 2002, Miyagawa 2010). Diese machen insgesamt 7-13% der präformierten nicht- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper im Menschen aus – jedoch bleibt der Effekt auf die xenogene Abstoßung unklar, da auch eine Expression in nicht-humanen Primaten fehlt (Byrne 2008).

Diswall et al. registrierten eine induzierte Antikörperreaktion gegen ein bislang nicht definiertes Glykolipid in dem Gewebe von Gal-KO-Schweinen (Diswall 2010). Byrne et al. identifizierten eine limitierte, aber ausgesprochen heterogene Anzahl an anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antigenen zugehörig der Hitze-Schock-Protein- und Annexin-Familie sowie porcinen Komplementfaktoren und thromboregulatorischen Proteinen (Byrne 2012), durch deren Blockade intravaskuläre Thrombosierungen und Entzündungsreaktionen gefördert werden. Darunter eine porcine Glykosyltransferase homolog der humanen  $\beta$ 1-4-N-acetylgalaktosaminyl-Transferase 2 (B4GALNT2), die durch Bindung von Lektin und Antikörpern die Produktion von CAD-Glycan induziert. Hier scheint eine Konformität zu der von Diswall beobachteten Glykolipid-Antwort zu bestehen.

Eine genaue Identifikation der anti- $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper konnte bislang nicht erreicht werden. Einigkeit besteht in der Annahme, dass diese primär gegen Oberflächenproteine auf Endothelzellen gerichtet sind. Gefordert sind die

Weiterentwicklung technischer Strategien und fortschreitende Untersuchungen zur Identifikation dieser Antigene, um eine AXR gezielt verhindern zu können.

#### **5.4. Tacrolimus, Sirolimus, Methylprednisolon und ATG als immunsuppressive Basis gegen die akut zelluläre xenogene Abstoßung**

Grundlage aller Behandlungsprotokolle ist eine adäquate und suffiziente Basis-Immunsuppression, die für den Gesamtorganismus gut verträglich ist.

McGregor konnte in einer Reihe heterotoper Transplantationen hCD46-transgener Schweineherzen in mit Tacrolimus, Sirolimus, Methylprednisolon und ATG-Induktionstherapie supprimierte Paviane ein deutlich verlängertes Transplantatüberleben erzielen (McGregor 2004, McGregor 2005). Diese Kombination gilt in der Allotransplantation als sicherste und zuverlässigste Therapievariante (Halloran 2004), deren Effektivität sowohl in der vorangegangenen orthotopen Serie als auch in unserer Versuchsreihe durch ein Fehlen lymphozytärer Infiltrationen des Transplantates bestätigt werden konnte. Einzige Ausnahme stellte Pavian 27 dar, bei dem sich nach 13 Tagen eine ACXR manifestierte. Beweisend war die histologisch nachweisbare granulozytäre Abräumreaktion und die in der CD3+ Färbung perivaskulär akzentuierte lymphozytäre Infiltration.

Zuvor angewendete Immunsuppressiva-Konstellationen aus Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil (MMF) zeigten sich zwar effektiv in der Vermeidung akut zellulärer Abstoßungsvorgänge, führten aber zu starken, nicht-tragbaren gastrointestinalen, nephrogenen und knochenmarkstoxischen Nebenwirkungen (Cozzi 2003). Zudem inhibiert Tacrolimus Calcineurin stärker als Cyclosporin und auch Sirolimus zeigt gegenüber MMF klare Vorteile beider zellulären Abstoßungsreaktionen (Halloran 2004).

Unklar bleibt die Wirksamkeit der ATG-Rescue-Therapie zur Unterdrückung und Prävention bevorstehender, akuter Abstoßungsereignisse. In unserer Versuchsreihe konnten sich androhende akute Abstoßungsreaktionen bei steigenden Anti-Schwein-Antikörpertitern durch eine fünftägige ATG-Therapie

nicht abgewendet werden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen verursachte die *Rescue*-Therapie bei McGregor et al. zudem Ereignisse akuter Infektionen (McGregor 2004). Auch in unserer Versuchsreihe zeigte sich ein Fall unklarer Sepsis bei Pavian 25. Ob das ATG-Präparat hierfür ursächlich ist, bleibt spekulativ. In der darauffolgenden heterotopen Versuchsreihe setzte McGregor das ATG-Präparat einzig zur Induktionstherapie ein und konnte eine signifikante Reduktion infektiöser Komplikationen verzeichnen. Eine suffiziente Lymphozytendepletion konnte unter diesen Bedingungen aber dennoch nicht erreicht werden (McGregor 2005). Dagegen konnten Kuwaki et al. nach ATG-Induktionstherapie und Thymusbestrahlung eine signifikante Reduktion von CD 3+ Zellen vermerken (Kuwaki 2004). Bei noch nicht vollständig entschlüsselten xenogenen Abstoßungsmechanismen und potentiellen Antigenen stellt derzeit die immunsuppressive Therapie die entscheidende Determinante zur Verhinderung akuter Abstoßungsereignisse dar (Tazelaar 2011).

Neben medikamentösen Strategien spielt auch bei der Abwendung der ACXR die genetische Modifikation des Spenderherzens eine bedeutende Rolle. So kamen in unserer Versuchsreihe zunächst doppelt-transgene Schweineherzen für hDAF/HLA-E (Pavian 19 und 20) zur Inhibition einer xenogenen NK-Zell-Zytotoxizität zum Einsatz. Das Vorhandensein eigener MHC-Klasse-I-Moleküle soll die Zielzelle vor dem NK-Zell-Angriff schützen (Lilienfeld 2007). Eine Aussage bezüglich der Effektivität konnte aufgrund der limitierten Überlebenszeiten nicht getroffen werden. Crew et al. zeigten, dass HLA-E keinen alleinigen Schutz vor einer NK-Zell-gesteuerten xenogenen Reaktion bietet und ungefähr 20% der NK-Zellen sogar unbetroffen bleiben (Crew 2007). Im Anschluss verwendeten wir trippel-transgene hDAF/HLA-E/TRAIL-Schweineherzen (Pavian 21 und 22). Leider zeigt sich nach Explantation in der immunhistochemischen Untersuchung keinerlei kardiale Expression für TRAIL, trotz guter Expression in Milz, Leber und Nieren. Die Produktion von TRAIL-transgenen Schweinen für weitere Versuche wurde aufgrund der nicht zuverlässigen endothelialen Expression eingestellt.

## **5.5. Thrombotische Mikroangiopathie**

Nachdem eine HAR im diskordanten Transplantationsmodell erfolgreich überwunden werden konnte, traten andere zu lösende Problematiken auf. Neben der akuten Abstoßung, als nächsten Schritt im xenogenen Abstoßungssystem, konnten trotz vielfacher Variationen möglicher immunsuppressiver Strategien eine Aktivierung des Gerinnungssystems und intravaskuläre Thrombosierungen mit folgender Gewebeischämie im Transplantat beobachtet werden (Cooper 2007). Verantwortlich sind neben der antikörpervermittelten Endothelzellaktivierung und Aktivierung der Gerinnungskaskade auch erkannte spezies-spezifische Inkompatibilitäten im Gerinnungssystem (siehe Kapitel 1.4.2.). Das resultierende hyperkoagulative Milieu bringt fatale Auswirkungen auf die Transplantatfunktion mit sich.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen zeigten sich auch in unserer Versuchsreihe nahezu ausnahmslos in allen Transplantaten histopathologische Zeichen einer disseminiert intravasalen Gerinnung (DIC) mit intravaskulären Fibrin thromben und ischämischen und nekrotischen Myokardarealen.

Ein Lösungsansatz besteht zum einen in der Möglichkeit systemisch antikoagulative Substanzen zu verabreichen oder in der Produktion von Spenderschweinen transgen für antikoagulativ wirkende Modulatoren.

### **5.5.1. Systemische Antikoagulanzen**

Der Einsatz diverser antikoagulatorischer Substanzen führte in der Vergangenheit zu divergenten Ergebnissen. Kuwaki et al. kamen zu dem Schluss, dass eine Hochdosis-Heparintherapie zu einer Verlängerung der Transplantatfunktion von hDAF-transgenen-Schweinen im heterotopen Transplantationsmodell führt (Kuwaki 2004). Diese war jedoch eher von quantitativem als qualitativem Charakter. Die Ausbildung von intravasalen Fibrin- und Plättchen thromben sowie von ischämischen und fibrotischen Gewebefekten konnte durch den Einsatz von Heparin nicht ausreichend verhindert werden.

Tseng et al. verwendeten nach heterotoper Übertragung von Gal-KO-Schweineherzen ein Immunsuppressionsschema, dass zusätzlich die Gabe von

Heparin (Ziel-PTT >150 Sek.), Aspirin und die tägliche Applikation von Antithrombin III beinhaltete (Tseng 2005). Insgesamt kam es in einem von acht Fällen zu Blutungskomplikationen. Nach Unterbrechung der AT III Gabe konnten histologisch diskrete Myokardinfarkte beobachtet werden, die von der Arbeitsgruppe auf einen koagulatorischen Rebound-Effekt zurückgeführt wurden. Cowan et al. konnte mit einer alleinigen, gezielten AT III Substitution einen signifikanten Benefit in der Überlebenszeit von hCD55- und hCD59-transgenen Schweinenieren ohne das Auftreten schwerwiegender Komplikationen erzielen (Cowan 2002). Bezuglich der Gabe von Aspirin konnte eine TM hinausgezögert, aber nicht verhindert werden. Schirmer et al. hingegen konnten diese Beobachtung durch den kombinierten Einsatz von Aspirin und Clopidogrel unter Verwendung hCD46-transgener Schweineherzen nicht bestätigen (Schirmer 2004).

Aufgrund eines ausgebliebenden Erfolges nach Einsatz von Warfarin, niedermolekularem Heparin oder einer Kombinationstherapie von Aspirin und Clopidogrel vertreten McGregor et al. den Standpunkt, dass eine effektive Basisimmunsuppression und nicht die Substitution antikoagulativer Substanzen das Transplantatüberleben wesentlich verlängert (McGregor 2005, Byrne 2006).

Die Interaktion von porcinem vWF mit dem humanen Thrombozytenrezeptor GPIb kann durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen GPIb verhindert und eine direkte Aktivierung von Thrombozyten somit vermieden werden (Schulte am Esch 1997). Der gleiche Effekt kann auch durch den Einsatz von Prostazyklin und Nitropussid erzielt werden (Francesconi 1996). Eine Verbesserung der Mikrozirkulation konnte durch die Gabe von aktiviertem Protein C bewirkt werden (Simioni 2011).

Der Einsatz von Hirudin verbesserte in einem ex-vivo *working-heart*-Modell signifikant den koronaren Blutfluss und hierdurch die Transplantatüberlebenszeit (Brenner 2010). In dem gleichen VersuchsmodeLL konnten unter Verwendung hDAF-transgener Schweineherzen durch den Einsatz des Thrombozyten-Fibrinogen-Rezeptor GPIIb/IIIa-Inhibitor Tirofiban intravaskuläre Fibrinthromben und eine myokardiale Schädigung wirkungsvoll reduziert werden (Brandl 2005).

### 5.5.2. Die Expression antikoagulativer Gene auf porcinen Endothelien

Die Überexpression antikoagulativ wirkender Gene auf porcinen Endothelien von Gal-KO-Schweinen scheint ein nächster sinnvoller Schritt zum Schutz und zur Prolongation der Transplantatfunktion zu sein.

Die zusätzliche Expression von humanem Thrombomodulin (hTM) kann durch die Bindung von Thrombin und einer erhöhten Menge an aktiviertem Protein C eine sekundäre Produktion von Fibrin durch proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren V und VIII verhindern (Petersen 2009; Klymiuk 2011). Kürzlich wurden am Institut für Nutztiergenetik FLI, Mariensee, Neustadt durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Niemann im Rahmen unserer DFG-Transregio Forschungsgruppe tripel-transgene Gal-KO/hCD46/hTM-Schweine für den Einsatz im Primaten-Modell produziert.

Vielversprechend scheint auch die endotheliale Expression von hCD39 zu sein, mit der im Mausmodell eine wesentliche Protektion des Transplantates vor Thrombosen erzielt werden konnte (Dwyer 2004). Gleiches konnte auch nach Perfusion von Inselzellen hCD39-transgener Mäuse mit humanem Blut bestätigt werden (Dwyer 2006) Eine spontane Blutungstendenz konnte nach Produktion von hCD39-transgenen Schweinen nicht beobachtet werden (d'Apice 2006).

Mit dem Einsatz eines *small-interference-RNA*-Konstrukts (siRNA) wird versucht die Expression von *tissue factor* (TF) auf den porcinen Endothelien zu reduzieren und so die Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Gerinnungssystems zu minimieren (Hofmann 2003). Chen et al. zeigten, dass Spenderherzen von hTFPI (*human tissue factor pathway inhibitor*)-transgenen Mäusen nach Implantation in supprimierten Ratten vollständig vor einer AHXR geschützt werden können (Chen 2004).

## 5.6. Vor- und Nachteile des orthotopen und heterotopen Transplantationsmodells

Das **orthotope** Transplantationsmodell repräsentiert das einzige akzeptierte präklinische Tiermodell vor einer klinischen Anwendung xenogener Herztransplantationen am Menschen (Cooper 2000), da nur der in örtlicher

Übereinstimmung zu dem ursprünglichen Empfängerorgan durchgeführte Organersatz eine vollständige Beurteilung der Funktion des Senderherzens im Gesamtorganismus zulässt. Die Tatsache, dass das Transplantat eine von Anfang an volle lebenserhaltende Aufrechterhaltung der Zirkulation gewährleisten muss, führt nicht nur zu der großen Aussagekraft dieses Modells, sondern bringt auch einige Nachteile mit sich.

In der bereits publizierten Serie von 12 orthotopen Transplantationen hDAF-transgene Schweineherzen in Paviane war nur eine limitierte Überlebenszeit mit einem Maximum von 25 Tagen zu erzielen. Von den insgesamt 12 Tieren überlebten nur vier der Empfängertiere länger als 24 Stunden. Die frühzeitige Beendigung der Versuche stellte, mit Ausnahme eines Falls von hyperakuter Abstoßung, überwiegend Folge einer unmittelbar postoperativen Transplantatdysfunktion mit Transplantatversagen dar. Ursächliche Arrhythmien und insuffiziente Herzzeitvolumina konnten aufgrund eines eingeschränkten postoperativen Monitorings nicht frühzeitig erkannt und durch die Unfähigkeit kreislaufunterstützende inotrope Substanzen permanent applizieren zu können, nicht ausreichend und rechtzeitig therapiert werden. Ähnliches konnte auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (Byrne 2012, Zhu 2007). Darüber hinaus gestaltet der notwendige Einsatz der Herz-Lungen-Maschine das Verfahren der orthotopen Transplantation als sehr aufwendig. Die notwendige Vollheparinisierung mit einhergehendem erhöhtem Blutungsrisiko und eine zusätzliche kardiale Belastung durch einen erhöhten Volumen- und Katecholaminbedarf erweiterten das Spektrum möglicher Komplikationen. Neben einer Hämodilution können auftretende Blutungen zu Abfällen der Hämoglobinspiegel führen, die oftmals mit Erythrozytenkonzentraten ausgeglichen werden müssen.

Um immunologische Vorgänge und die Wirkung unterschiedlicher Transgene und modifizierter Immunsuppressions-Protokolle über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, wurde das orthotope Transplantationsmodell wieder verlassen und ein Wechsel in das **heterotope abdominelle** Modell, in dem das Spenderorgan in die anatomisch nicht mit dem ursprünglichen Empfängerorgan übereinstimmende abdominale Lage übertragen wird, vorgenommen. Anastomosiert werden bei diesem Verfahren Spender- und Empfängeraorta sowie

die A. pulmonalis des Spenders mit der V. cava inferior des Empfängers. Dabei werden die Herzkrankgefäße retrograd über die Empfängeraorta perfundiert. Das venöse Koronarblut wird über die Lungenarterie in die untere Hohlvene des Empfängers abgeleitet. Vorteil hier ist, dass das Transplantat keine lebenserhaltende (*life-supporting*) Funktion übernimmt, Langzeituntersuchungen somit nicht durch ein frühzeitiges Ableben der Tiere behindert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine nicht erforderlich ist, was das Operationsverfahren weniger aufwendig macht. Das Risikoprofil bereits oben beschriebener Komplikationen sinkt. Die fehlende kreislaufübernehmende Funktion macht im Gegensatz zum orthotopen Modell eine Euthanasie der Empfängertiere nach Abstoßung nicht zwingend erforderlich. In unserer Serie von 11 heterotopen xenogenen Herztransplantationen zeigten sich in einigen Fällen im pathologischen Befund makroskopisch ausgedehnte intraventrikuläre Ausgussthromben. Da der linke Ventrikel im heterotopen Modell nicht am Kreislauf teilnimmt, besteht hier eine hohe Neigung zur Thrombenbildung. Durch das Auskleiden des linken Herzens mit thrombotischem Material kommt es zur Verschlechterung der Transplantatdurchblutung und Pumpfunktion. Folgen sind eine Transplantatdysfunktion und eine verminderte Kontraktilität des Myokards, die wiederum eine Thrombenbildung begünstigt. Diese können sich in den Koronararterien fortsetzen, zu Myokardinfarkten oder auch zu Embolien der Pulmonalarterien führen. Zusätzlich zeigte sich in der heterotopen Serie ein hoher Anteil an nicht-abstoßungsbedingten Komplikationen, dominiert von gastrointestinalen Ursachen. Durch die abdominale Lage des implantierten Spenderorgans erhöht sich das Risiko für mechanische Verschlussstörungen des umliegenden Darms, die ein vorzeitiges Beenden der Versuche notwendig machen. Aber auch gegenteilig kann durch extra- oder intraabdominelle Druckerhöhungen die Anastomosen komprimiert und der das Transplantat versorgende Blutfluss erheblich reduziert werden. Nicht zu vergessen ist die fehlende Beurteilbarkeit der Transplantatfunktion hinsichtlich der Produktion eines ausreichenden Schlagvolumens zur Aufrechterhaltung eines suffizienten, mit dem Leben vereinbarenden Kreislaufs. Während es im orthotopen Modell aufgrund eines raschen Zusammenbruchs der Kreislauffunktion zu einem schnellen Versuchsende kommt, stellt sich die Bestimmung des genauen

Versuchsendes im heterotopen Modell, definiert als das vollständige Sistieren der Myokardfunktion, als nur schwer nachweisbar dar. Der Zeitpunkt, an dem das Spenderorgan die notwenige Kreislauffunktion nicht mehr aufrecht erhalten könnte, liegt hier meist früher als erfasst. Die zeitnahe Gewinnung von Gewebeproben zur histopathologischen Aufarbeitung ist meist nicht möglich und erfolgt verzögert. Das zu untersuchende Präparat weist oftmals erheblich nekrotische Gewebeanteile mit Einblutungen auf und kann nur erschwert bis unzureichend beurteilt werden.

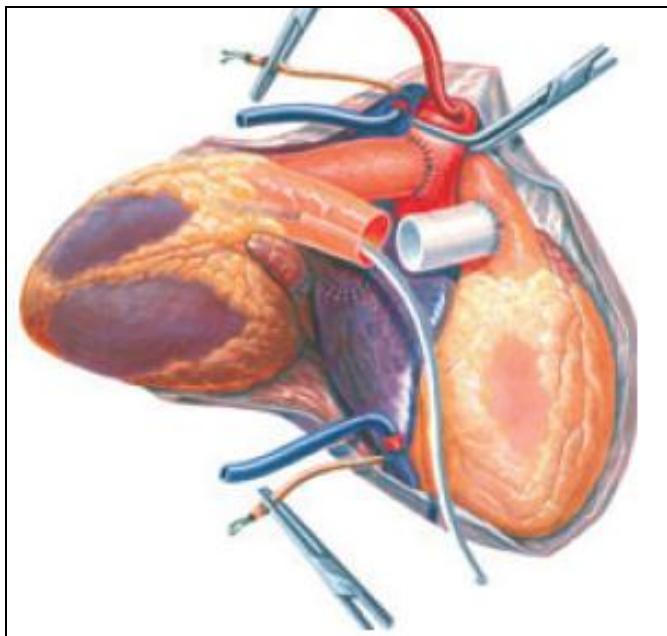


Abbildung 5.1: Anastomosenverhältnisse bei heterotop thorakaler Herztransplantation (Bauer 2010).

Aufgrund der zahlreichen nicht-abstoßungsbedingten, technischen Komplikationen brachte uns die Umstellung auf das heterotop abdominelle Transplantationsmodell keine Vorteile. Auch das in vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe eingesetzte orthotope Modell stellt sich zum jetzigen Forschungszeitpunkt, mit dem Schwerpunkt, immunologische Vorgänge unter speziellen immunsuppressiven Strategien zu analysieren, als ungeeignet dar. Eine passende Alternative bietet das **heterotop thorakale** Modell nach Losman und Barnard, in dem eine volle Transplantatfunktion neben einer uneingeschränkten Eigenherzfunktion ermöglicht wird (Losman 1977). Dabei wird das Spenderherz dem Eigenherz parallel verschalten (Anastomose zwischen beiden Vorhöfen und

zwischen beiden Aa. pulmonales mithilfe einer Polyesterprothese und beiden Aortae von Spender und Empfänger) und dies führt das zugeleitete Blutvolumen der Vorhöfe der Empfängerpulmonalis, bzw. –aorta zu (Abbildung 5.1). Das Transplantat befindet sich in einer physiologischeren Position und ermöglicht gleichzeitig wichtige Rückschlüsse über die Transplantatfunktion ähnlich wie für das präklinisch geforderte orthotope Modell. Kommt es im Rahmen von Abstoßungsprozessen zu temporären Einschränkungen der Pumpfunktion des Transplantates (bsp. durch Arrhythmien), führen diese nicht unumgänglich zum Zusammenbruch der Kreislauffunktion und zum Ableben des Tieres. So wird die Sicherheit des heterotopen Modells mit der lebenserhaltenden orthotopen Position des Empfängerherzens kombiniert.

## 5.7. Schlussfolgerung

Es besteht derzeit eine anhaltende Suche nach einer effektiven und gleichzeitig klinisch akzeptablen immunsuppressiven Therapie.

Die Vorteile des heterotop thorakalen Transplantationsmodells kombiniert mit multitransgenen Spenderherzen sind der nächste Schritt auf dem Weg zur klinischen Xenotransplantation. Neben den bereits produzierten tripel-transgenen Schweinen für Gal-KO/CD46/hTM ist auch die Kombination aus Gal-KO/CD46/HLA-E oder Gal-KO/CD46/hTM/CTLA-4 (LEA29Y) von potenziellem Nutzen.

Die verwendete Immunsuppression aus Tacrolimus, Sirolimus und Methylprednisolon stellt derzeit die am besten geeignete Grundlage der immunsuppressiven Behandlungsbasis dar. Es zeigte sich eine gute Verträglichkeit ohne das Auftreten toxischer Nebenwirkungen. Akute Abstoßungsmechanismen mit steigenden Anti-Schwein-Antikörpern sollten auch weiterhin mit ATG oder einem hochdosierten Kortisonbolus akut behandelt werden.

Zur Prävention und Therapie der folgenschweren akuten xenogenen Abstoßungsreaktion bedarf es derzeit bei noch unbekannten Antikörpern einer ungerichteten Reduktion der humoralen Immunabwehr. Besonders der Effekt von

Cyclophosphamid in niedriger Dosierung auf die Synthese und Differenzierung der antikörperproduzierenden B-Zellen ist von entscheidender Bedeutung. Alternativ ist der Einsatz des Anti-CD154-Antikörpers möglich. Eine Antikörperdepletion konnte ebenfalls durch den Einsatz der extrakorporalen Immunadsorption erfolgreich erzielt werden. Von entscheidender Bedeutung ist weiterhin die Identifizierung der nicht- $\alpha(1,3)$ Gal-spezifischen Antikörper zur Entwicklung gezielter Therapieverfahren.

Weiterführende Erfolge zur Ermöglichung einer allen Verfahren überlegenen, spender-spezifische Toleranzinduktion bleiben wünschenswert.

## **6. Zusammenfassung**

Eine langfristige Lösung, dem weltweiten Organspendemangel entgegenzuwirken, stellt die Verfügbarkeit tierischer Spenderorgane dar. Die bislang fehlende Möglichkeit eines langfristigen, vollständigen und permanenten künstlichen Organersatzes macht ein Voranschreiten der Forschung auf dem Gebiet der Xenotransplantation, der Organübertragung von Tier auf Mensch, umso notwendiger und dringlicher.

Aufgrund anatomischer und physiologischer Ähnlichkeiten und einer ausreichenden Reproduzierbarkeit wurde das Schwein als optimaler Organspender definiert. Trotz der insgesamt günstigen Voraussetzungen ist das diskordante (= nicht übereinstimmende, entfernte phylogenetische Verwandtschaft) Transplantationsmodell charakteristisch für eine durch präformierte Antikörper hervorgerufene hyperakute Abstoßungsreaktion innerhalb von Minuten bis Stunden nach Implantation in den Empfängerorganismus. Diese sind hauptsächlich der IgM-Klasse zugehörig und gegen das endotheliale  $\alpha(1,3)$ Gal-Epitop gerichtet. Durch eine gezielte genetische Modifikation der Spenderschweine konnte die hyperakute xenogene Abstoßung durch die endotheliale Expression humaner Komplementregulatoren wie hDAF erfolgreich überwunden und Überlebenszeiten von bis zu 139 Tagen erzielt werden. Der entscheidende Vorteil das Gen für die  $\alpha$ -Galaktosyltransferase mittels Klonierung eliminieren zu können (Gal-KO), verhalf zum Durchbruch die hyperakute Abstoßung gänzlich zu verhindern. Eine verzögert auftretende akute humorale und zelluläre Abstoßungsreaktion stellt nunmehr das Hindernis vor einer klinischen Anwendung der Xenotransplantation dar. Diese ist charakterisiert durch die Bindung induzierter, nicht- $\alpha(1,3)$ Gal-spezifischer xenoreaktiver Antikörper. NK-Zellen, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten transmigrieren in das Transplantat und führen zur Zelltlyse. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade und spezies-spezifische Inkompatibilitäten innerhalb des Gerinnungssystems führen zur thrombotischen Mikroangiopathie mit intravaskulärer Thrombenbildung und fatalen Auswirkungen auf die Transplantatfunktion. Da die Spezifität der induzierten zytotoxischen Antikörper bislang nicht identifiziert werden konnte,

stützt sich die Therapie vornehmlich auf die Depletion und Suppression antikörperproduzierender B-Zellen, bzw. auf die Elimination vorhandener xenoreaktiver Antikörper. Zelluläre Abstoßungsmechanismen können durch eine geeignete immunsuppressive Basistherapie behandelt werden. Hier kristallisierte sich die Kombination aus Methylprednisolon, Tacrolimus und Sirolimus als besonders effektiv und schonend heraus.

Die Untersuchung der unterschiedlichen Phasen einer humoralen und zellulären xenogenen Transplantatabstoßung unter verschiedenen therapeutischen Strategien und der Relevanz des Langzeitüberlebens in einem Menschen kann nur in einem intakten Gesamtorganismus eines Primaten untersucht werden. Hierbei bedarf es der Unterscheidung verschiedener Transplantationsmodelle. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die heterotop abdominale kardiale Xenotransplantation im Primatenmodell unter Berücksichtigung von ein-, bzw. mehrfach-transgenen Spenderorganen und unterschiedlichen immunsuppressiven Protokollen mit der unseren Versuchen vorausgegangenen, lebenserhaltenden orthotopen Versuchsreihe zu vergleichen. Bei der orthotopen Herztransplantation wird das ursprüngliche Herz des Pavians durch das porcine Spenderherz unter Belassung von Teilen beider Vorhöfe ersetzt. Dabei übernimmt das Transplantat von Beginn an die lebenserhaltende Funktion. Die Aufrechterhaltung der Zirkulation konnte jedoch durch unmittelbar postoperativ aufgetretene Transplantatdysfunktionen nicht gewährleistet werden und führte zu frühzeitigen Beendigungen der Versuche. Um immunologische Vorgänge über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, wurde das Spenderherz in die anatomisch nicht mit dem ursprünglichen Empfängerorgan übereinstimmende, heterotop abdominale Lage transplantiert. Da der linke Ventrikel in diesem Modell nicht am Kreislauf teilnimmt, konnten teilweise ausgedehnte Thrombosierungen des linken Herzens beobachtet werden. Durch die abdominale Lage kam es zu mechanischen Verschlussstörungen des umliegenden Darms. Aufgrund zahlreicher nicht-abstoßungsbedingter, technischer Komplikationen brachte die Umstellung vom orthotopen auf das heterotop abdominale Transplantationsmodell keine Vorteile. Eine gute Lösung stellt hier das heterotop thorakale Transplantationsmodell nach Losman und Barnard dar, in dem die Sicherheit des heterotopen Modells mit der physiologischen orthotopen Position vereinbart wird.

Auf dem Weg zur klinischen Xenotransplantation wurde in den letzten Jahren der Einsatz immunmodulatorischer Strategien zur Überwindung xenogener Abstoßungsreaktionen von Schweineherzen in Pavianen kombiniert und immunsuppressive Protokolle weiterentwickelt. In einer Versuchsreihe von 11 heterotop abdominalen Herztransplantationen einfach- und multitransgener Schweineherzen konnte eine hyperakute Abstoßungsreaktion sowohl durch den Einsatz von hDAF-transgenen als auch von Gal-KO-Schweineherzen effektiv inhibiert werden. Dabei konnte das längste Überleben eines Gal-KO/CD46 transgenen Spenderherzens in Pavian 30 mit 29 Tagen durch eine Kombinationstherapie aus Basisimmunsuppression (Methylprednisolon, Tacrolimus, Sirolimus, ATG), Rituximab, löslichem Fc<sub>Y</sub>RIIb-Rezeptor, Cyclophosphamid und der extrakorporalen Immunadsorption erreicht werden. Das Transplantat war subtotal mit einem wandadhärenten Thrombus im linken Ventrikel gefüllt, die Koronarien durch Thromben gänzlich verstopft. Ödeme und Hämorrhagien sowie granulozytäre oder lymphozytäre Gewebsinfiltrationen fehlten. Der fehlende endotheliale Nachweis von C4d und IgM sowie von CD3+ und Fibrin repräsentierten einen stabilen immunologischen Zustand. Nicht immunologische Faktoren, sondern der reduzierte Allgemeinzustand des Tieres sowie die limitierenden Nachteile des heterotop abdominalen Modells führten zur Beendigung des Versuches. In zwei Fällen kam es zu einer akut vaskulären und in einem Fall zu einer akut zellulären Abstoßungsreaktion. Alle erprobten Behandlungsprotokolle konnten eine definitive Unterbindung der verzögerten xenogenen Transplantatabstoßung bislang nicht erzielen. Die Realisierung der Xenotransplantation bleibt dennoch von entscheidender Bedeutung für die Transplantationsmedizin als ständig erneuerbare Quelle der weltweit dringlich benötigten Spenderorgane. Daher besteht die anhaltende Suche nach einem geeigneten immunsuppressiven Regime. Zukunftsträchtig erscheint die Produktion multitransgener Schweine mit endothelialer Expression antikoagulatorisch wirkender Proteine und die gezielte Inaktivierung, bzw. Depletion antikörperproduzierender B-Zellen. Parallel müssen potentielle Anti-Schwein-Antikörper definiert, immunsuppressive Therapien optimiert und Strategien zur Ermöglichung einer Toleranzinduktion vorangebracht werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Akamatsu Y**, Haga M, Tyagi S, Yamashita K, Graça-Souza AV, Ollinger R, Czismadia E, May GA, Ifedigbo E, Otterbein LE, Bach FH, Soares MP. *Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury.* The Federation of American Societies for Experimental Biology. Journal 2004; 18 (6): 771-772
- Allan JS**, Rose GA, Choo JK, Arn JS, Vesga L, Mawulawde K, Slisz JK, Allison K, Madsen JC. *Morphometric analysis of miniature swine hearts as potential human xenografts.* Xenotransplantation 2001; 8 (2): 90-93
- Allison AC**, Eugui EM. *Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection.* Transplantation 2005; 80 (2 Suppl): 181-190
- Alwayn IP**, Basker M, Buhler L, Cooper DK. *The problem of anti-pig antibodies in pig-to-primate xenografting: current and novel methods of depletion and/or suppression of production of anti-pig antibodies.* Xenotransplantation 1999; 6 (3): 157-168
- Alwayn IPJ**, Basker M, Wu C, Buhler L, Lambrights D, Treter S, Harper D, Kitamura H, Vitetta ES, Abraham S, Awwad M, White-Scharf ME, Sachs DH, Thall A, Cooper DK. *Effects of specific anti-B and/or anti-plasma cell immunotherapy on antibody production in baboons: depletion of CD20- and CD22-positive B cells does not result in significantly decreased production of anti-alphaGal antibody.* Xenotransplantation 2001; 8 (3): 157-171
- Atkinson JP**, Oglesby TJ, White D, Adams EA, Liszewski MK. *Separation of self from non-self in the complement system: a role of membrane cofactor protein and decay accelerating factor.* Clinic Experimental Immunology 1991; 81: 27-30
- Bach FH**, Robson SC, Ferran C, Winkler H, Millian MT, Stuhlmeier KM, Vanhove B, Blakely ML, van der Werf WJ, Hofer E, de Martin R, Hancock WW. *Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection.* Immunology Review 1994; 141: 5-30
- Bach FH**, Robson SC, Winkler H, Ferran C, Stuhlmeier KM, Wrighton CJ, Hancock WW. *Barriers to xenotransplantation.* Nature Medicine 1995; 1: 869-873

- Bach FH**, Ferran C, Hechenleitner P, Mark W, Koyamada N, Miyatake T, Winkler H, Badrichani A, Candinas D, Hancock WW. *Accommodation of vascularized xenografts expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment.* Nature Medicine 1997; 3: 196
- Bach FH.** *Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel.* The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 2005; 19: 1216-1219
- Baerenwaldt A**, Nimmerjahn F. *FcgammaRIIB – regulating the balance between protective and autoreactive immune responses.* Immunology and Cell Biology 2008; 86 (6): 482-484
- Bailey LL**, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W, Jolley WB. *Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate.* The Journal of the American Medical Association 1985; 254: 3321-3329
- Barnard CN.** *Human heart transplantation.* The Canadian Medical Association Journal 1969; 100 (3): 91-104
- Barnard CN**, Wolpowitz W, Losman JG. *Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass.* South African Medical Journal 1977; 52: 1035-1038
- Barth RN**, Yamamoto S, LaMattina JC et al. *Xenogeneic thymokidney and thymic tissue transplantation in a pig-to-baboon model: I. Evidence for pig-specific T-cell unresponsiveness.* Transplantation 2003; 75: 1615-1624
- Bauer A**, Baschnegger H, Abicht JM, Brandl U, Brenner P, Thein E, Hammer C, Reichart B, Peter K, Schmoekel M, Christ F. *hDAF porcine cardiac xenograft maintains cardiac output after orthotopic transplantation into baboon – a perioperative study.* Xenotransplantation 2005; 12: 444-449
- Bauer A**, Postrach J, Thormann M, Blanck S, Faber C, Wintersberger B, Michel S, Abicht JM, Christ F, Schmitz S, Schmoekel M, Reichart B, Brenner P. *First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation.* Xenotransplantation 2010; 17 (3): 243-249
- Beyersdorf F**, Martin J, Zehender M, Siepe M, Heilmann C, Jung W, Zeh W, van de Loo A. *Chirurgische Behandlungsoptionen bei terminaler chronischer Herzinsuffizienz.* Deutsches Ärzteblatt 2005; 102 (37): 2468-2478

- Bhatti FN**, Schmoeckel M, Zaidi A, Cozzi E, Chavez G, Goddard M, Dunning JJ, Wallwork J, White DJ. *Three-month survival of hDAF transgenic pig hearts transplanted into baboons*. Transplantation Proceedings 1999; 31 (1-2): 958
- Blakely ML**, van der Werf WJ, Berendt MC, Dalmasso AP, Bach FH, Hancock WW. *Activation of intragraft endothelial and molecular cells during discordant xenograft rejection*. Transplantation 1994; 58: 1059-1066
- Brandl U**, Erhardt M, Joeckle H, Michel S, P, Bittmann I, Roessle M, Mordstein V, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B. *Combining the hDAF transgene with the GP IIb/IIIa inhibitor Tirofiban improves heart performance and reduces myocardial damage following hyperacute rejection in an ex vivo perfusion model*. Transplantation Proceedings 2005; 37: 491-492
- Brandl U**, Michel S, Jöckle H, Burdorf L, Bittmann I, Rössle M, Mordstein V, Brenner P, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M. *Soluble Galα(1,3)Gal conjugate combined with hDAF preserves morphology and improves function of cardiac xenografts*. Xenotransplantation 2007; 14: 323-332
- Brenner P**, Reichenspurner H, Schmoeckel M; Wimmer C, Rucker A, Eder V, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. *Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons using immunoabsorption of antibodies and complement factors*. Transplant International 2000a; 13 (1): 508-517
- 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 2000b; 69 (2): 208-214
- Brenner P**, Schmoeckel M, Wimmer C, Eder V, Rucker A, Felbinger T, Uchita S, Hinz M, Brandl U, Meiser B, Reichenspurner H, Hammer C, Reichart B. *Mean xenograft survival of 14.6 days in a small group of hDAF-transgenic pig hearts transplanted orthotopically into baboons*. Transplantation Proceedings 2005a; 37: 472-476
- Brenner P**, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Uchita S, Brandl U, Hinz M, Felbinger T, Meiser B, Hammer C, Reichenspurner H, Reichart B. *Combination of hDAF-transgenic pig hearts and immunoabsorption in heterotopic*

*xenotransplantation of immunosuppressed baboons.* Transplantation Proceedings 2005b; 37: 483-486

**Brenner P**, Keller M, Beiras-Fernandez A, Uchita S, Kur F, Thein E, Wimmer C, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B. *Prevention of hyperacute xenograft rejection through direct thrombin inhibition with hirudin.* Annual of Transplantation 2010; 15 (4): 30-37

**Buhler L**, Alwayn IP, Appel JZ 3<sup>rd</sup>, Robson SC, Cooper DK. *Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism.* Transplantation 2001; 71: 491

**Byrne GW**, Davies WR, Oi K, Rao VP, Teotia SS, Ricci D, Tazelaar HD, Walker RC, Logan JS, McGregor CGA. *Increased immunosuppression, not anticoagulation, extends cardiac xenograft survival.* Transplantation 2006; 82: 1787-1791

**Byrne GW**, Stalboerger PG, Davila E, Heppelmann CJ, Gazi MH, McGregor HCJ, LaBreche PT, Davies WR, Rao VP, Oi K, Tazelaar HD, Logan JS, McGregor CGA. *Proteomic identification of non-Gal antibody targets after pig-to-primate cardiac xenotransplantation.* Xenotransplantation 2008; 15: 268-276

**Byrne GW**, McGregor CGA. *Cardiac xenotransplantation: progress and challenges.* Current Opinion in Organ Transplantation 2012; 17: 148-154

**Calne RY**. *Organ transplantation between widely disparate species.* Transplantation Proceedings 1970; 2 (4): 550-556

**Camara NO**, Soares MP. *Heme oxygenase-1 (HO-1), a protective gene that prevents chronic graft dysfunction.* Free Radical Biology & Medicine 2005; 38 (4): 426-435

**Cardona K**, Milas Z, Strobert E, Cano J, Jiang W, Safley SA, Gangappa S, Hering BJ, Weber CJ, Pearson TC, Larsen CP. *Engraftment of adult porcine islet xenografts in diabetic nonhuman primates through targeting of costimulation pathways.* American Journal of Transplantation 2007; 7 (10): 2260-2268

**Carrel A**. *On the permanent life of tissues outside of the organism.* The Journal of Experimental Medicine 1912; 15 (5): 516-528

**Cascalho M**, Platt JL. *The immunological barrier to xenotransplantation.* Immunity 2001; 14: 437-446

**Chen D**, Weber M, McVey JH, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Lechner RI, Dorling A. *Complete inhibition of acute humoral rejection using regulated*

*expression of membrane-tethered anticoagulants on xenograft endothelium.* American Journal of Transplantation 2004; 4 (12): 1958-1963

**Collaborative Transplant Study**, University of Heidelberg. *All Transplants* 1985-2008. [www.ctstransplant.org](http://www.ctstransplant.org)

**Cooley DA**, Hallman GL, Bloodwell RD, Nora JJ, Leachman RD. *Human Heart transplantation. Experience with twelve cases.* The American Journal of Cardiology 1968; 22: 804

**Cooper DKC**, Good AH, Koren E. *Identification of α-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man.* Transplantation Immunology 1993; 1: 198-205

**Cooper DKC**, Keogh AM, Brink J, Corris PA, Klepetko W, Pierson RN, Schmoeckel M, Schirakura R, Stevenson LW. *Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation: The present status of xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases.* The Journal of Heart and Lung Transplantation 2000; 19 (12): 1125-1165

**Cooper DK**, Gollacker B, Sachs DH. *Will the pig solve the transplantation backlog?* Annual Review of Medicine 2002; 53: 133-147

**Cooper DKC**, Dorling A, Pierson III RN, Rees M, Seebach J, Yazer M, Ohdan H, Awwad M, Ayares D. *Alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs for xenotransplantation: where do we go from here?* Transplantation 2007; 84 (1): 1-7

**Cowan PJ**, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Dwyer K, Filshie RJ, Fisicaro N, Francis DM, Gock H, Goodman DJ, Katsoulis J, Robson SC, Salvaris E, Shinkel TA, Stewart AB, d'Apice AJ. *Protective effects of recombinant human antithrombin III in pig-to-human renal xenotransplantation.* American Journal of Transplantation 2002; 2 (6): 520-525

**Cox A**, Zhong R. *Current advance in xenotransplantation.* Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International 2005; 4 (4): 490-494

**Cozzi E**, White DJ. *The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans.* Nature Medicine 1995; 1: 964-966

**Cozzi E**, Bhatti F, Schmoeckel M, Chavez G, Smith KG, Zaidi A, Bradley JR, Thiru S, Goddard M, Vial C, Ostlie D, Wallwork J, White DJ, Friend PJ. *Long-term*

*survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts.* Transplantation 2000; 70 (1): 15-21

**Cozzi E**, Vial C, Ostlie D, Farah B, Chavez G, Smith KG, Bradley JR, Thiru S, Davies HF, Wallwork J, White DJ, Goddard M, Friend PJ. *Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts.* Xenotransplantation 2003; 10 (4): 300-310

**Cozzi E**, Simioni P, Boldrin M, Seveso M, Calabrese F, Baldan N, Castagnaro M, Gavasso S, Fadin M, Zerbinati P, Toermene D, Tognin G, Thiene G, Pagnan A, Ancona E. *Alterations in the coagulation profile in renal pig-to-monkey xenotransplantation.* American Journal of Transplantation 2004; 4 (3): 335-345

**Crew MD**. *Play it E or G: utilization of HLA-E and -G in xenotransplantation.* Xenotransplantation 2007; 14: 198-207

**Czaplicki J**, Blonska B, Religa Z. *The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human.* The Journal of Heart and Lung Transplantation 1992; 11 (2): 393-397

**D'Apice AJ**. *Is xenotransplantation of vascularized organs just too hard?* Xenotransplantation 2006; 13: 182-185

**Dalmasso AP**, Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH. *Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection.* Transplantation 1991; 52: 530-533

**Dawson JR**, Vidal AC, Malyguine AM. *Natural killer cell-endothelial cell interactions in xenotransplantation.* Immunologic Research 2000; 22 (2-3): 165-176

**Day JD**, Rayburn BK, Gaudin PB et al. *Cardiac allograft vasculopathy: the central role of ischemia-induced endothelial cell injury.* Journal of Heart Lung Transplantation, 1995; 14: 142-149

**Dehoux JP**, Gianello P. *Accommodation and antibodies.* Transplant Immunology 2009; 21 (2): 106-110

**Denis J-B**. *Lettre écrite à M. de Montmor, touchant une nouvelle manière de guérir plusieurs maladies par la transfusion du sang, confirmée par deux expériences faites sur des hommes.* Paris 1667

**Deschamps JY**, Roux FA, Saï P, Gouin E. *History of xenotransplantation*. Xenotransplantation 2005; 12: 91-109

**Deutsche Stiftung Organtransplantation – Organspende und Transplantation in Deutschland, Jahresbericht 2009**. Frankfurt/Main 2009

**Diswall M**, Angström J, Karlsson H, Phelps CJ, Ayares D, Teneberg S, Breimer ME. *Structural characterization of alpha1,3-galactosyltransferase knockout pig heart and kidney glycolipids and their reactivity with human and baboon antibodies*. Xenotransplantation 2010; 17 (1): 48-60

**Dwyer KM**, Robson SC, Nandurkar HH, Campbell DJ, Gock H, Murray-Segal LJ, Fisicaro N, Mysore TB, Kaczmarek E, Cowan PJ, d'Apice AJ. *Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation*. Journal of Clinical Investigation 2004; 113 (10): 1440-1446

**Dwyer KM**, Mysore TB, Crikis S, Robson SC, Nandurkar H, Cowan PJ, D'Apice AJ. *The transgenic expression of human CD39 on murine islets inhibits clotting of human blood*. Transplantation 2006; 82 (3): 428-432

**Forte P**, Baumann BC, Weiss EH, Seebach JD. *HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading*. American Journal of Transplantation 2005; 5 (9): 2085-2093

**Francesconi M**, Casonato A, Pagan S, Donella-Deana A, Pontara E, Girolami A, Deana R. *Inhibitory effect of prostacyclin and nitroprusside on type IIB von Willebrand factor-promoted platelet activation*. Thrombosis and Haemostasis 1996; 76 (3): 469-474

**Fujiwara I**, Nakajima H, Yamagishi H, Matsuda T, Mizuta N, Oka T. *The molecular mechanism of apoptosis induced by xenogeneic cytotoxicity*. Xenotransplantation 1998; 5 (1): 50-56

**Galili U**, Shohet SB, Korbin E. *Man, apes and old monkeys differ from other mammals in the expression of α-galactosyl epitopes on nucleated cells*. Journal of Biology and Chemistry 1988; 52: 17755-17762

**Gock H**, Nottle M, Lew AM, d'Apice AJF, Cowan P. *Genetic modification of pigs for solid organ xenotransplantation*. Transplantation Reviews 2011; 25: 9-20

- Goddard MJ**, Dunning JJ, Atkinson C, Horsley J, Pino-Chavez G, Wallwork J. *Histopathology of rejection in the pig-to-primate cardiac xenograft model*. The Journal of Heart and Lung Transplantation 2001; 20 (2): 216
- Gollackner B**, Goh SK, Qawi I, Buhler L, Knosalla C, Daniel S, Kaczmarek E, Awwad M, Cooper DK, Robson SC. *Acute vascular rejection of xenografts: roles of natural and elicited xenoreactive antibodies in activation of vascular endothelial cells and induction of procoagulant activity*. Transplantation 2004; 77(11): 1735-1741
- Gonzalez-Stawinski GV**, Yu PB, Love SD, Parker W, Davis RD Jr. *Hapten-induced primary and memory humoral responses are inhibited by the infusion of anti-CD20 monoclonal antibody (IDE-C2B8, Rituximab)*. Clinical Immunology 2001; 98: 175
- Good AH**, Cooper DKC, Malcolm AJ. *Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in man*. Transplantation Proceedings 1992; 24: 559-562
- Goodman DJ**, Von Albertini M, Willson A, Millan MT, Bach FH. *Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells*. Transplantation 1996; 61(5): 763-771
- Goodman DJ**, Pears MJ, d'Apice AJF. *Overcoming hyperacute xenograft rejection with transgenic animals*. Bio Drugs 1998; 9 (3): 219-234
- Gorer PA**, Loutit JF, Micklem HS. *Proposed revisions of 'transplantese'*. Nature 1961; 189: 1024-1025
- Halloran PF**. *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. The New England Journal of Medicine 2004; 351 (26): 2715-2729
- Hammer C**. *Cytology in transplantation*. R. S. Schulz Verlag 1989
- Hammer C**. *Xenotransplantation – is it just around the corner?* Nephrology Dialysis Transplantation 1994; 9: 1724-1727
- Hammer C**. *Physiological obstacles after xenotransplantation*. Annals of the New York Academy of Science 1998a; 862: 19-27
- Hammer C**, Linke R, Wagner F, Diefenbeck M. *Organs from animals for men*. International Archives of Allergy and Immunology 1998b; 116: 5-21
- Hammer C**. *Xenotransplantation: Perspectives and limits*. Blood Purification 2001; 19: 322-328

- Hardy JD**, Kurrus FD, Chavez CM, Neely WA, Eraslan S, Turner MD, Fabian LW, Labecki TD. *Heart transplantation in man: developmental studies report of a case.* The Journal of the American Medical Association 1964; 188: 1132-1140
- Heneine W**, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Vasquez Rosales G, 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.* The Lancet 1998; 352 (9129): 695-699
- Hertz MI**, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Edwards LB, Kirk R, Kucheryavaya AY, Rahmel AO, Rowe AW, Stehlik J, Taylor DO. *Scientific registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: introduction to the 2009 annual reports.* Journal of Heart and Lung Transplantation 2009; 28 (10): 929-989
- Harousseau JL**, Attal M, Leleu X, Troncy J, Pegourie B, Stoppa AM, Hulin C, Benboubker L, Fuzibet JG, Renaud M, Moreau P, Avet-Loiseau H. *Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study.* Haematologica 2006; 91 (11): 1498-1505
- Hofmann A**, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. *Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors.* EMBO Reports 2003; 4 (11): 1054-1060
- Houser SL**, Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJMF, Gollackner B, Cheng J, Shimizu A, Schuurman H-J, Cooper DKC. *Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons.* Xenotransplantation 2004; 11: 416-425
- Inverardi L**, Clissi B, Stolzer AL, Bender JR, Sandrin MS, Pardi R. *Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues.* Transplantation 1997; 63 (9): 1318-1330
- Itescu S**, Kwiatkowski P, Artrip JH, Wang SF, Ankersmit J, Minanov OP, Michler RE. *Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period.* Human Immunology 1998; 59 (5): 275-286

- Kalady MF**, Lawson JH, Sorrell RD, Platt JL. *Decreased fibrinolytic activity in porcine-to-primate cardiac xenotransplantation*. Molecular Medicine 1998; 4 (9): 629-637
- Kaplon RJ**, Michler RE, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Platt JL. *Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts*. Transplantation 1994; 59: 1-6
- Kawai T**, Cosmi B, Colvin RB, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, Synkes M, Monroy R, Tanaka M, Sachs DH. *Mixed chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys*. Transplantation 1995; 59: 256-262
- Kennedy I.** *Xenotransplantation: Ethical acceptability*. Transplantation Proceedings 1997; 29 (6): 2729-2730
- Kinderlehrer AR**, Gregoire IP, Hamdulay SS, Ali F, Steinberg R, Silva G, Ali N, Wang B, Haskard D, Soares MP, Mason JC. *Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin*. The American Society of Hematology 2009; 113: 1598-1607
- Klymiuk N**, Aigner B, Brem G, Wolf E. *Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation*. Molecular Reproduction & Development 2010; 77: 209-221
- Klymiuk N**, Wuensch A, Kurome M, Kessler B, Baehr A, Nagashima H, Ayares D, Wolf E. *GaIT-KO/CD46/hTM triple-transgenic donor animals for pig-to-baboon heart transplantation*. Xenotransplantation 2011; 18: 271
- Knosalla C**, Yazawa K, Behdad A, Bodyak N, Shang H, Bühler L, Houser S, Gollackner B, Griesemer A, Schmitt-Knosalla I, Schuurman HJ, Awwad M, Sachs DH, Cooper DK, Yamada K, Usheva A, Robson SC. *Renal and cardiac endothelial heterogeneity impact acute vascular rejection in pig-to-baboon xenotransplantation*. American Journal of Transplantation 2009; 9 (5): 1006-1016
- Kunter U**, Daniel S, Arvelo MB, Choi J, Shukri T, Patel VI, Longo CR, Scali ST, Shrikhande G, Rocha E, Czismadia E, Mottley C, Grey ST, Floege J, Ferran C. *Combined expression of A1 and A20 achieves optimal protection of renal proximal tubular epithelial cells*. Kidney International 2005; 68 (4): 1520-1532
- Kuwaki K**, Knosalla C, Dor FJMF, Gollackner B, Tseng Y-L, Houser S, Mueller N, Prabharasuth D, Alt A, Moran K, Cheng J, Behdad A, Sachs DH, Fishman JA,

- Schurrman H-J, Awwad M, Cooper DKC. *Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD154mAb-based regimen*. The American Journal of Transplantation 2004; 4: 363-372
- Kuwaki K**, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada J, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. *Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience*. Nature Medicine 2005; 11 (1); 29-31
- Langat DK**, Mwenda JM. *Potential risks of virus infections in xenotransplantation*. Acta Tropica 2000; 76: 147-158
- Larner AJ**. *A portrait of Richard Lower*. Endeavour 1987; 11 (4): 205-208
- Lawson JH**, Platt JL. *Molecular barriers to xenotransplantation*. Transplantation 1996; 62: 303-310
- Leventhal JR**, Matas AJ, Sun LH, Reif S, Bolman RM 3rd, Dalmasso AP, Platt JL. *The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model*. Transplantation 1993; 56(1): 1-8
- Lilienfeld BG**, Crew MD, Forte P, Baumann BC, Seebach JD. *Transgenic expression of HLA-E single chain trimer protects porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Xenotransplantation 2007; 14 (2): 126-134
- Lin YJ**, Hara H, Tai HC, Long C, Tokita D, Yeh P, Ayares D, Morelli AE, Cooper DK. *Suppressive efficacy and proliferative capacity of human regulatory T cells in allogeneic and xenogeneic responses*. Transplantation 2008; 86 (10): 1452-1462
- Losman JG**, Barnard C. *Hemodynamic evaluation of left ventricular bypass with a homologous cardiac graft*. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 1977; 74: 695
- Lower RR**, Stofer RC, Shumway NE. *Studies on the orthotopic homotransplantation of the canine heart*. Surgical Forum 1960; 11: 18-21
- Lynch RJ**, Platt JL. *Escaping from rejection*. Transplantation. 2009; 88 (11): 1233-1236

- Magnusson SE**, Andrén M, Nilsson KE, Sondermann P, Jacob U, Kleinau S. *Amelioration of collagen-induced arthritis by human recombinant soluble Fc<sub>Y</sub>R<sub>IIb</sub>*. Clinical Immunology 2008; 127 (2): 225-233
- Marion P.** *Les transplantations cardiaques et les transplantations hépatiques*. Lyon Médical 1969; 222: 585– 608
- Matthews JB**, Ramos E, Bluestone JA. *Clinical trials of transplant tolerance: slow but steady progress*. American Journal of Transplantation 2003; 3 (7): 794-803
- 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*. Human Immunology 1997; 58: 91-105
- McGregor CGA**, Teotia SS, Byrne GW, Michaels MG, Risdahl JM, Schirmer JM, Tazelaar HD, Walker RC, Logan JS. *Cardiac Xenotransplantation: Progress toward the clinic*. Transplantation 2004; 78 (11): 1569-1575
- McGregor CGA**, Davis WR, Teotia SS, Schirmer JM, Risdahl JM, Tazelaar HD, Kremers WK, Walker RC, Byrne GW, Logan JS. *Cardiac xenotransplantation: recent clinical progress with 3-month median survival*. Cardiothoracic Transplantation 2005; 130: 844-851
- McGregor CGA**, Ricci D, Miyagi N, Stalboerger PG, Du Z, Oehler EA, Tazelaar HD, Byrne GW. *Human CD55 expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts*. Transplantation 2012; 93 (7): 686-692
- Meiser BM**, Billingham ME, Morris RE. *Effects of cyclosporine, FK506, and rapamycin on graft vessel disease*. Lancet 1991; 338: 1297-1298
- Miyagawa S**, Yamamoto A, Matsunami K, Wang D, Takama Y, Ueno T, Okabe M, Nagashima H, Fukuzawa M. *Complement regulation in the GalT KO era*. Xenotransplantation 2010; 17: 11-25
- Mohiuddin MM**; Corcoran PC, Singh AK, Azimzadeh A, Hoyt RF Jr, Thomas ML, Eckhaus MA, Seavey C, Ayares D, Pierson III RN, Horvath KA. *B-cell depletion extends the survival of GalKO.hCD46Tg pig heart xenografts in baboons for up to 8 months*. American Journal of Transplantation 2012; 12: 763-771

- Morath C**, Zeier M. *Review of the antiproliferative properties of mycophenolate mofetil in non-immune cells.* International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2003; 41(10): 465-469
- Morgan BP**, Berg CW, Harris CL. "Homologous restriction" in complement lysis: roles of membrane complement regulators. Xenotransplantation. 2005; 12 (4): 258-265
- Morschheuser T**, Steinhoff G, Indzhiia L, Heiser A, Hein M, Lapin BA, Haverich A. Successful down-regulation of natural and xenoreactive antibodies in pig-to-baboon xenotransplantation by high-dose cyclophosphamide. Transplantation proceedings 1997; 29 (1-2): 970-972
- Murphy B**, Auchincloss H Jr, Carpenter CB, Sayegh MH. *T cell recognition of xeno-MHC peptides during concordant xenograft rejection.* Transplantation 1996; 61 (8): 1133-1137
- Nagy ZA**, Hubner B, Löhning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. Nature Medicine 2002; 8 (8): 801-807
- Neuhof H.** *The transplantation of tissues.* Appleton & Co., New York 1923; 260
- Nicolini F**, Gherli T. Alternatives to transplantation in the surgical therapy for heart failure. European Journal of Cardiothoracic Surgery 2009; 35 (2): 214-228
- Oropeza M**, Petersen B, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Lemme E, Hassel P, Herrmann D, Barg-Kues B, Holler S, Queisser AL, Schwinzer R, Hinkel R, Kupatt C, Niemann H. *Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli.* Xenotransplantation 2009; 16 (6): 522-534
- Palmetshofer A**, Galili U, Dalmasso AP, Robson SC, Bach FH. *Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type II activation.* Transplantation 1998; 65 (7): 971-978
- Perico N**, Benigni A, Remuzzi G. *Xenotransplantation in the 21<sup>st</sup> century.* Blood Purification 2002; 20: 45-54

- Petersen B**, Ramackers W, Tiede A, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Barg-Kues B, Schuettler W, Friedrich L, Schwinzer R, Winkler M, Niemann H. *Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C*. Xenotransplantation 2009; 16 (6): 486-495
- Platt JL**, Vercellotti GM, Lindman B, Oegema TR Jr, Bach FH, Dalmasso AP. *Release of heparin sulfate from endothelial cells: implications for pathogenesis of hyperacute rejection*. Journal of Experimental Medicine 1990; 171: 1363
- Platt JL**, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH. *Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model*. Transplantation 1991; 52 (2): 214-220
- Platt JL**, McGregor CGA. *Acute vascular rejection*. Xenotransplantation 2001; 5: 169-175
- Princeteau L**. Greffe rénal. Journal of Medicine. Bordeaux 1905; 26: 549
- Robson SC**, Candinas D, Hancock WW, Wrighton C, Winkler H, Bach FH. *Role of endothelial cells in transplantation*. International Archives of Allergy and Immunology. 1995; (4): 305-322
- Robson SC**, Cooper DKC, d'Apice AJF. *Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation*. Xenotransplantation 2000; 7: 166-176
- Roger VL**. *The heart failure epidemic*. International Journal of Environmental Research and Public Health 2010; 7 (4): 1807-1830
- Rogers NJ**, Jackson IM, Jordan WJ, Hawadle MA, Dorling A, Lechler RI. *Cross-species costimulation: relative contributions of CD80, CD86, and CD40*. Transplantation 2003; 75 (12): 2068-2076
- Rollins SA**, Zhao J, Ninomiya H, Sims PJ. *Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9*. Journal of Immunology 1991; 146 (7): 2345-2351
- Roos A**, Daha MR. *Antibody-mediated activation of the classical complement pathway on xenograft rejection*. Transplantation Immunology 2002; 9: 257-270
- Rose AG**, Cooper DK. *A histopathologic grading system of hyperacute (humoral, antibody-mediated) cardiac xenograft and allograft rejection*. The Journal of Heart and Lung Transplantation 1996; 15: 804

- Rose AG**, Cooper DK. *Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection.* Xenotransplantation 2000; 7 (1): 31-41
- Roux FA**, Saï P, Deschamps JY. *Xenotransfusions, past and present.* Xenotransplantation 2007; 14 (3): 208-216
- Rubaltelli E**, Burra P, Sartorato V, Canova D, Germani G, Tomat S, Ancona E, Cozzi E, Rumiati R. *Strengthening acceptance for xenotransplantation: the case of attraction effect.* Xenotransplantation 2008; 15: 158-163
- Ryter SW**, Alam J, Choi AM. *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications.* Physiology Review 2006; 86: 583-650
- Sachs DH**. *The immunologic response to xenografts.* Institute of Laboratory Animal Resources Journal 1995; 37 (1): 16-22
- Sade RM**. *Transplantation at 100 years: Alexis Carrel, pioneer surgeon.* The Annals of Thoracic Surgery 2005; 80: 2415-2418
- Schirmer JM**, Fass DN, Byrne GW, Tazelaar HD, Logan JS, McGregor CGA. *Effective antiplatelet therapy does not prolong transgenic pig to baboon cardiac xenograft survival.* Xenotransplantation 2004; 11: 436-443
- Schmoeckel M**, Nollert G, Shahmohammadi M, Young VK, Chavez G, Kasper-König W, White DJ, Müller-Höcker J, Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Hammer C, Reichart B. *Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts.* Transplantation 1996; 62 (6): 729-734
- Schmoeckel M**, Bhatti FNK, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MJ, Goddard M, Warner RG, Langford GA, Dunning JJ, Wallwork J, White DJG. *Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model.* Williams & Wilkins 1998; 65 (12): 1570-1577
- Schmoeckel JM**. *Xenotransplantation hDAF-transgener Schweineherzen. Untersuchungen ex vivo und im Primatenmodell.* Lengerich 2000, Pabst Verlag
- Schmoeckel M**. *Xenotransplantation: die ewige Zukunft der Herztransplantation?* Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie 2010; 24 (3): 141-146
- Schulte am Esch J 2nd**, Cruz MA, Siegel JB, Anrather J, Robson SC. *Activation of human platelets by the membrane-expressed A1 domain of von Willebrand factor.* Blood 1997; 90 (11): 4425-4437

- Schulte am Esch J 2nd**, Rogiers X, Robson SC. *Molecular incompatibilities in hemostasis between swine and men-impact on xenografting*. Annals of Transplantation 2001; 6 (3): 6-12
- Schuurman H-J**, Pino-Chavez G, Phillips MJ, Thomas L, White DJG, Cozzi E. *Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors*. Transplantation 2002; 37 (7): 1146-1151
- Schuurman H-J**, Cheng J, Lam T. *Pathology of xenograft rejection: a commentary*. Xenotransplantation 2003; 10: 293-299
- Seebach JD**, Comrack C, Germana S, LeGuern C, Sachs DH, DerSimonian H. *HLA-Cw3 expression on porcine endothelial cells protects against xenogeneic cytotoxicity mediated by a subset of human NK cells*. Journal of Immunology 1997; 159 (7): 3655-3661
- Shimizu A**, Hisashi Y, Kuwaki K, Tseng Y-L, Dor FJMF, Houser SL, Robson SC, Schuurman H-J, Cooper DKC, Sachs DH, Yamada K, Colvin RB. *Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from α1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons*. The American Journal of Pathology 2008; 172 (6): 1471-1481
- Shimizu A**, Yamada K. *Histopathology of xenografts in pig to non-human primate discordant xenotransplantation*. Clinical Transplantation 2010; 24 (22): 11-15
- Siegel JB**, Grey ST, Lesnikoski BA, Kopp CW, Soares M, Schulte am Esch II J, Bach FH, Robson SC. *Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin*. Transplantation 1997, 64; 888-896
- Simioni P**, Boldrin M, Gavasso S, Seveso M, Radu C, Bulato C, Calabrese F, Cavicchioli L, Bertini D, De Benedictis GM, Besenzon F, Baldan N, Spiezio L, Plebani M, Ancona E, Cozzi E. *Effects of long-term administration of recombinant human protein C in xenograft primates*. Transplantation 2011; 91 (2): 161-168
- Smits JM**, Rahmel A, Laufer G, Meiser B. *Considerations for patients awaiting heart transplantation*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon 2010; 58 (29): 179-184
- Soares MP**, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH. *Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival*. Nature Medicine 1998; 4 (9): 1073-1077

- Soares MP**, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY, Bach FH. *Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation*. Journal of Immunology 2004; 172 (6): 3553-3563
- Sondermann P**, Huber R, Jacob U. *Crystal structure of the soluble form of the human Fcγ-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution*. The EMBO Journal 1999a; 18 (5): 1095-1103
- Sondermann P**, Jacob U. *Human Fcγ receptor IIb expressed in Escherichia coli reveals IgG binding capability*. The Journal of biological chemistry 1999b; 380: 717-721
- Sondermann P**, Kaiser J, Jacob U. *Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures*. The Journal of Molecular Biology 2001; 309: 737-749
- Sprangers B**, Waer M, Billiau AD. *Xenotransplantation: Where are we in 2008?* Kidney International 2008; 74: 14-21
- Stadlbauer V**, Stiegler P, Müller S, Schweiger M, Sereinigg M, Tscheliessnigg KH, Freidl W. *Attitude toward xenotransplantation of patients prior and after human organ transplantation*. Clinical Transplantation 2010; DOI: 10.1111/j.1399-0012.2010.01296.x
- Starzl TE**. *History of clinical transplantation*. World Journal of Surgery 2000; 24: 759-782
- Stroka DM**, Badrichani AZ, Bach FH, Ferran C. *Overexpression of A1, an NF-kappaB-inducible anti-apoptotic bcl gene, inhibits endothelial cell activation*. Blood 1999; 93 (11): 3803-3810
- Strüber M**, Lange R, Gummert JF, Beyersdorf F, Jurmann M, Schmid C, El Banayosoy A, Hoppe UC, Steinbeck G, Reichenspurner H, Liebold A, Franz WM, Ruhparwar A, Schmoekel M. *Alternatives to heart transplantation. Symposium of "The treatment of end-stage heart and lung failure" working group on October 22, 2005 in Munich*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon 2007; 55 (2): 147-167
- Stussi G**, West L, Cooper DKC, Seebach JD. *ABO-incompatible allotransplantation as a basis for clinical xenotransplantation*. Xenotransplantation 2006; 13: 390-399

- Suckfüll M**, Müdsam M, Pieske O, Enders G, Babic R, Hammer C. *Immunohistological studies of complement activation after xenogeneic perfusion of a working heart model*. Transplantation International 1994; 7 (5): 324-328
- Tazelaar HD**, Byrne GW, McGregor CGA. *Comparison of Gal and non-Gal-mediated cardiac xenograft rejection*. Transplantation 2011; 91: 968-975
- Tseng Y-L**, Kuwaki K, Dor FJMF, Shimizu A, Houser S, Hisashi Y, Yamada K, Robson SC, Awwad M, Schuurman H-K, Sachs DH, Cooper DKC. *α1,3-galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months*. Xenotransplantation 2005; 80: 1493-1500
- Unger E**. *Kidney transplantation*. Klinische Wochenschrift Berlin 1910; 47: 573-578
- van Montfoort N**, 't Hoen PA, Mansbo SM, Camps MG, Boross P, Melief CJ, Ossendorp F, Verbeek JS. *Fcy receptor IIb strongly regulates fcy receptor-facilitated T cell activation by dendritic cells*. Journal of Immunology 2012; 189 (1): 92-101
- Vegas A**. *Assisting the failing heart*. Anesthesiology Clinics 2008; 26 (3): 539-564
- Watts A**, Foley A, Awwad M, Treter S, Oravec G, Buhler L, Alwayn IP, Kozlowski T, Lambrights D, Gojo S, Basker M, White-Scharf ME, Andrews D, Sachs DH, Cooper DK. *Plasma perfusion by apheresis through a Gal immunoaffinity column successfully depletes anti-Gal antibody: experience with 320 aphereses in baboons*. Xenotransplantation 2000; 72: 1743-1752
- Werwitzke S**, Trick D, Sondermann P, Kamino K, Schlegelberger B, Kniesch K, Tiede A, Jacob U, Schmidt RE, Witte T. *Treatment of lupus-prone NZB/NZW F<sub>1</sub> mice with recombinant soluble Fcy receptor II (CD32)*. Annals of rheumatic diseases 2008; 67: 154-161
- Wittwer T**, Wahlers T. *Marginal donor grafts in heart transplantation: lessons learned from over 25 years of experience*. Transplant International 2008; 21 (2): 113-125
- Xu H**, Edwards NM, Chen JM, Kwiatkowski P, Rosenberg SE, Michler RE. *Newborn baboon serum lacks natural anti-pig xenoantibody*. Transplantation 1995; 59 (8): 1184-1194
- Yamada K**, Sachs DH. *Human anti-porcine xenogeneic T-cell-responses*. Journal of Immunology 1995; 155: 5249

- Yamada K**, Sachs DH, DerSimonian H. *Direct and indirect recognition of pig class II antigens by human T cells*. Transplantation Proceedings 1995; 27 (1): 258-259
- Yet SF**, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, Ith B, Melo LG, Zhang L, Ingwall JS, Dzau VJ, Lee ME, Perrella MA. *Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice*. Circulation Research 2001; 89 (2): 168-173
- Yu PB**, Holzknecht ZE, Bruno D, Parker W, Platt JL. *Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies: a role for IgG anti-Gal alpha1-3Gal antibodies*. Journal of Immunology 1996; 157: 5163
- Zhao Z**, Termignon JL, Cardoso J, Chéreau C, Gautreau C, Calmus Y, Houssin D, Weill B. *Hyperacute xenograft rejection in the swine-to-human donor recipient combination. In vitro analysis of complement activation*. Transplantation 1994; 57 (2): 245-249
- Zhu A**, Hurst R. *Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum*. Xenotransplantation 2002; 9 (6): 376-381
- Zhu X**, Dor FJMF, Cooper DKC. *Pig-to-non-human primate heart transplantation: immunologic progress over 20 years*. The Journal of Heart and Lung Transplantation 2007; 26: 208-210
- Zylka-Menhorn V**. *Organmangel: Die Spenderkriterien haben sich verändert*. Deutsches Ärzteblatt 2005; 102 (9): A-541/B-461/C-429

## **8. Anhang**

### **8.1. Materialienliste**

#### **Versuchstiere**

- Transgene Landrasseschweine - Laboratory of Developmental Engineering, Maiji University, Japan und Institut für Nutztiergenetik FLI, Mariensee, Neustadt, Deutschland (Gal-KO), Revivicor, Blacksburg, Virginia, USA und Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum der LMU München, Deutschland (Gal-KO/CD46), Institut für Nutztiergenetik FLI, Mariensee, Neustadt, Deutschland (Gal-KO/hHO-1).
- Paviane der Gattung *papio anubis* und *hamadryasis* – Deutsches Primatenzentrum Göttingen, Leibniz Institut Göttingen, Deutschland

#### **Tierhaltung**

- Versuchstierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums für Chirurgische Forschung der LMU München, Klinikum Großhadern, München
- Primaten – Jacket mit Verbindungssystem – Lomir Biomedical Inc.
- Groshong® - Zentralvenenkatheter – Groshong® Central Venous Catheter, Bard Access Systems, Salt Lake City, Utah, USA

#### **Anästhesie Spendertiere**

- 10 mg/kg KG Azaperon – Stresnil®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
- 10 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid – Ketavet®, Pfizer Pharmacia GmbH, Berlin, Deutschland
- peripher venöser Zugang – BD Insite-W™ 24 GA, Becton Dickinson Infusion Therapie Systems Inc., Sandy, USA
- 0,1 mg/kg KG Pancuroniumbromid i.v. – Pancuronium CuraMED®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

- Spiraltrachealtubus der Stärke 5.0 - Safety-Flex™, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland
- Beatmungsgerät – Servo Ventilator 900B, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
- Blutgasanalysengerät – Gas Analyser 348®, Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland
- 5-10 mg Midazolamhydrochlorid – Midazolam ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
- 0,1-0,2 mg Fentanylhydrogencitrat – Fentanyl Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
- 3-5 ml/h Propofol – Disoprivan® 2%, MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
- Elektrokardiogramm – Sirecust 304D, Siemens AG, Erlangen, Deutschland
- Arterielles Druckdom – Single Transducer Set, Becton Dickinson, Critical Care Systems Ltd., Singapur

### **Herztransplantation**

- 400 I.E./kg KG Heparin-Natrium 25000-ratiopharm® – ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
- Aortenwurzelkanüle 5 French – DLP® Aortic Root Cannula, Medtronic Inc., Minneapolis, USA
- Ethibond 2-0 – Ethicon Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA
- Bretschneider-Kardioplegelösung – Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland
- Ringer-Spülösung – Ringer Fresenius, Plastipur®, Fresenius Deutschland GmbH, Bad Homburg
- Waage – Mettler Feinwaage PL1200, Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz
- Biopsie-Stanze 1 mm – Kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland

## **Anästhesie Empfängertiere**

- 10 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid – Ketavet®, Pfizer Pharmacia GmbH, Berlin, Deutschland
- 2-5 mg Midazolamhydrochlorid – Midazolam ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
- High-low Endotrachealtubus 6.0 – Hi-Lo Lanz™, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland
- Beatmungsgerät – Servo Ventilator 900 C, Siemens-Elema, Schweden
- 80 mg/h Propofol – Disoprivan® 2%, MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
- 0,05-1,0 mg Fentanylhydrogencitrat – Fentanyl Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
- Elektrokardiogramm – Sirecust 960, Siemens AG, Erlangen, Deutschland
- Blutgasanalysengerät – Gas Analyser 348®, Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland
- 5 French Thermodilutionskatheter – Pulsiocarth, Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland
- Picco Monitoring Kit – Pulsiocarth, Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland
- Picco-Gerät – Pulsiocarth, Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland
- zweilumiger zentralvenöser Katheter 7 French – Two-Lumen Central Venous Catheterization Set, Arrow Deutschland GmbH, Erding, Deutschland
- 30 mg/kg KG Cefuroxim-Natrium – Cefuroxim-saar®, MIP Pharma GmbH, Blieskastel, Deutschland

## **Herzimplantation**

- 130 I.E./kg KG Heparin-Natrium 25000-ratiopharm® – ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

- ACC-6/0 Prolene – Ethicon Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA
- Defibrillator – Internal Paddles for Children, Lohmeier Medizin Elektronik GmbH & Co., München, Deutschland
- Blutstillung – Elektrotom 300B, Martin Medizin Elektronik, München, Deutschland
- 3/0 Vicryl – Ethicon Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA
- 3/0 Monocryl – Ethicon/Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA

### **Postoperatives Monitoring**

- Echokardiographie – Sonos 500, Hewlett Packard, Andover, Massachusetts, USA
- 300 ml Vollelektrolytlösung – Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- 5/ 10%ige Glucose-Lösung – G Lösung B.Braun, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- 1 mg/kg KG Metochlopramidhydrochlorid – Paspertin®, Solvay Arzneimittel GmbH, Hannover, Deutschland
- 0,1 mg/kg KG Odansetronhydrochlorid – Zofran®, GlaxoSmithKline, München, Deutschland
- 50 mg/kg KG Cefuroxim-Natrium – Cefuroxim-saar®, MIP Pharma GmbH, Blieskastel, Deutschland
- 20 mg Pantoprazol – Pantozol®, Nycomed GmbH, Konstanz, München
- 4 mg Dimentindenmaleat – Fenistil®, Novartis Consumer Health GmbH, München, Deutschland
- 0,1 mg Buprenorphin s.c. – Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
- 6 mg Metamizol-Natrium – Novaminsulfon-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
- 30 mg Tramadol – Tramal-ratiopharm® supp, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

- 40 mg Eisen-(II)-Glycin-Sulfat – Ferro-Sanol® duodenal, SANOL GmbH, Monheim, Deutschland
- 2000 IE Erythropoetin s.c. – NeoRecormon®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- Vetophos® – Bela-Pharm® GmbH, Vechta, Deutschland
- Vitamin-B-Komplex N Jenapharm® – Jenapharm GmbH, Jena, Deutschland
- Perenterol® – UCB GmbH, Monheim, Deutschland).

### **Immunsuppression**

- 1,5 mg/kg KG Anti-Thymozyten-Globulin – ATG-Fresenius S®, Fresenius HemoCare Immune Therapy GmbH, Gräfelfing, Deutschland
- 19 mg/kg KG Rituximab – MabThera®, Roche Registration Limited, Welwyn Garden City, Hertfordshire, Vereinigtes Königreich
- 0,1 mg/kg KG Tacrolimus – Prograf®, Astellas Pharma GmbH, Tokyo, Japan
- 1 mg/kg KG Sirolimus – Rapamune®, WyethPharma GmbH, Münster, Deutschland
- 0,15 mg/kg KG Methylprednisolon – Urbason soluble®, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland
- 5 mg/kg KG FcγRIIb-Rezeptor – SupreMol, Martinsried/München, Deutschland

### **Zytoimmunologisches Monitoring**

- Eppendorf-Tube
- Ficoll Solution – Biocoll Separation Solution, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- PBS
- Zentrifuge – Mikro 120, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
- Zyro-Zentrifuge – Cytospin, Shandon Elliott

## Anti-Schwein-Antikörper-ELISA

- Zentrifuge – Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland und Centrifuge 5410, Eppendorf
- Mikrotiterplatte
- Komplementfixationsverdünnner – CFD
- Inkubator – Edmund Bühler TH 15
- Baby-Rabbit-Komplement – Baby Rabbit Complement, AbD Serotec, North Carolina, USA
- Photometerplatten
- Plattenablesegerät – Tecem Spectra Rainbow, Madein, Österreich
- Computerprogramm (Novartis, Pharmaceuticals Corporation, New Jersey, USA)

## Anti- $\alpha$ Gal-Antikörper-ELISA

- Mikrotiterplatten – Nunc Polysorb 96 Well-Platten, Apogent, Roskilde, Dänemark
- Linear-B-Trisaccharid-(Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ 1(1,4)GlcNAc)-HAS-Komplexe – Dextra Labs, Reading, United Kingdom, 5 µg/ml in Karbonpuffer pH 9,6 + 4% bovines Serumalbumin
- PBS-Puffer – Dulbecco's PBS, MP Biomedicals, Solon, Ohio
- Tween 20 – Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Waschlösung aus PBS, Tween 20 und destilliertem Wasser
- 1:1000 verdünnten Peroxidase-konjugierten Antikörperlösung – *goat anti-human IgG/IgM*, Dextra Labs, Reading, United Kingdom
- Phenylenediaminedihydrochlorid – Sigma-Fast-Phenyldiamin-Kit, Sigma Fast™ Tablet Sets, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- 1 M Schwefelsäure
- Computerprogramm (Novartis, Pharmaceuticals Corporation, New Jersey, USA)

## **TNF $\alpha$ -Spiegel-Bestimmung**

- ELISA-Kit – Human TNF $\alpha$  Ready-SET-Go! ELISA Kit, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA
- Photometer

## **Pathologie**

- Gewebekleber – Tissue Tek, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Neuseeland
- 4% gepuffertes Formalin
- C4d – 1:10, Biozol, Eching, Deutschland
- IgM – 1:300, Dako, Hamburg, Deutschland
- Fibrin – 1:5500, American Diagnostica, Pfungstadt, Deutschland
- CD3+ – 1:500, ThermoScientific, Fremont, California, USA
- Histofine® Simple Stain Rat MAX PO Kit, Medac, Wedel, Deutschland
- 3-Amino-9-Ethylcarbazol – AEC, DAKO, Hamburg, Deutschland
- Ventana BenchMark®
- XT ultraView DAB Kit®, Ventana Medical Systems

## **8.2. Untersuchungsprotokoll**

Name/Tätowiernummer:

Datum der Untersuchung:

Gewicht:

Sedierung: Rompun® i.m. mg  
Ketavet® i.m. mg

Status: Neurologie:  
Eigenherz:  
Herzfrequenz: /min  
Blutdruck: mmHg  
Transplantat/  
palpatorisch (Score 0-3):  
Lunge:  
Niere/Urin:  
Abdomen/Stuhl:

EKG:

Echokardiographie:

Besonderheiten:

Medikation:

Antiemetika	Paspertin® i.v.	mg
	Zofran® i.v.	mg
Antibiotika	Cefuroxim-Natrium p.i.	mg
Analgetika	Temgesic® s.c.	mg

	Novalgin® i.m.	mg
	Voltaren® supp.	mg
Sonstiges	Fenistil® i.v.	mg
Infusionen	Vollelektrolytlösung	ml
	Glukose 5%, bzw. 10%	ml
Immunsuppressiva	Rituximab p.i.	mg (19 mg/kg; alle 7d)
	Tacrolimus p.i.	mg (nach Spiegel)
	Sirolimus i.m.	mg (nach Spiegel)
	Urbason® i.v.	mg (Ziel 0,15 mg/kg)
	FcγRIIb i.v.	mg (5 mg/kg; alle 3 d)
	ATG i.v.	mg (1,5 mg/kg für 5 d)
Bedarfsmedikation:	Tramal-ratiopharm® supp	30 mg
	Ferro-Sanol® i.v.	40 mg
	NeoRecormon® s.c.	2000 I.E.
	Vetophos® i.v.	2 Ampullen
	Vitamin-B-Komplex i.v.	1 Ampulle
	Perenterol® p.o.	2 Kapseln

### **8.3. Zytoimmunologisches Monitoring**

Klinikum der Universität München LMU  
Institut für Chirurgische Forschung – Großhadern

#### **Zytoimmunologisches Monitoring**

Name:

Datum:

Datum			
Lymphoblasten			
Aktivierte Lymphozyten			
Normale Lymphozyten			
LG-Lymphozyten			
Plasmazellen			
Monozyten			

Datum			
Myeloblasten			
Myelozyten			
Juvenile Granulozyten			
Stabförmige Granulozyten			
Eosinophile Granulozyten			
Basophile Granulozyten			

Bemerkungen:

<input type="radio"/> Kein pathologischer Befund	<input type="radio"/> V.a. bakt./fungale Infektion
<input type="radio"/> V.a. Abstoßungsreaktion	<input type="radio"/> V.a. virale Infektion

## **8.4. Abbildungsverzeichnis**

### **Abbildungen:**

<b>Abbildung 1.1: Anzahl der in Deutschland zur Herztransplantation (HTX) jährlich neu auf die Warteliste aufgenommenem Patienten im Vergleich zu der Anzahl der jährlich tatsächlich realisierten Herztransplantationen in den Jahren 1998 bis 2009.....</b>	<b>6</b>
<b>Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der Komplementkaskade.....</b>	<b>14</b>
<b>Abbildung 1.3: Zusammenfassende Darstellung xenogener Abstoßungsreaktionen und möglicher Überwindungsstrategien.....</b>	<b>24</b>
<b>Abbildung 1.4: Blockade der Bindung von Immunkomplexen an Fc-Rezeptor-tragende Zellen durch den löslichen Fc-Rezeptors FcγRIIb (Abbildung SuppreMol GmbH, Martinsried, München).....</b>	<b>25</b>
<b>Abbildung 3.1: Anastomosenverhältnisse bei heterotop abdominaler Herztransplantation..</b>	<b>37</b>
<b>Abbildung 4.1: Anti-α(1,3)Gal-Antikörperspiegel im postoperativen Verlauf.....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 4.2: Anti-Schwein-Antikörperspiegel im postoperativen Verlauf.....</b>	<b>56</b>
<b>Abbildung 4.3: Zytoimmunologisches Monitoring (ZIM).....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 4.4: TNF-α-Spiegel (pg/ml) im postoperativen Verlauf von Pavian 25, 27 und 28.</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 4.5: Interleukin-6-Spiegel (ng/ml) im postoperativen Verlauf.....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 4.6: Troponin I Ultra-Spiegel (ng/ml) im postoperativen Verlauf.....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 4.7: Leukozyten-Spiegel (G/l) im postoperativen Verlauf.....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 4.8: Hämoglobin-Spiegel (g/dl) im postoperativen Verlauf.....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 4.9: Makroskopischer Befund des Spenderherzens bei Pavian 28 nach akut vaskulärer Abstoßung.....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 4.10: Akut vaskuläre Abstoßung.....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 4.11: Akut zelluläre Abstoßung.....</b>	<b>71</b>

**Abbildung 5.1: Anastomosenverhältnisse bei heterotop thorakaler Herztransplantation.....87**

**Tabellen:**

<b>Tabelle 1.1: Geschichte der xenogenen Herztransplantation. Überlebenszeiten der seit 1964 bislang durchgeführten Übertragungen tierischer Spenderherzen in den Menschen.....</b>	<b>10</b>
<b>Tabelle 1.2: Überlebenszeiten und Studienendpunkte unter Einsatz verschiedener Immunsuppressionsprotokolle nach orthotoper Xenotransplantation hDAF-transgener Schweine in Paviane (n = 12).....</b>	<b>27</b>
<b>Tabelle 3.1: Spender-Empfänger-Konstellationen in Bezugnahme auf die unterschiedlichen transgenen Merkmale der Spenderschweine.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle 3.2: Tägliche klinisch-chemische Diagnostik.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 3.3: Das immunsuppressive Regime.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabelle 4.1: Transplantatüberlebenszeiten und Studienendpunkte nach heterotop abdominaler Xenotransplantation ein- und mehrfach-transgener Spenderherzen in Paviane (n = 11).....</b>	<b>50</b>
<b>Tabelle 4.2: Herzgewicht [g] vor Implantation und nach Explantation.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabelle 4.3: Endothelialer Expressionsnachweis der Transgene hDAF, TRAIL, CD46 und des α(1,3)Gal-Epitopes nach Explantation der Spenderherzen.....</b>	<b>65</b>

## 8.5. Abkürzungsverzeichnis

ACXR	akut zelluläre xenogene Abstoßungsreaktion
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APA	Anti-Pig-Antikörper
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
AUC	<i>area under the curve</i>
AVXR	akut vaskuläre xenogene Abstoßungsreaktion
CMV	Cytomegalie-Virus
CyA	Cyclosporin A
CyP	Cyclophosphamid
CXR	chronisch xenogene Abstoßungsreaktion
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DXR	<i>delayed xenograft rejection</i>
EIA	extrakorporale Immunadsorption
EC	Endothelzelle
Gal-KO	$\alpha(1,3)$ Gal-knockout
FKBP-12	<i>FK-binding protein-12</i>
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion
hDAF	<i>human decay accelerating factor</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
hHO-1	humane Hämoxigenase-1
hMCP	<i>human membrane cofactor protein</i>
hTM	humanes Thrombomodulin
HTX	Herztransplantation
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
i.m.	intramuskulär

IS	Immunsuppression
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif</i>
i.v.	intravenös
KIR	<i>killer cell immunoglobulin like receptor</i>
LGL	<i>large granular lymphocytes</i>
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
Met	Methylprednisolon
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MMF	Mycophenolat Mofetil
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PERV	porcines endogenes Retrovirus
p.i.	per infusionem
PNAK	präformierte natürliche Antikörper
p.o.	per os
PRBC	<i>pig red blood cell</i>
Rtx	Rituximab
s.c.	subkutan
sFCR	löslicher Fc-Rezeptor
Sir	Sirolimus
Tac	Tacrolimus
TF	<i>tissue factor</i>
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRAIL	<i>TNFa-related apoptosis inducing ligand</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
XR	xenogene Abstoßungsreaktion
ZIM	zytoimmunologisches Monitoring

## **9. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Bruno Reichart danke ich für die Möglichkeit dieser Forschungsarbeit und für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. med. Paolo Brenner danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung und die Durchsicht meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Walter-Brendel-Instituts für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und für manche organisatorische Hilfestellung. Vielen Dank an Frau Silvia Münzing für den Beistand bei der Anfertigung und Auswertung des zytoimmunologischen Monitorings. Der gleiche Dank gilt Frau Gudrun Höbel, die vor ihrer Pensionierung noch für jede Frage ein offenes Ohr hatte.

Frau Antje Uhlig danke ich für die tägliche Bereitstellung ihres Arbeitsplatzes, für die Einarbeitung in die Durchführung der Antikörper-ELISA, für ihr ermutigendes Vertrauen und für die seelische Unterstützung.

Vielen Dank an alle Tierpfleger der Tierstallungen des Walter-Brendel-Institutes für die umfangreiche und liebevolle Versorgung.

Herrn Dr. med. Andreas Bauer möchte ich nicht nur für die Durchführung der Primatenarkosen danken, sondern auch für die produktive Unterstützung und die Förderung meines Vorankommens.

Auch danke ich meiner Mitstreiterin und Freundin Ioana Stanescu für viele konstruktive Stunden und für ihre verlässliche Hilfe.

Zum Schluss danke ich meiner Mutter Barbara Loewenthal für Ihre stetige Unterstützung und Ermutigung während des Studiums und vor allem darüber hinaus.