

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

---

**Die protektive Wirkung von Quercetin-3-glucuronid bei  
xenogener Herztransplantation im ex vivo  
Perfusionsmodell**

---

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

vorgelegt von  
Regina Elisabeth Ebert  
aus  
Fulda

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Bauer

Mitberichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Michael Schmoeckel  
Herr Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Lederer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1 Relevanz der Xenotransplantation für die Herztransplantationsmedizin . .	11
1.1.1 Problematik des Organspendemangels . . . . .	11
1.1.2 Definition und Entwicklung der Xenotransplantation . . . . .	13
1.1.3 Das Schwein als Spender für die Xenotransplantation . . . . .	14
1.2 Hyperakute Abstoßungsreaktion . . . . .	15
1.3 Ischämie-/Reperfusionsschaden . . . . .	18
1.4 Working-Heart-Modell . . . . .	19
1.5 Flavonoide . . . . .	20
1.5.1 Wirkungsmechanismen von Flavonoiden . . . . .	22
1.5.2 Spezifische Wirkungsmechanismen von Quercetin-3-glucuronid .	24
1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit . . . . .	27
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1 Versuchsgruppen . . . . .	28
2.2 Operatives Vorgehen . . . . .	28
2.2.1 Anästhesie . . . . .	28
2.2.2 Operation . . . . .	29
2.2.3 Herzpräparation . . . . .	31

2.3	Working-Heart-Modell . . . . .	32
2.3.1	Aufbau . . . . .	34
2.3.2	Perfusat . . . . .	35
2.4	Versuchsablauf . . . . .	37
2.5	Messparameter . . . . .	38
2.5.1	Funktionsparameter . . . . .	38
2.5.1.1	Hämodynamik . . . . .	38
2.5.1.2	O <sub>2</sub> -Verbrauchskalkulation . . . . .	39
2.5.2	Blutgasanalyse . . . . .	40
2.5.3	Hämatologie . . . . .	40
2.5.4	Laborparameter . . . . .	40
2.5.4.1	Myokardläsion . . . . .	40
2.5.4.2	Anti-pig-Antikörper . . . . .	41
2.5.4.3	IL-6 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) . . . . .	41
2.5.5	Herzgewicht . . . . .	42
2.6	Statistik . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Antikörperbindung . . . . .	44
3.2	Leukozytenzahl . . . . .	45
3.3	Thrombozytenzahl . . . . .	46
3.4	Entzündungsmediatoren . . . . .	46
3.5	Herzgewicht . . . . .	48
3.6	Hämodynamische Parameter . . . . .	49
3.6.1	Mittlerer arterieller Blutdruck . . . . .	49
3.6.2	Links-atrialer Druck . . . . .	50
3.6.3	Herzzeitvolumenindex . . . . .	50
3.6.4	Schlagarbeitsindex . . . . .	51
3.7	Myokardläsion . . . . .	52
3.8	Myokardialer Metabolismus . . . . .	54
3.8.1	Venöse Laktatkonzentration . . . . .	54

3.8.2	Arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz . . . . .	55
3.8.3	Koronarer Blutflussindex . . . . .	56
3.8.4	Myokardiale Effizienz . . . . .	57
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1	Einführung . . . . .	59
4.2	Wirkung von Quercetin-3-glucuronid im xenogenen Working-Heart-Modell	59
4.2.1	Immunologische und inflammatorische Reaktion . . . . .	59
4.2.2	Herzfunktion . . . . .	63
4.2.3	Myokardläsion und myokardialer Metabolismus . . . . .	65
4.3	Limitationen des verwendeten Working-Heart-Modells . . . . .	67
4.4	Relevanz von Quercetin-3-glucuronid für die Xenotransplantation . . . .	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>92</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>93</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ABF	arterieller Blutfluss
AHXR	acute humoral xenograft rejection
APA	Anti-pig-Antikörper
AVDO <sub>2</sub>	arteriovenous difference in oxygen content (arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz)
CaO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffgehalt
CBF	koronarer Blutfluss
CBFI	koronarer Blutflussindex
CK-MB-Masse	Creatinkinase-MB-Masse
COX-2	Cyclooxygenase 2
CvO <sub>2</sub>	venöser Sauerstoffgehalt
daP	diastolic arterial pressure (diastolischer arterieller Blutdruck)
dPmax	maximum differential pressure (maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit)
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Gal-AK	Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper
Gal-KO	$\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase-Knockout-Schweine
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion
Hb	Hämoglobin
hCRP	humanes Komplementregulatorprotein
HI	Herzindex
HF	Herzfrequenz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1 $\beta$ , 6, 8	Interleukin 1 $\beta$ , 6, 8
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LAP	left atrial pressure (links-atrialer Druck)
I/R	Ischämie-/Reperfusion
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
maP	mean arterial pressure (mittlerer arterieller Blutdruck)
ME	myokardiale Effizienz
MVO <sub>2</sub>	myocardial oxygen consumption (myokardialer Sauerstoffverbrauch)

NO	Stickstoffmonoxid
non-Gal-AK	non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PNAK	präformierte natürliche Antikörper
pO <sub>2</sub> art	arterieller Sauerstoffpartialdruck
pO <sub>2</sub> ven	venöser Sauerstoffpartialdruck
QG	Quercetin-3-glucuronid = Quercetinglucuronid
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
SO <sub>2</sub> art	arterielle Sauerstoffsättigung
SO <sub>2</sub> ven	venöse Sauerstoffsättigung
saP	systolic arterial pressure (systolischer arterieller Blutdruck)
SC-PVO	sanwich cultures of postcapillary venular origin (Sandwich-Kultur von Endothelzellen postkapillärer Venolen und Perizyten)
SWI	stroke work index (Schlagarbeitsindex)
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Daten von Eurotransplant zur Entwicklung der Herztransplantationen in den letzten 15 Jahren . . . . .	12
1.2	Strukturformel von Flavan . . . . .	21
1.3	Strukturformel von Quercetin . . . . .	22
1.4	Strukturformel von Quercetin-3-glucuronid . . . . .	24
2.1	Hals- und Thoraxpräparation . . . . .	30
2.2	Herz in situ . . . . .	31
2.3	Präpariertes Herz vor Einbau in das Working-Heart-Modell . . . . .	32
2.4	Versuchsaufbau . . . . .	33
2.5	Herz in Working-Heart-Modell . . . . .	33
2.6	Schematische Darstellung des Working-Heart-Modells . . . . .	34
2.7	Versuchsablauf . . . . .	37
3.1	Anti-pig-Antikörper (APA) . . . . .	44
3.2	Leukozyten (WBC) . . . . .	45
3.3	Thrombozyten (Plt) . . . . .	46
3.4	Porcines Interleukin 6 (IL-6) . . . . .	47
3.5	Humanes Interleukin 6 (IL-6) . . . . .	47
3.6	Herzgewichtzunahme . . . . .	48
3.7	Mittlerer arterieller Druck (maP) . . . . .	49
3.8	Herzzeitvolumenindex (HI) . . . . .	50
3.9	Schlagarbeitsindex (SWI) . . . . .	51
3.10	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) . . . . .	52



3.11 Laktatdehydrogenase (LDH) . . . . .	53
3.12 Creatinkinase-MB-Masse (CK-MB) . . . . .	54
3.13 Venöse Laktatkonzentration . . . . .	55
3.14 Arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz (AVDO <sub>2</sub> ) . . . . .	56
3.15 Koronarer Blutfluss Index (CBFI) . . . . .	57
3.16 Myokardiale Effizienz (ME) . . . . .	58

# Tabellenverzeichnis

1.1	Durchgeführte Xenotransplantationen . . . . .	14
2.1	Beeinflussbare Parameter des Perfusats . . . . .	36

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Relevanz der Xenotransplantation für die Herztransplantationsmedizin

#### 1.1.1 Problematik des Organspendemangels

Mit der ersten erfolgreichen Herztransplantation im Dezember 1967 schaffte Christiaan Neethling Barnard im Groote Schuur Hospital in Kapstadt einen wichtigen Durchbruch für die Transplantationsmedizin [1]. Zu diesem Zeitpunkt war die Überlebensrate der Patienten sehr gering und es gab noch kein effektives Immunsuppressivum, welches diese gesteigert hätte. Diese Situation änderte sich durch die Entdeckung des Calcineurininhibitors Cyclosporin A [2, 3]. Nach dessen Einführung im Jahr 1983 kam es zu einem Anstieg der jährlich durchgeführten Herztransplantationen. Im Laufe der Zeit etablierte sich die Herztransplantation zu einem Standardverfahren für die Behandlung des terminalen Herzversagens. Dieser positive Entwicklungsverlauf wird allerdings durch die enorme Problematik des Organspendemangels limitiert.

Die Daten von Eurotransplant (Abbildung 1.1), eine Kooperation von acht europäischen Staaten, verdeutlichen dies. Hiernach gab es im Jahr 2013 1053 Registrierungen von Patienten auf der Warteliste für eine Herztransplantation. Von den gelisteten Patienten erhielten in diesem Jahr nur 581 ein neues Herz. Die Mortalitätsrate der gelisteten Patienten, die keine Herztransplantation erhielten, lag bei 21,2%.

Im Bereich der medikamentösen Therapie zur Behandlung des terminalen Herzversagens

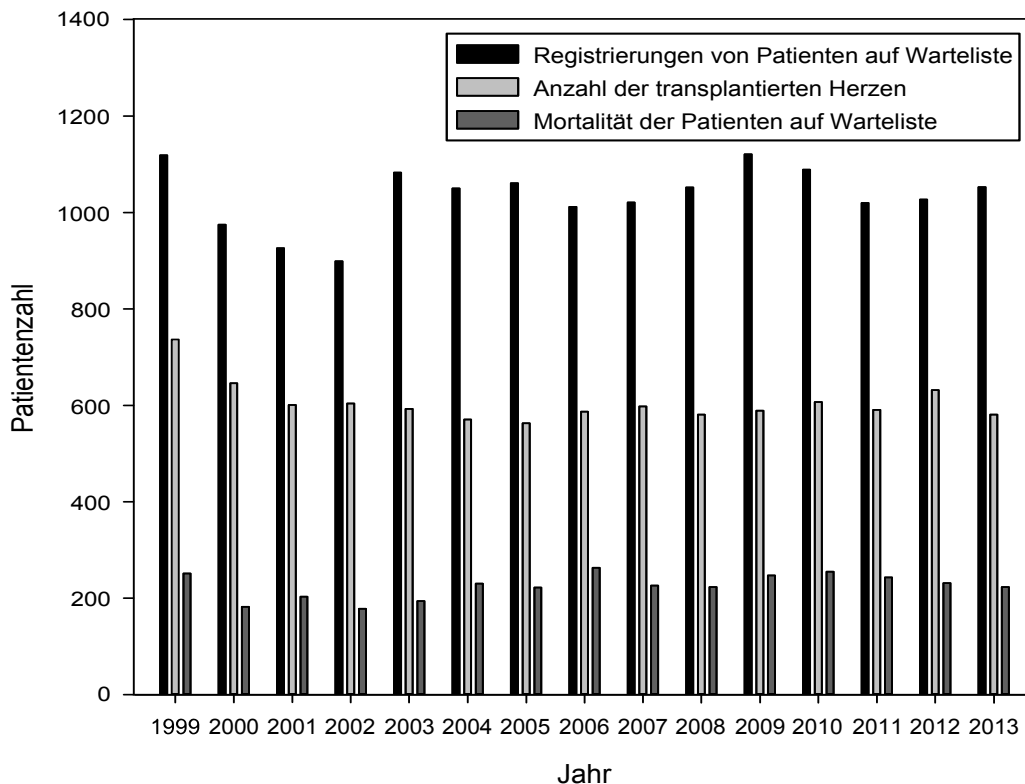


Abbildung 1.1: Daten von Eurotransplant zur Entwicklung der Herztransplantationen in den letzten 15 Jahren

gab es zum Beispiel durch den Einsatz von ACE-Hemmern,  $\beta$ -Blockern und Aldosteron-Antagonisten große Fortschritte. Auch die Entwicklungen der Kardiochirurgie im Bereich Revaskularisations-/ und Klappenchirurgie sowie der Einsatz von Herzunterstützungssystemen, tragen zu verbesserten Therapieerfolgen bei [4]. Nach Ausschöpfung der vorgenannten Therapien steht neben dem Einsatz von Kunstherzen langfristig nur die Herztransplantation als ultima ratio zur Verfügung.

Dem Problem des Organmangels versucht man auf unterschiedlichen Wegen entgegenzuwirken. Der erste und scheinbar einfachste Schritt ist der Versuch, den Anteil potentieller Organspender mit Hilfe von Transplantationsgesetzen zu erhöhen. Man findet hierzu in einigen Ländern, wie zum Beispiel Österreich und Spanien, die sogenannte Widerspruchsregelung, welche besagt, dass jeder Bürger bei einem ärztlich festgestellten Hirntod als Organspender gelten kann, solange er zu Lebzeiten diesem nicht widersprochen hat. In Deutschland trat am 01. November 2012 eine Änderung des Transplantationsgesetzes in Kraft, das die Entscheidungsregelung einführt und die zuvor gültige erweiterte Zustimmungsregelung ablöst. Nach der neuen Gesetzeslage wird jeder Bürger ab Vollendung des

16. Lebensjahres schriftlich durch die Krankenkassen über Organspende informiert und befragt, ob er einer Organspende zustimmt oder diese ablehnt. Eine Entscheidungspflicht besteht für den Bürger nicht. Von dieser Maßnahme erhofft man sich in Deutschland eine höhere Spendebereitschaft. Es ist jedoch fraglich, ob dadurch der Mangel an Spenderorganen ausreichend gedeckt ist.

Als weiterer Schritt, dem Problem des Organmangels bei der Herztransplantation zu begegnen, gilt der Einsatz von Kunstherzen und hierbei insbesondere von Left Ventricle Assistent Devices. Diese werden heute vor allem als Überbrückung genutzt, bis ein geeignetes Spenderorgan zur Verfügung steht oder bis eine Aufnahme auf die Transplantationsliste erfolgt [5, 6]. Einen dauerhaften Ersatz von biologischen Herzen kann man auf diese Weise allerdings nur in Einzelfällen erwarten.

Auf der Suche nach weiteren Alternativen zur Minimierung des Organmangels schreibt die Forschung der Xenotransplantation mit ihrem potentiell uneingeschränkten Angebot an Organen einen sehr großen Stellenwert zu.

### **1.1.2 Definition und Entwicklung der Xenotransplantation**

Der Begriff Xenotransplantation setzt sich aus dem Griechischen Wort *ξένος* (*xénos*: Fremder) und dem Lateinischen *transplantare* (verpflanzen) zusammen und beschreibt die Übertragung von Zellen oder Gewebe zwischen Individuen verschiedener Spezies. Um hierbei Unterschiede in der Immunreaktion zwischen phylogenetisch eng verwandten und weit entfernten Individuen zu verdeutlichen, prägte Roy Yorke Calne 1970 die Begriffe konkordant und diskordant [7]; beispielsweise bedeutet konkordant eine Transplantation zwischen Mensch und Pavian und diskordant eine Transplantation zwischen Mensch und Schwein.

In der Literatur wird von zehn durchgeführten xenogenen Herztransplantationen berichtet, bei denen Menschen die Organempfänger waren. Den ersten Transplantationsversuch unternahm 1964 James Hardy, indem er einem 68 Jahre alten Mann, der in Folge einer ischämischen Kardiomyopathie in einen kardiogenen Schock verfiel, ein Schimpansenherz transplantierte. Der Patient starb allerdings nach 2 Stunden. Der Autor machte das für den Patienten zu kleine Schimpansenherz und die schlechten Ausgangsbedingungen

<b>Jahr</b>	<b>Operateur</b>	<b>Empfänger</b>	<b>Spender</b>	<b>Überleben</b>
1964	Hardy [8]	68 Jahre ♂	Schimpanse	2 h
1968	Ross [10, 3]	48 Jahre ♂	Schwein	4 min
1968	Cooley [11]	48 Jahre ♂	Schaf	10 min
1969	Marion [10, 3]	♀	Schimpanse	sofortige Abstoßung
1977	Barnard [12]	25 Jahre ♀	Pavian	6 h
1977	Barnard [12]	60 Jahre ♂	Schimpanse	4 d
1984	Bailey [9]	14 Tage ♀	Pavian	20 d
1992	Religa, Czaplicki [10, 3]	31 Jahre ♂	Schwein	23 h
1996	Baruah (unveröffentlicht) [10, 3]	31 Jahre ♂	Schwein	<24 h

Tabelle 1.1: Durchgeführte Xenotransplantationen

für das frühe Herzversagen verantwortlich. In der pathologischen Auswertung waren Zeichen einer immunologischen Reaktion sichtbar [3, 8].

Im Jahr 1984 führte Leonard L. Bailey die bis heute erfolgreichste kardiale Xenotransplantation durch. Er verpflanzte einem zwölf Tage alten Baby, das mit einem hypoplastischen Linksherzsyndrom geboren wurde, das Herz eines Pavians. Trotz der guten Bedingungen, wie der Verfügbarkeit von Cyclosporin A, der noch immunologischen Unreife des Babys und der passenden Herzgröße, starb das Mädchen 20 Tage nach der Transplantation an einer Abstoßungsreaktion [3, 9].

Die übrigen xenogenen Herztransplantationen beim Menschen blieben jedoch mit Überlebenszeiten von wenigen Stunden bis Tagen ohne großen Erfolg.

Wie aus Tabelle 1.1 ersichtlich ist, wurden in der klinischen Forschung zur Xenotransplantation bisher unterschiedliche Spezies als Spender verwendet: humane und nicht-humane Primaten, Schafe und Schweine. Es stellt sich nun die Frage, welche Spezies am geeignetsten als Organspender für die Xenotransplantation ist.

### 1.1.3 Das Schwein als Spender für die Xenotransplantation

Seit einigen Jahren wird das Schwein aufgrund vieler positiver Aspekte als der ideale Organspender für die Xenotransplantation angesehen [10, 13]. Gerade im kardiovaskulären System besteht aus anatomischer und physiologischer Sicht eine hohe Übereinstimmung zwischen dem Schwein und dem Menschen [13]. Für die xenogene Herztransplantation sind die in beiden Spezies ähnlichen Herzfunktionsparameter von großer Wichtigkeit [10, 13, 14]. Um dem Anspruch gerecht zu werden Herzen mit geeigneter Größe

und Effizienz für den Menschen zur Verfügung zu haben, werden spezielle Minischweine gezüchtet, die ein Maximalgewicht von 135 kg erreichen. Für die Reproduktion ist von Vorteil, dass sich Schweine in einfacher Haltung gut züchten lassen und in hoher Anzahl verfügbar sind. Die Zucht wird dahingehend erleichtert, dass die Tiere innerhalb von 6 Monaten geschlechtsreif sind, die Tragezeit nur 114 Tage beträgt und bei einem Wurf 5-12 Nachkommen entstehen [10]. Dies bringt auch den Vorteil, in relativ kurzer Zeit genetische Modifikationen vornehmen zu können, die den Erfolg der Xenotransplantation positiv beeinflussen.

Die mit einer Transplantation einhergehende Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten auf den Menschen wird bei phylogenetisch weiter entfernten Spezies geringer gesehen als bei eng verwandten [15, 10]. Dieses Risiko kann bei Schweinen weiter minimiert werden, weil sie sich gut in pathogenfreien Bereichen züchten lassen. Zur Diskussion steht in diesem Zusammenhang insbesondere die mögliche Infektion mit porcinen endogenen Retroviren, die bis heute allerdings nur in vitro [16], nicht aber in vivo [17] nachgewiesen werden konnte [18].

Die ethischen Bedenken sind bei der Verwendung von Schweineorganen eher gering einzuschätzen, da es zum einen zur Routine geworden ist Menschen operativ biologische Herzklappen von Schweinen einzusetzen und zum anderen, da Schweine in hohem Maße als Nutztiere und Nahrung für den Menschen dienen. Zudem belegen verschiedene Studien, dass es in der Bevölkerung eine hohe Akzeptanz für die Transplantation von xenogenen Organen gibt [19, 20].

Die benannten Vorteile des Schweins als Organspender dürfen allerdings nicht unberücksichtigt lassen, dass es durch die Diskordanz beider Spezies zu starken immunologischen Reaktionen im menschlichen Organismus kommt.

## **1.2 Hyperakute Abstoßungsreaktion**

Im xenogenen Transplantationsmodell kommt es bei Kontakt des Empfängerblutes mit dem Spenderorgan innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR), die das Organ schädigen und dessen schnelles Versagen herbeiführen kann. Eine Methode die Vorgänge der HAR genauer zu untersuchen ist das

Working-Heart-Modell, in welchem Schweineherzen unter möglichst physiologischen Bedingungen *ex vivo* mit humanem Blut perfundiert werden.

Auslöser für die HAR sind präformierte natürliche Antikörper (PNAK) im Blut des Empfängers, die sich hauptsächlich gegen  $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$ -Kohlenhydratverbindungen auf dem Endothel des Transplantats richten. PNAK finden sich bei allen Menschen, Menschenaffen und Altweltaffen, da diese Spezies im Laufe der Evolution die  $\alpha 1,3$ -Galaktosyltransferase, welche für die Bildung der Kohlenhydratreste verantwortlich ist, verloren haben [21]. Ähnlich den Agglutininen des ABO-Blutgruppensystems entstehen die PNAK in der frühen Postnatalphase als Reaktion auf die natürliche Besiedelung des Darms mit Bakterien [22]. Neben den  $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$ -Antikörpern (Gal-AK) sind zusätzlich non- $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$ -Antikörper (non-Gal-AK) von Bedeutung für die Xenotransplantation. Es existiert eine Vielzahl dieser non-Gal-AK, deren unterschiedliche Antigene noch nicht völlig spezifiziert sind. Im Vordergrund scheinen Antigene von Proteinen und Carbohydraten zu stehen [23, 24, 25], deren Bindung vermehrt Schlüsselfunktionen des Endothels blockiert. Beispiele für inzwischen beschriebene Antigene sind: Hitzeschockproteine, Annexine, Regulatorproteine des Komplementsystems, Fibronectin, Vimentin, endothelialer Protein C Rezeptor und Glykanreste der  $\beta$ -1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase 2, N-Glycoloyl-neuraminic acid (NeuGc), N-Acetyl-neuraminic acid (NeuAc) [26, 27, 28, 23]. In neueren Untersuchungen wurde deutlich, dass non-Gal-AK in Abwesenheit von Gal-AK eine HAR auslösen können [29].

Durch die Bindung von PNAKs an das Endothel wird hauptsächlich der klassische Weg des Komplementsystems durchlaufen, indem sich der Komplementfaktor C1q an die exponierte Fc-Region des Antikörpers heftet. Dadurch erfolgt die Aktivierung der Serin-Protease C1rs, welche aus den Komplementfaktoren C2 und C4 die aktiven Faktoren C2b und C4b, sowie das Anaphylatoxin C4a abspaltet. Anschließend kommt es durch Anlagerung von C4b an das Endothel und kovalente Bindung von C2b zur Bildung eines C4b2b-Komplexes. Dieser wird auch als C3-Konvertase des klassischen Weges bezeichnet und spaltet von C3 das aktive C3b und das Anaphylatoxin C3a ab. Durch Verbindung von C3b mit dem C4b2b-Komplex entsteht die C5-Konvertase (C4b2b3b-Komplex). Die Umwandlung von C5 zu C5b und C5a (Anaphylatoxin) ist das Signal zur Bildung des



Membranangriffkomplexes (MAC), der durch Anlagerung von C9 an den C5bC6C7C8-Komplex entsteht. Der Membranangriffkomplex verursacht eine Pore in der Zellmembran der Endothelzellen, wodurch diese lysiert wird. Neben dem klassischen Weg des Komplementsystems gibt es den antikörperunabhängigen alternativen Weg, der durch spontane Hydrolyse des instabilen Komplementfaktors C3 in C3a und C3b initiiert wird. Bei Kontakt von C3b mit pathogenen Oberflächen kommt es zur Bildung der C3-Konvertase des alternativen Weges. Von diesem Schritt an wird die Komplementkaskade wie im klassischen Weg durchlaufen und endet mit der Bildung des Membranangriffkomplexes.

Neben der direkten Zellyse kommt es im Rahmen der HAR zum Verlust der endothelialen Barrierefunktion [30], die im intakten Zustand den direkten Kontakt von Blutbestandteilen mit subendothelialen Strukturen sowie deren Übertritt in das Interstitium verhindert. Bereits nach 10 Minuten entstehen im xenogenen Modell interzelluläre Lücken im Bereich des Endothels [31]. Die Endothelzellen verformen sich und ziehen sich durch Umbauvorgänge des Zytoskeletts zusammen, sodass die Dichtigkeit der Barriere herabgesetzt wird [30, 32]. Als Folge kommt es zum Übertritt von Flüssigkeit und Blutbestandteilen in das Myokard [30, 32], wodurch es zu ausgedehnten ödematösen Veränderungen des Gewebes kommt.

Bei der Schädigung des Endothels werden subendotheliale Strukturen, wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor und Gewebethromboplastin freigelegt, die beim Kontakt mit Blut die Aktivierung der Blutgerinnung und Thrombozytenaggregation nach sich ziehen [33]. Zusätzlich zu diesen strukturellen Veränderungen kommt es zu einem Zusammenbruch der endothelialen hämostatischen Balance, indem das beschädigte Endothel einen Wechsel seiner antikoagulatorischen zu prokoagulatorischen Eigenschaften durchläuft [14]. Durch den Verlust von antikoagulativen Substanzen, wie Heparansulfat [34], Antithrombin III, Thrombomodulin, Tissue factor pathway inhibitor [35] und Superoxiddismutase sowie die Bildung von Anaphylotoxinen, wird eine Plättchenaggregation und Leukozytenadhäsion auf dem Endothel initiiert [14, 36].

Infolge dieser Veränderungen kommt es zu Thrombosen [37], die sich initial vorwiegend als venöse bzw. venoläre Thrombosen darstellen [38]. Durch den hierdurch bedingten Blutstau in den Kapillaren entstehen Hämorrhagien, welche zuerst in der inneren Hälfte

des Ventrikelmyokards, später aber auch ausgedehnt im Interstitium zu finden sind [38]. Die negativen Veränderungen in der Myokardperfusion mit ischämischen Gewebsveränderungen, sowie Hämorrhagien und Flüssigkeitseinlagerungen [37] schädigen das Myokard in hohem Maße, sodass es zum Verlust der Organfunktion kommt. Histologisch lässt sich neben den beschriebenen Veränderungen eine massive Myozytennekrose erkennen [38]. Nach einer HAR erscheinen die Herzen makroskopisch zyanotisch mit epikardialen fleckigen Einblutungen sowie geschwollen und ödematös verändert [38]. Neben diesen Vorgängen der HAR ist bei Untersuchungen zur Perfusion eines Schweineherzens mit humanem Blut zusätzlich der Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R) von Bedeutung. In beiden Fällen wird das Gefäßendothel als Grenze und Kontaktfläche zwischen Blut und Gewebe beträchtlich geschädigt.

### **1.3 Ischämie-/Reperfusionsschaden**

Zu Reperfusionsschäden kommt es im Rahmen einer Transplantation, wenn ein längere Zeit ischämisches Organ wieder mit Blut perfundiert wird. In der Herztransplantation beginnt die ischämische Phase mit dem Klemmen der Aorta im Spender und endet mit der Reperfusion des Herzens im Empfänger.

Das vaskuläre Endothel ist in Bezug auf Reperfusionsschäden sehr empfindlich [39]. Es entsteht eine mikrovaskuläre Dysfunktion mit einer verstärkten Permeabilität des Endothels [40] und damit verbunden einem vermehrten Austritt von Flüssigkeit und Blutbestandteilen in das Gewebe. Hinzu kommt eine direkte Zellschädigung, die sich durch Endothelzellschwellung [40] und Apoptose deutlich macht. Die hierdurch entstehende Störung der Mikrozirkulation wird weiter verstärkt, indem es durch den Verlust von NO und die Ausschüttung von vasoaktiven Stoffen, wie Endothelin, zum Überwiegen von vasokonstriktiven Eigenschaften kommt [41, 39]. Die beeinträchtigte Versorgung des Gewebes hat eine Myokardschädigung zur Folge, welcher sich negativ auf die Herzfunktion auswirkt.

Durch Aktivierung des Endothels kommt es zur Expression von Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) und E-Selektin [33, 39], die innerhalb von Minuten eine Bindung von Leu-

kozyten an das Endothel bewirken [42] und zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen. Vergleichbar mit einer lokalen Entzündungsreaktion kommt es zur Extravasation von neutrophilen Granulozyten [43], zur Aktivierung des Komplementsystems [44] und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , 6, 8) [33, 39]. Durch das Überwiegen von prothrombotischen Eigenschaften entstehen thrombotische Gefäßverschlüsse, durch welche die Mikrozirkulation weiter beeinträchtigt wird.

Während der ischämischen Phase wird infolge der verminderten Sauerstoffzufuhr im Herzen ein anaerober Metabolismus induziert, der zu einer verstärkten Laktatproduktion führt. Eine während der Reperfusion persistierende Laktatausschüttung deutet auf eine inadäquate Protektion des Myokards und eine verspätete Erholung des normalen aeroben Metabolismus hin. Beim Herzen steht eine ventrikuläre Dysfunktion in Zusammenhang mit einer persistierenden Laktatproduktion [41, 45].

Im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R) kommt es zudem zur Bildung freier Radikale, insbesondere von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxidanionen, Wasserstoffperoxiden und Hydroxylradikalen [41]. Diese entstehen in den ersten Minuten der Reperfusion eines zuvor ischämischen Gewebes [41] und sind in der Lage verschiedenste Strukturen der Zelle, wie Zellmembran, Proteine und DNA, zu schädigen. Dies hat negative Auswirkungen auf die Intaktheit der Endothelfunktion. ROS werden hauptsächlich von Enzymen gebildet, die Reduktions- oder Oxidationsreaktionen in der Zelle katalysieren. Beim I/R-Schaden spielen hierbei besonders die Xanthinoxidase [46], die NADPH-Oxidase [47] und Enzyme des mitochondrialen Elektronentransports [46] eine wichtige Rolle.

Bei der I/R kommt es ebenso wie bei der HAR zur Schädigung der Gefäßendothelien und des Organgewebes. Um die Auswirkungen dessen näher untersuchen zu können, ist der Einsatz eines Modells zur *ex vivo* Perfusion von Schweineherzen mit humanem Blut sinnvoll.

## 1.4 Working-Heart-Modell

Das Working-Heart-Modell ist ein erstmals von Forty et al. [48] beschriebenes *ex vivo* Perfusionsmodell, welches die Untersuchung der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR)

und des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R) an xenoperfundierte Herzen ermöglicht. Durch die Konstruktion als Links-Herz-Belastungssystem kann insbesondere die Funktion des linken Herzens beurteilt werden. Aufgrund der eigenständigen Kontraktionen des Herzens ist dieses in der Lage die Perfusion des Systems und der Koronararterien aufrechtzuerhalten und dadurch seine eigene Versorgung sicherzustellen.

Am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München wurde das System nachgebaut und weiterentwickelt. Es hat sich ebenso wie bauähnliche Modelle durch seinen standardisierten Aufbau und die damit verbundene gute Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen bei Untersuchungen zur Xenotransplantation über Jahre bewährt [49, 50, 51, 52].

Im Working-Heart-Modell kann bei den Versuchen eine kontinuierliche Messung von hämodynamischen und laborchemischen Parametern erfolgen. Durch den Einsatz von Herzen nicht-transgener und transgener Tiere, sowie durch den Zusatz verschiedener Substanzen im Perfusat besteht außerdem die Möglichkeit die Versuchsbedingungen zu variieren. Transgene Herzen stammen insbesondere von Tieren, bei welchen eine Modifikation von Genen durchgeführt wurde, die für die Problematik der Antikörperbindung und Komplementaktivierung im Rahmen der HAR verantwortlich sind. Hierzu zählen Gene, die der Expression von  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase und humanen Komplementregulatorproteinen (hCRP) dienen [53, 54, 55, 56, 57, 58]. Um die Antikörperbindung und die Blutgerinnung bei Versuchen zur Xenotransplantation zu beeinflussen, wurden bereits Substanzen, wie das  $\alpha$ -Gal-Analogon GAS914 oder der Thrombozytenaggregationshemmer Tirofiban im Perfusat getestet [59, 60]. Für die Untersuchungen zur HAR und I/R an xenoperfundierte Herzen, sind insbesondere Stoffe mit antithrombotischen, antiinflammatorischen, antioxidativen und gewebs- bzw. endothelprotektiven Eigenschaften von Relevanz.

## 1.5 Flavonoide

In der Xenotransplantation ist sowohl bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) als auch beim Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R) das Gefäßendothel der Angriffspunkt der schädigenden Einflüsse. Um das Endothel zu schützen ist der Einsatz von Substanzen

sinnvoll, die endothelprotektive Eigenschaften aufweisen. Diese Eigenschaften werden für die Stoffklasse der Flavonoide beschrieben.

Im Jahr 1936 entdeckte Albert Szent-Györgyi erstmals die Stoffklasse der Flavonoide. In Versuchen zeigten diese eine Verringerung der Permeabilität von Kapillärwänden, was ihren Entdecker dazu verleitete, sie als Vitamin P (=Permeabilitätsfaktor) zu bezeichnen [61, 62]. Dieser Begriff wurde allerdings in den 50er Jahren revidiert, da Flavonoide nicht der genauen Definition von Vitaminen entsprechen [62]. Seither sind über 8000 strukturell verschiedene Flavonoide bekannt [63, 64]. Sie gehören zur Stoffklasse der Pflanzenfarbstoffe und finden sich unter anderem in Früchten, Gemüse, Wein und Tee [61, 65, 66]. Als Grundgerüst findet man bei allen Flavonoiden eine 3-Ring-Struktur (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), die als Flavan (Abbildung 1.2) bzw. 2-Phenylchroman bezeichnet wird [61, 65, 63]. Durch

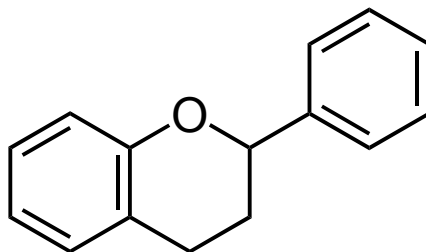


Abbildung 1.2: Strukturformel von Flavan

Variationen der funktionellen Gruppen am Grundgerüst des Flavans lassen sich Flavonoide in Untergruppen einteilen: Flavonole, Flavone, Flavanole, Flavanone, Anthocyanidine und Isoflavonoide [67, 68]. Das mit der Nahrung am häufigsten aufgenommene Flavonoid ist Quercetin (Abbildung 1.3), welches zur Untergruppe der Flavonole gehört [61, 69, 65]. Die tägliche Zufuhr an Flavonoiden pro Person beträgt ca. 26 mg, wobei der Anteil von Quercetin bei ca. 63 % liegt [70]. In humanem Plasma lässt sich kein reines Quercetin detektieren. Man findet hier jedoch die mit Glucuronid und/oder Sulfat konjugierten Formen von Quercetin: Quercetin-3-glucuronid, 3'-Methylquercetin-3-glucuronid und Quercetin-3'-sulfat [69, 65]. Die Konjugation von Quercetin erfolgt im Dünndarmepithel und in der Leber [63, 71], wobei in einem *in vivo* Versuch an Ratten der Darm zu 93,3% und die Leber zu 3,1% beteiligt waren [71].

Im Interesse der Forschung stehen insbesondere die antioxidativen, antiinflammatorischen, antithrombotischen, kardioprotektiven, antiarteriosklerotischen und antihypertensiven Wirkungen der Flavonoide. [61, 66, 65, 67, 68, 62].

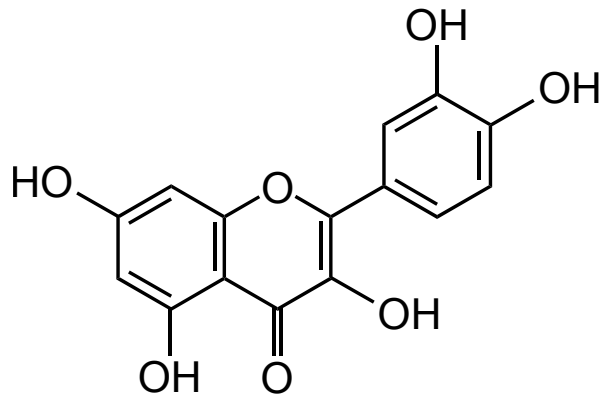


Abbildung 1.3: Strukturformel von Quercetin

### 1.5.1 Wirkungsmechanismen von Flavonoiden

Den Flavonoiden werden insbesondere bei kardiovaskulären Erkrankungen protektive Wirkungsweisen zugeschrieben. Hertog et al. zeigten in der Zutphen Elderly Study eine inverse Korrelation zwischen der mit der Nahrung aufgenommenen Menge an Flavonoiden und der Mortalität an koronarer Herzkrankheit. Das prozentual am meisten aufgenommene Flavonoid war Quercetin [70]. Flavonoide können die Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL) vermindern, das zur Entstehung von Arteriosklerose beiträgt [61]. Zudem ließ sich im Rattenmodell durch Quercetin ein erhöhter Blutdruck senken und eine kardiale Hypertrophie verringern [72]. Bei Untersuchungen an isolierten Koronararterien und Aorten zeigte sich, dass bei zuvor kontrahierten Gefäßen die Zugabe von Quercetin eine Vasodilatation herbeiführte [73, 74, 75]. In verschiedenen Studien wurde außerdem festgestellt, dass Flavonoide die Expression von endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) erhöhen und somit die Bildung des vasodilatatorisch wirkenden NO steigern können [76, 77, 78]. Dies wirkt sich beispielsweise positiv auf die Endothelfunktion postischämischer Herzen aus, indem es zur Wiederherstellung eines adäquaten Blutflusses beiträgt [78].

Auf der Ebene der Gefäßendothelien sind weitere Wirkungen der Flavonoide bekannt. Unter inflammatorischen Bedingungen wurde gezeigt, dass Flavonoide die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin hemmen [64, 79, 80, 78]. Dadurch kann die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und deren Extravasation in das umliegende Gewebe gemindert werden. Zusätzlich können Flavonoide bei Entzündungsreaktionen die Ausschüttung von Zytokinen, wie Interleukin 6 (IL-6), verringern [64, 81,

82]. In diesem Zusammenhang ist auch eine direkte Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beschrieben, der auf DNA-Ebene die Bildung von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen reguliert [64, 79]. Diese protektiven Wirkungen der Flavonoide unter inflammatorischen Bedingungen beeinflussen die endotheliale Funktion positiv, indem sie einer gesteigerten kapillären Permeabilität entgegenwirken [83, 78]. Es kommt zu einem geringeren Gewebsschaden und zu einer weniger beeinträchtigten Organfunktion [64].

Die beschriebenen Kenntnisse über die Flavonoide spielen auch eine Rolle für deren Nutzen bei Ischämie-/Reperfusionsschäden (I/R). Akhlaghi et al. befassten sich insbesondere mit dem myokardialen I/R-Schaden [78]. Von Bedeutung ist die antioxidative Wirkung der Flavonoide. Zum einen dienen sie als direkte Radikalfänger von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS); zum anderen inhibieren sie die Aktivität bzw. Expression von oxidativen Enzymen, wie die Xanthinoxidase und die NADPH-Oxidase [61, 66, 78]. Bei einem *in vivo* Tierversuch wurden Ratten über drei Wochen mit quercetinhaltiger Nahrung gefüttert, wohingegen die Kontrollgruppe quercetinfreie Nahrung bekam. Anschließend zeigte sich in der Quercetingruppe ein signifikant höherer Gehalt an Antioxidanzien im Plasma [67]. In einer Studie zum I/R-Schaden wurden isolierte Rattenherzen in einem *ex vivo* Perfusionsmodell mit einer rotweinextraktreichen (unter anderem aus Quercetin bestehend) und blutfreien Perfusionslösung perfundiert. In der Rotweinextraktgruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe die Marker für oxidativen Stress bzw. Lipidoxidation signifikant geringer und es wurden hier Peroxylradikale direkt abgefangen. Außerdem waren der aortale Blutfluss sowie der Blutdruck nach 60 Minuten signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Positiv stellten sich die geringer ausgeprägten Infarktzeichen in der Rotweinextraktgruppe dar [84].

Sowohl bei inflammatorischen Bedingungen als auch beim I/R-Schaden kann es am Endothel zu einem Überwiegen von prothrombotischen Eigenschaften kommen. Dies kann durch Flavonoide, denen eine antithrombotische Wirkung zugesprochen wird, positiv beeinflusst werden. In einer *in vitro* Studie wurde das Endothel der Pulmonalarterien von Kälbern mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert, um oxidativen Stress zu erzeugen. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine vermehrte Biosynthese von plättchenaktivierendem Faktor (PAF), welche jedoch durch Zugabe von Flavonoiden, wie Quercetin, inhibiert werden konnte. Somit

sind Flavonoide in der Lage, das Endothel vor erhöhter PAF-Produktion zu schützen [85]. In Untersuchungen zur Wirkung von Flavonoiden bei thrombotischen Ereignissen wurden humane Thrombozyten mit Flavonoiden inkubiert und anschließend durch Kollagen stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass Flavonoide, wie Quercetin, sehr potent die Aggregation und die Serotonin-Sekretion der Thrombozyten hemmen [86].

### 1.5.2 Spezifische Wirkungsmechanismen von Quercetin-3-glucuronid

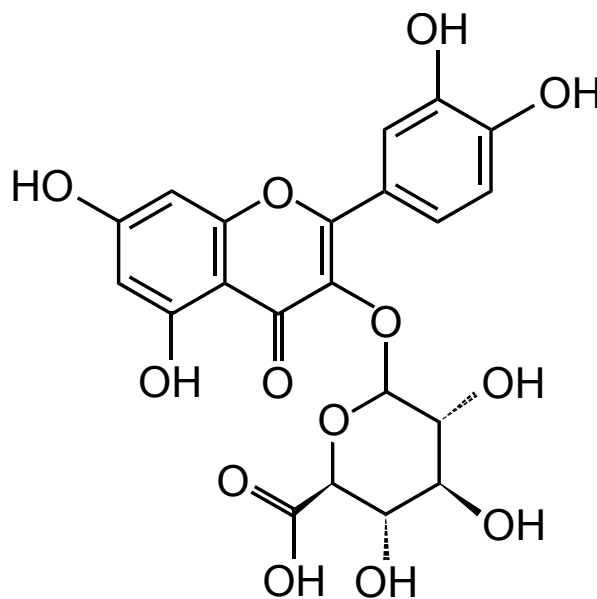


Abbildung 1.4: Strukturformel von Quercetin-3-glucuronid

Neben den zuvor beschriebenen Wirkungen der Flavonoide im Allgemeinen wurden speziell für Quercetin-3-glucuronid (QG) (Abbildung 1.4) endothelstabilisierende Eigenschaften entdeckt, die für die Vorgänge der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) und des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R) in der Xenotransplantation von Relevanz sind. Juchem et al. [87] untersuchten die Regulation der Barrierefunktion in myokardialen postkapillären Venolen. Lokale Entzündungsreaktionen führen zur Kontraktion des Endothels und zur Entstehung von interzellulären Lücken, was den Austritt von intravasalen Blutbestandteilen in das Interstitium nach sich zieht. Es bilden sich Fibrinthromben, die das inflammatorische Areal von der Blutzirkulation isolieren und somit das Ausbreiten in andere Bereiche unterdrücken sollen. Diese venolären Thrombosen und perivenulären Entzündungsreaktionen wurden bei der Herztransplantation als frühes Zeichen eines Organversagens gefunden.



Die Untersuchungen von Juchem et al. wurden an Sandwich-Kulturen von Endothelzellen postkapillärer Venolen und Perizyten (SC-PVO) durchgeführt und unter verschiedenen Voraussetzungen die Permeabilität des Endothels bestimmt. Die Zugabe von aktivierten Leukozyten und  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte zu einer signifikanten Steigerung der Permeabilität. Dies konnte durch die Gabe von QG, das als Antioxidanz wirkt und somit der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entgegenwirkt, komplett verhindert werden. Der stärkste Barriereverlust von SC-PVO wurde durch eine Kombination aus aktivierten humanen Thrombozyten und Leukozyten verursacht. Auch dies ließ sich durch QG signifikant verhindern. Bei einer Untersuchung mit einer Standardlösung aus aktivierten Thrombozyten und Leukozyten, die bei SC-PVO zur Bildung von interzellulären Lücken führte, war es durch die Gabe von QG möglich die entstandenen Lücken innerhalb von 6-8 Stunden wieder zu schließen. In der Kontrollgruppe blieben sie unverändert offen. Mit Hilfe von Phasen-Kontrast-Aufnahmen wurde ersichtlich, dass Leukozyten durch die interzellulären Verbindungen im Endothel wanderten. Thrombozyten bewirkten eine Kontraktion der Endothelzellen und eine damit verbundene Bildung interzellulärer Lücken. Unter der Wirkung von QG bildeten sich diese Vorgänge zurück und die Barrierefunktion wurde wiederhergestellt. Dies gelang auch unter der Präsenz von Thrombin, aktivierten Leukozyten und aktivierten Thrombozyten.

An der Öffnung von interzellulären Lücken ist filamentöses Aktin beteiligt, das durch aktivierte Leukozyten und Thrombozyten zu Polymerisation angeregt wurde. QG bewirkt sowohl bei aktiviertem als auch bei ruhendem Endothel einen Umbau des typischen Aktinsystems wodurch eine höhere Stabilität entsteht.

Bei der Zugabe von Leukozyten und den Thrombozytenprodukten Arachidonsäure und plättchenaktivierender Faktor (PAF) zu vorher aktivierten SC-PVO, wurde die Bildung von Leukotrien  $\text{B}_4$  ( $\text{LTB}_4$ ), Prostaglandin  $\text{I}_2$  ( $\text{PGI}_2$ ) und Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) nachgewiesen. QG konnte die Bildung dieser Eicosanoide stark vermindern, indem es vermutlich die Lipoxygenase 5 (5-LOX) und die Thrombozyten direkt inhibiert. Gezeigt wurde auch, dass QG im Zusammenspiel mit Leukotrien  $\text{A}_4$  ( $\text{LTA}_4$ ) effektiv die durch Thrombozyten und Leukozyten induzierten Ödeme abmilderte.

Nach der Perfusion des ventrikulären Koronarsystems humaner Herzen mit Vollblut unter

Zusatz von Substanzen, die Thrombozyten und Leukozyten aktivieren, wurden histologische Untersuchungen angeschlossen. Durch die Imitation eines inflammatorischen Prozesses lagerten sich Leukozyten in Venolen und deren umgebenden Gewebe ab, wohingegen die Thrombozyten in den korrespondierenden Arteriolen zu finden waren. Durch QG wurden diese Abläufe verhindert.

Die endothelprotektiven Wirkmechanismen von QG sind für die Beeinflussung der HAR und des I/R-Schadens bei Xenotransplantation von enormen Interesse.

## 1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die allgemeinen Wirkungsweisen der Flavonoide als antioxidative, antiinflammatorische, antithrombotische und kardioprotektive Substanzen sind Bestandteil intensiver Forschung. Bei *in vitro* Versuchen an myokardialen postkapillären Venolen wurde für das Flavonoid Quercetin-3-glucuronid eine protektive Wirkung auf das Endothel unter inflammatorischen Bedingungen gezeigt. Diese Eigenschaft prädestiniert Quercetin-3-glucuronid auch im Rahmen der Forschung zur Xenotransplantation eingesetzt zu werden. Durch die hyperakute Abstoßung und den Ischämie-/Reperfusionsschaden kommt es zur Schädigung des Endothels und damit verbunden zur Entstehung von Thrombosen, Übertritt von Blutbestandteilen in das Interstitium und schließlich zu einem Organversagen.

Anhand eines xenogenen *ex vivo* Perfusionsmodells zur Erforschung der Transplantation von Schweineherzen auf den Menschen wurden erstmals folgende Fragestellungen untersucht:

- Wie lassen sich die immunologischen und inflammatorischen Abläufe hinsichtlich der hyperakuten Abstoßungsreaktion und des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch Quercetin-3-glucuronid beeinflussen?
- Welche Auswirkungen hat Quercetin-3-glucuronid auf die Herzfunktion?
- Kann Quercetin-3-glucuronid das Myokard vor Schädigung schützen und den myokardialen Metabolismus beeinflussen?
- Welche Relevanz hat der Einsatz von Quercetin-3-glucuronid für die xenogene Herztransplantation?

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Versuchsgruppen

Als Versuchstiere wurden deutsche Landrasseschweine des Lehr- und Versuchstiergutes der Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, Deutschland verwendet.

Die im Mittel 6-8 Wochen alten Tiere waren durchschnittlich 17,9 kg schwer und von beiderlei Geschlecht. Sie standen präoperativ für 12 Stunden unter Nahrungskarenz, erhielten in dieser Zeit jedoch Wasser zu trinken. Den Tieren wurden zuvor keinerlei Medikamente verabreicht.

Die Kontrollgruppe umfasste 11 und die Quercetinglucuronidgruppe (QG-Gruppe) 6 Tiere. Der QG-Gruppe wurde zweimalig 50  $\mu$ M Quercetin-3-glucuronid (QG) zugeführt: zuerst mit der kardioplegen Lösung und erneut im Perfusat des Working-Heart-Modells. Die Perfusion der Schweineherzen erfolgte mit einem Perfusat aus humanem Blut unter xenogenen Bedingungen.

### 2.2 Operatives Vorgehen

#### 2.2.1 Anästhesie

Zur Prämedikation wurden den Versuchstieren im Tierstall gewichtsadaptiert Azaperon (Stresnil, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland, 10 mg/kg KG), Ketaminhydrochlorid

rid (Ketavet, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland, 10 mg/kg KG) und Atropinsulfat (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, 0,007 mg/kg KG) intramuskulär in die seitliche Halsmuskulatur appliziert. Nach Eintritt der sedierenden Wirkung wurden die Tiere unter Vorhalten einer Sauerstoffmaske in den Operationssaal gebracht. Hier wurde in eine oberflächliche Ohrvene eine Venenverweilkanüle gelegt, über welche zur Narkoseeinleitung Fentanyl (Fentanyl-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland, 0,002 mg/kg KG) und Propofol (Propofol 2% mit MCT, Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Österreich, 2 mg/kg KG) verabreicht wurden. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch die kontinuierliche Infusion von Propofol (10 mg/kg/h) und repetitive Bolusgaben von Fentanyl (0,05 mg).

Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend intubiert und anschließend mit einem Sauerstoff-Druckluft-Gemisch druckkontrolliert beatmet. Die Einstellungen des Beatmungsgerätes wurden wie folgt gewählt: obere Druckgrenze 30 mbar, positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) 5 mbar, Tidalvolumen ca. 10 ml/kg KG und inspiratorische Sauerstoffkonzentration ( $\text{FiO}_2$ ) 0,5-1,0.

Nach der Intubation wurden die Tiere auf den Operationstisch umgelagert und an diesem mit Mullbinden fixiert. Die intraoperative Überwachung erfolgte mittels externem Pulsoxymeter (Nellcor N-20PA Handheld Pulse Oximeter, Covidien-Nellcor and Puritan Bennett, Boulder, USA) sowie über einen Monitor (Siemens SC 8000 Patientenmonitor, Siemens AG, München, Deutschland; PiCCO plus, PULSION Medical Systems SE, München, Deutschland) für EKG und arterielle Blutdruckmessung in der *Arteria carotis communis*.

### **2.2.2 Operation**

Die Operation begann mit der Präparation der rechten *Arteria carotis communis*. Zur Orientierung wurde dabei der mediale Rand des *Musculus sternocleidomastoideus* aufgesucht und an diesem entlang weiter in die Tiefe präpariert. Nach Anschlingen der *Arteria carotis communis* wurden systemisch 5000 I.E. Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) appliziert. Anschließend wurde über eine Schleuse ein PiCCO-Katheter (PiCCO Katheter, PULSION Medical Systems SE,

München, Deutschland) zur arteriellen Druckmessung gelegt.

Zur Eröffnung des Thorax erfolgte eine Hautinzision von der *Incisura jugularis* bis zum *Processus xiphoideus* mit anschließender medianer Sternotomie. Zur Blutstillung wurde das Periost elektrokoaguliert und das Knochenmark mit Knochenwachs abgedichtet. Nach dem Einsetzen des Sternumretraktors wurde der Thymus weitestgehend entfernt und das Perikard Y-förmig eröffnet. Die Perikardränder wurden mit Haltnähten am Wundrand fixiert, um das Herz weiter aus dem Thorax zu mobilisieren.

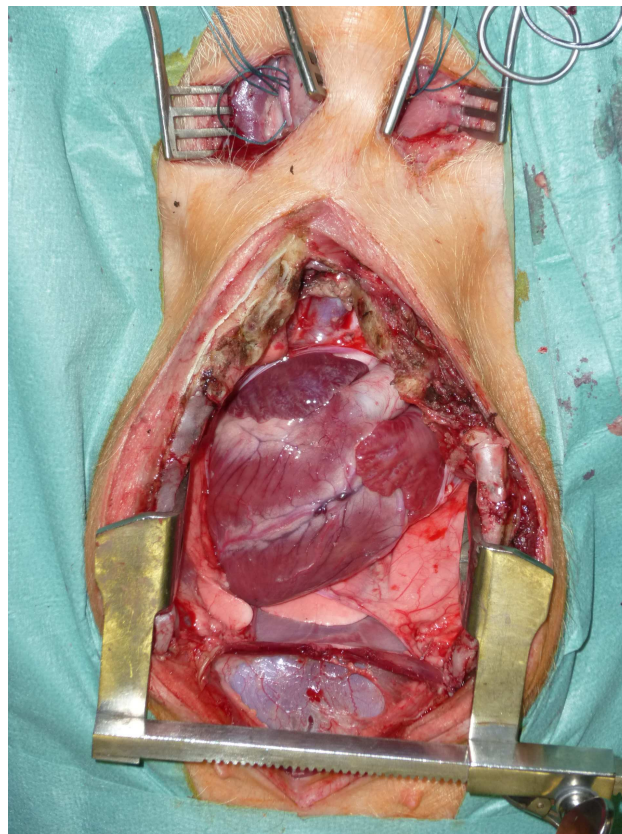
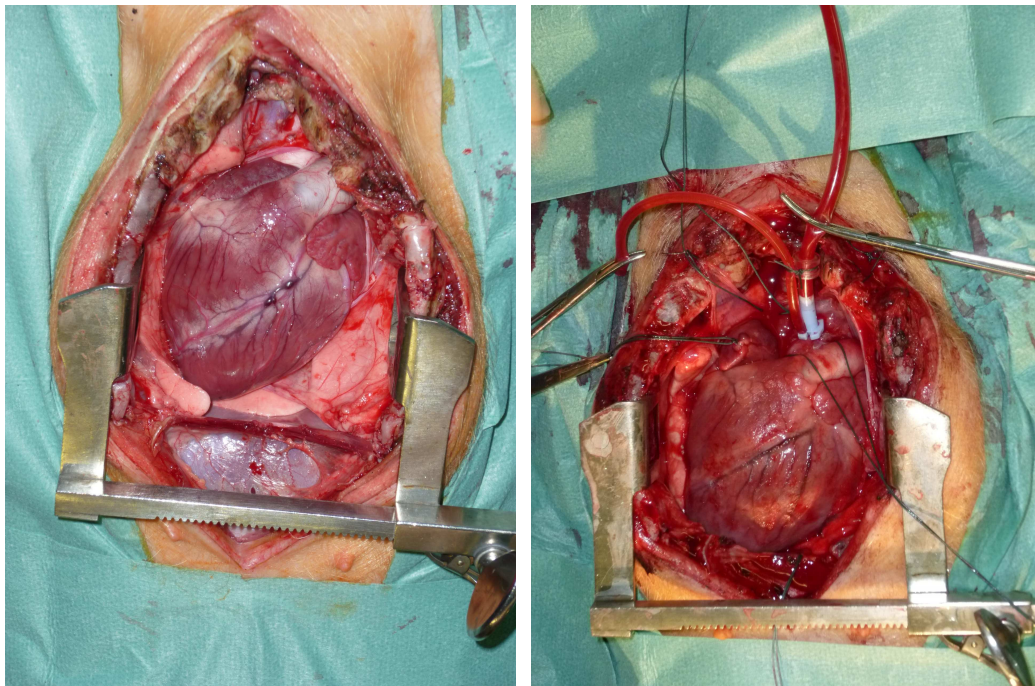


Abbildung 2.1: Hals- und Thoraxpräparation

Es folgte die Ligierung der Spitze des rechten Herzohres und dessen seitliche Verlagerung. Nach erneuter systemischer Gabe von 10000 I.E. Heparin wurden die zuvor präparierten *Vena cava inferior*, *Vena cava superior* und *Aorta ascendens* angeschlossen. Die Aortenwurzel wurde tangential angeklemt und nach Vorlage einer Tabaksbeutelnaht mit einer Aortic Root Cannula für die spätere Kardioplegie kanüliert. Im Anschluss wurde die *Vena cava superior* doppelt ligiert. Der Zufluss des venösen Blutes zum Herzen wurde durch langsames Zuziehen der *Vena cava inferior* gedrosselt, bis am leerschlagenden Herzen die Aorta oberhalb der Aortic Root Cannula abgeklemmt wurde. Es folgte die

Gabe einer 4°C kalten kardioplegen Lösung (Custodiol HTK-Lösung nach Bretschneider, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland) über die Aortic Root Cannula mit einem Druck von 150 mmHg und die gleichzeitige Kühlung des Herzens von außen durch ebenfalls 4°C kalte Spüllösung (Plastipur Ringer Lösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Um eine Entleerung des linken Herzens zu ermöglichen und eine Überdehnung durch die kardioplege Lösung zu verhindern, wurden die *Venae pulmonales* inzidiert. Nach Beendigung der Kardioplegie wurden das Herz und die Lunge von kaudal nach kranial vom Ösophagus freipräpariert. Es folgte das Absetzen der *Aorta ascendens*, der *Venae cavae* und der Trachea, um das Herz-Lungen-Paket zu entnehmen und es in eine Schüssel mit 4°C kalter Spüllösung zu legen.

Die Operation fand unter sterilen Bedingungen statt.



(a) Während OP

(b) Mit Aortic Root Cannula

Abbildung 2.2: Herz in situ

### 2.2.3 Herzpräparation

Die Präparation des Herzens erfolgte in 4°C kalter Spüllösung. Nach Inzision der *Aorta descendens* wurde der *Truncus pulmonalis* aufgesucht und gekürzt. Anschließend wurde die Aorta vom *Truncus pulmonalis* und der Trachea freipräpariert. Um beide Hauptbron-



chi und die begleitenden Pulmonalgefäße wurden Massenligaturen gesetzt. Beide Lungenhili konnten danach durchtrennt und die Lunge abgesetzt werden.

Um eine Konnektion des Herzens mit dem Perfusionssystem zu ermöglichen wurden in das Herz drei Kanülen eingebracht und jeweils mit Ligaturen befestigt. In das linke Atrium wurde eine Öffnung präpariert und dort die erste Kunststoffkanüle eingesetzt. Eine zweite Kunststoffkanüle wurde in die *Arteria pulmonalis* eingesetzt und eine letzte Metallkanüle in die Aorta. Als nächstes wurde ein PiCCO-Katheter durch die Herzspitze in den linken Ventrikel eingebracht und dieser mit Pledgets und 5-0 Prolene-Fäden befestigt. Das Herz wurde bis zum Ende einer kalten Ischämiezeit von zwei Stunden in 4°C kalter Spüllösung aufbewahrt.

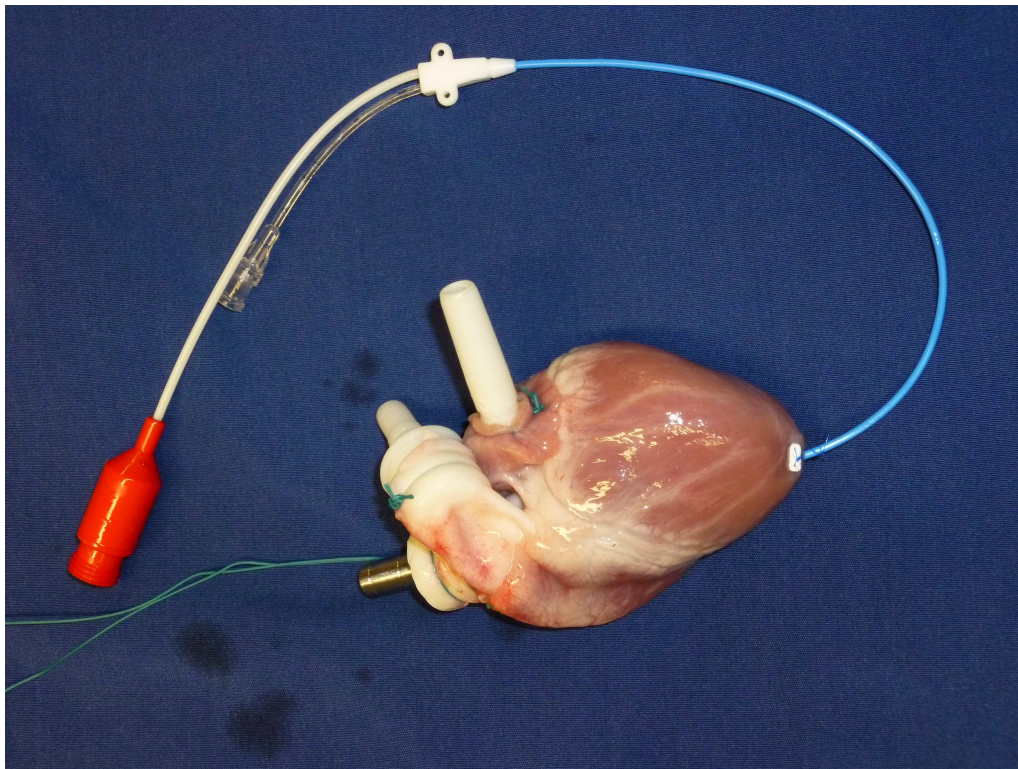


Abbildung 2.3: Präpariertes Herz vor Einbau in das Working-Heart-Modell

## 2.3 Working-Heart-Modell

Das Working-Heart-Modell wird als *ex vivo* Perfusionsmodell bei Versuchen zur xenogenen Herztransplantation eingesetzt. Unter möglichst physiologischen Bedingungen können hierbei Schweineherzen mit humanem Blut perfundiert und verschiedene Messpa-



rameter generiert werden.

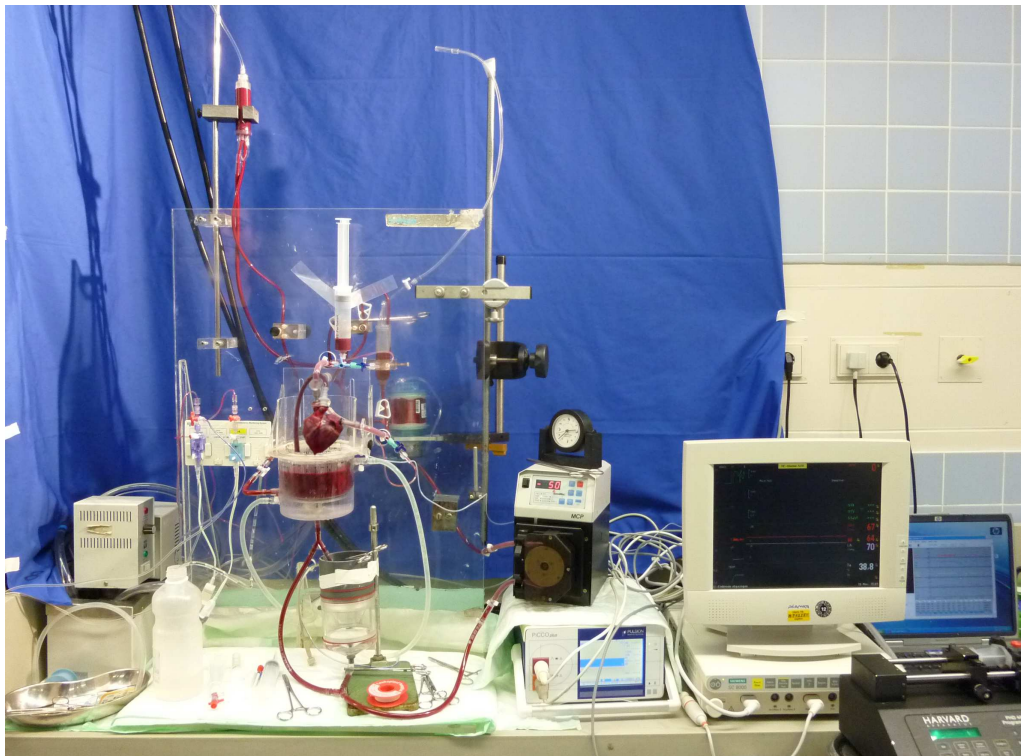


Abbildung 2.4: Versuchsaufbau

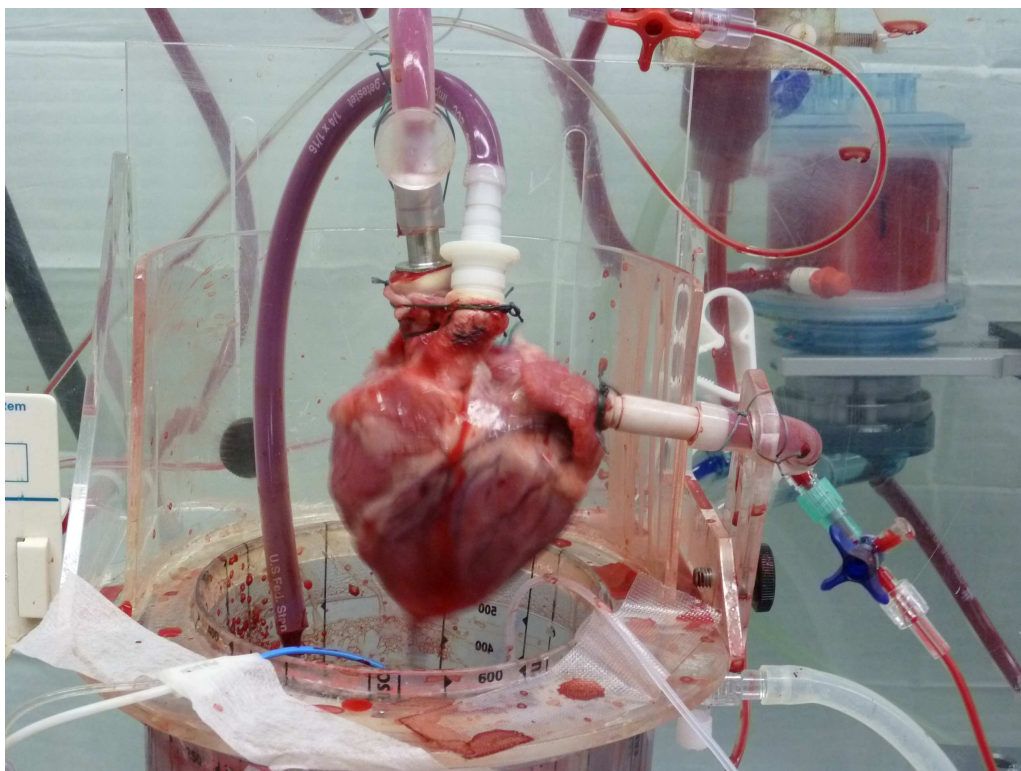
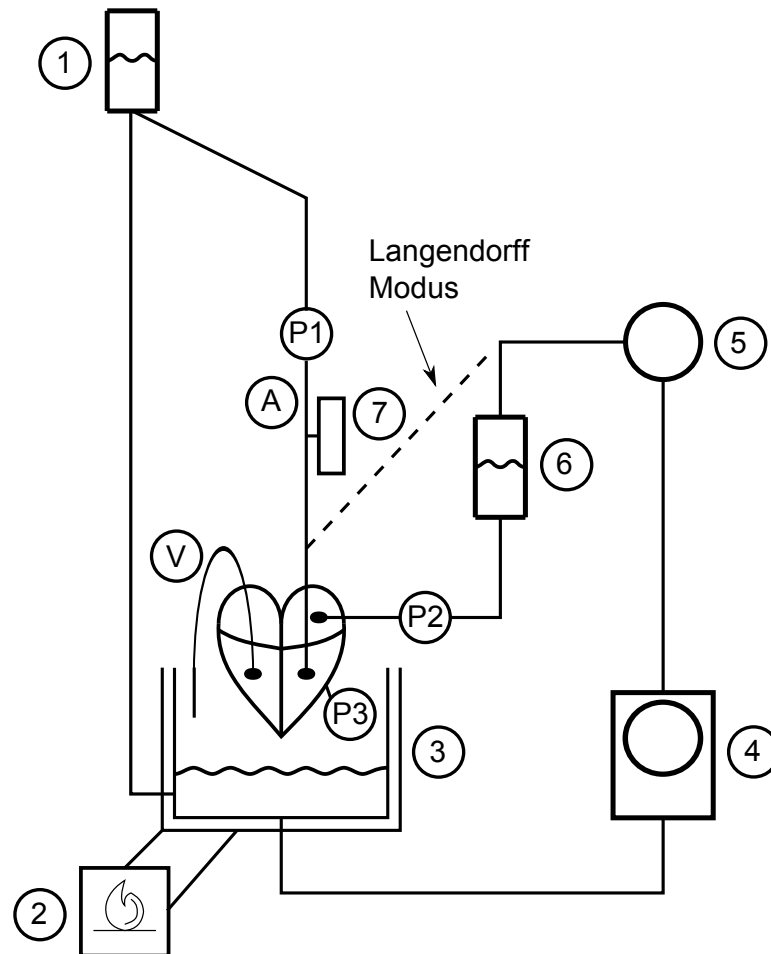


Abbildung 2.5: Herz in Working-Heart-Modell

### 2.3.1 Aufbau



- |                            |  |
|----------------------------|--|
| ① Nachlastreservoir        | Ⓟ <sub>1</sub> arterieller Druck, maximaler Druckanstieg (dP <sub>max</sub> ) in der Aorta                               |
| ② Heizung                  | Ⓟ <sub>2</sub> links-atrialer Druck (LAP)  |
| ③ doppelwandiges Reservoir | Ⓟ <sub>3</sub> PiCCO-Katheter: Herzfrequenz, maximaler Druckanstieg (dP <sub>max</sub> ), Temperatur im linken Ventrikel |
| ④ Rollerpumpe              | Ⓐ arterielle Blutabnahme   |
| ⑤ Oxygenator               | Ⓥ venöse Blutabnahme   |
| ⑥ Vorlastreservoir         |  |
| ⑦ Windkessel               |  |

Abbildung 2.6: Working-Heart-Modell

Im Working-Heart-Modus wurde vom Herz ausgehend das Perfusat über die Aorta gegen einen Druck von ca. 55 mmHg ausgeworfen. Dieser Druck wurde erzeugt, indem das Nachlastreservoir ① in einer Höhe von 75 cm über dem Herz angebracht wurde. Um die Windkesselfunktion ⑦ der Aorta zu simulieren, wurde oberhalb des Herzens eine teilweise mit Luft gefüllte Perfusorspritze an das Schlauchsystem angeschlossen. Vom Nachlastreservoir ① aus floss das Perfusat der Schwerkraft nach in ein doppelwandiges Reservoir

③, welches durch eine Wasserpumpe ② (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) ständig beheizt wurde. Anschließend wurde das Perfusat mit Hilfe einer Rollerpumpe ④ (Ismatec MCP Pumpenantrieb, IDEX Health & Science GmbH, Glattbrugg, Schweiz) in einen Membranoxygenator ⑤ (Dideco KIDS D101 Pediatric Oxygenator, SORIN GROUP, Mirandola, Italien), der ebenfalls beheizt ② war, transportiert. Als Grundeinstellung für die Gaszusammensetzung (Gasflowmeter, Sorin Group Deutschland GmbH, Stöckert-Instrumente GmbH, München, Deutschland) wurde ein Gemisch aus 2 l/min Raumlufte, 0,2 l/min O<sub>2</sub> und 0,015 l/min CO<sub>2</sub> gewählt. Bevor das Perfusat das linke Atrium erreichte, floss es in ein Vorlastreservoir ⑥, welches 15 cm über dem Herz befestigt war und somit einem Druck von ca. 11 mmHg entsprach. Im Herzen gelangte das Perfusat vom linken Atrium in den linken Ventrikel und konnte wieder über die Aorta ausgeworfen werden. Das Perfusat, welches durch die Koronarien floss, gelangte über den *Sinus coronarius* in das rechte Atrium, von dort in den rechten Ventrikel und schließlich über einen Schlauch an der *Arteria pulmonalis* direkt in das beheizte doppelwandige Reservoir ③.

In den ersten 15 Minuten wurde das Herz im Langendorff-Modus perfundiert. Hierbei wurde hinter dem Oxygenator ⑤ der Zufluss zum Vorlastreservoir ⑥ abgeklemmt und die im Schlauchsystem vorhandene Verbindung zwischen Oxygenator ⑤ und Aorta geöffnet. Auf diese Weise wurde ein retrograder Fluss in der Aorta erzeugt, der zu einer antegraden Perfusion der Koronararterien führte. Die Rollerpumpe ④ wurde hierbei mit 75 U/min betrieben, um einen ausreichenden Perfusionsdruck zu erreichen.

Beim Auftreten von Rhythmusstörungen wurde das Herz defibrilliert (Theracard 361D, Siemens, Deutschland).

Das Umschalten zwischen Langendorff- und Working-Heart-Modus erfolgte, indem der Zufluss über das Vorlastreservoir in das linke Atrium langsam gesteigert und anschließend die retrograde Perfusion über den Langendorff-Schenkel abgeklemmt wurde.

### 2.3.2 Perfusat

Die humanen Blutspender waren männlich und zwischen 20 und 30 Jahre alt. Sie litten an keinen chronischen Erkrankungen und waren am Tag der Blutspende frei von Infekten.

Insgesamt wurden den Spendern 500 ml venöses Blut in zehn 50 ml Perfusorspritzen entnommen. Dabei war jede Spritze mit 10 I.E. Heparin pro ml Vollblut vorbe­füllt, um eine plasmatische Gerinnung zu verhindern. Die Blutentnahme war zeitlich auf das cross clamping der Aorta während der Operation abgestimmt. Zur Blutgruppenbestimmung wurde ein Bedside-Test durchgeführt. Außerdem wurde eine erste Blutgasanalyse durchgeführt und Blut für die folgenden Laboranalysen abzentrifugiert.

Das Perfusionssystem wurde mit 250 ml HES 6% (Volulyte 6% Infusionslösung, Hydroxyethylstärke (HES 130/0,4) in isotoner Elektrolytlösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) vorbe­füllt und das Blut anschließend über einen 200  $\mu$ m Filter direkt in das doppelwandige Reservoir hinzugegeben. Um eine homogene Mischung herzustellen, wurde die Rollerpumpe bei diesem Vorgang auf 50 U/min eingestellt. So erreichte man einen Zielhämatokrit von  $> 30\%$ . Im Anschluss wurde das Herz in das System eingebaut und das komplette Schlauchsystem sowie das Herz entlüftet.

Durch Beeinflussung verschiedener Parameter im Perfusat konnten möglichst physiologische Bedingungen geschaffen werden:

Parameter	Sollwert	Modifikation
pO <sub>2</sub> arteriell	100-200 mmHg	Veränderung der O <sub>2</sub> -Zufuhr am Gasflowmeter
pCO <sub>2</sub> arteriell	35-45 mmHg	Veränderung der CO <sub>2</sub> -Zufuhr am Gasflowmeter
pH	7,35-7,45	Veränderung der CO <sub>2</sub> -Zufuhr am Gasflowmeter; bei pH $< 7,35$ und BE $< -10$ Gabe von Natriumhydrogencarbonat (2 ml) (NaBic 8,4 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Glucose	100-120 mg/dl	Kontinuierliche Gabe eines Gemisches aus Glucose 20% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Insulin (Insulin Rapid 40 I.E./ml, Humaninsulin, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) per Perfusor (2 ml/h); bei Bedarf Veränderung der Zufuhr
Calcium	1,0-1,5 mmol/l	bei $< 1$ mmol/l Gabe von Calciumgluconat (0,5 ml) (Calciumgluconat 10%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Temperatur	38-39°C	Regulierung der Temperatur des Wasserbades

Tabelle 2.1: Beeinflussbare Parameter des Perfusats

## 2.4 Versuchsablauf

Der Quercetinglucuronidgruppe (QG-Gruppe) wurde zweimalig Quercetin-3-glucuronid (QG) zugeführt: zuerst mit der kardioplegen Lösung und nach einer kalten Ischämiezeit von zwei Stunden erneut im Perfusat des Working-Heart-Modells. Die Datenerhebung fand an acht terminierten Messzeitpunkten statt. Nach Erhebung der Ausgangsmesswerte wurde die Perfusion im Langendorff-Modus gestartet. Im Anschluss an die zweite Messung erfolgte die Umstellung in den Working-Heart-Modus. Bei einer Perfusionsdauer von 180 Minuten wurde die letzte Messung durchgeführt und der Versuch durch Applikation von Kaliumchlorid (Kaliumchlorid 7,45%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in den linken Vorhof und über die Aorta antegrad in die Koronarien beendet.

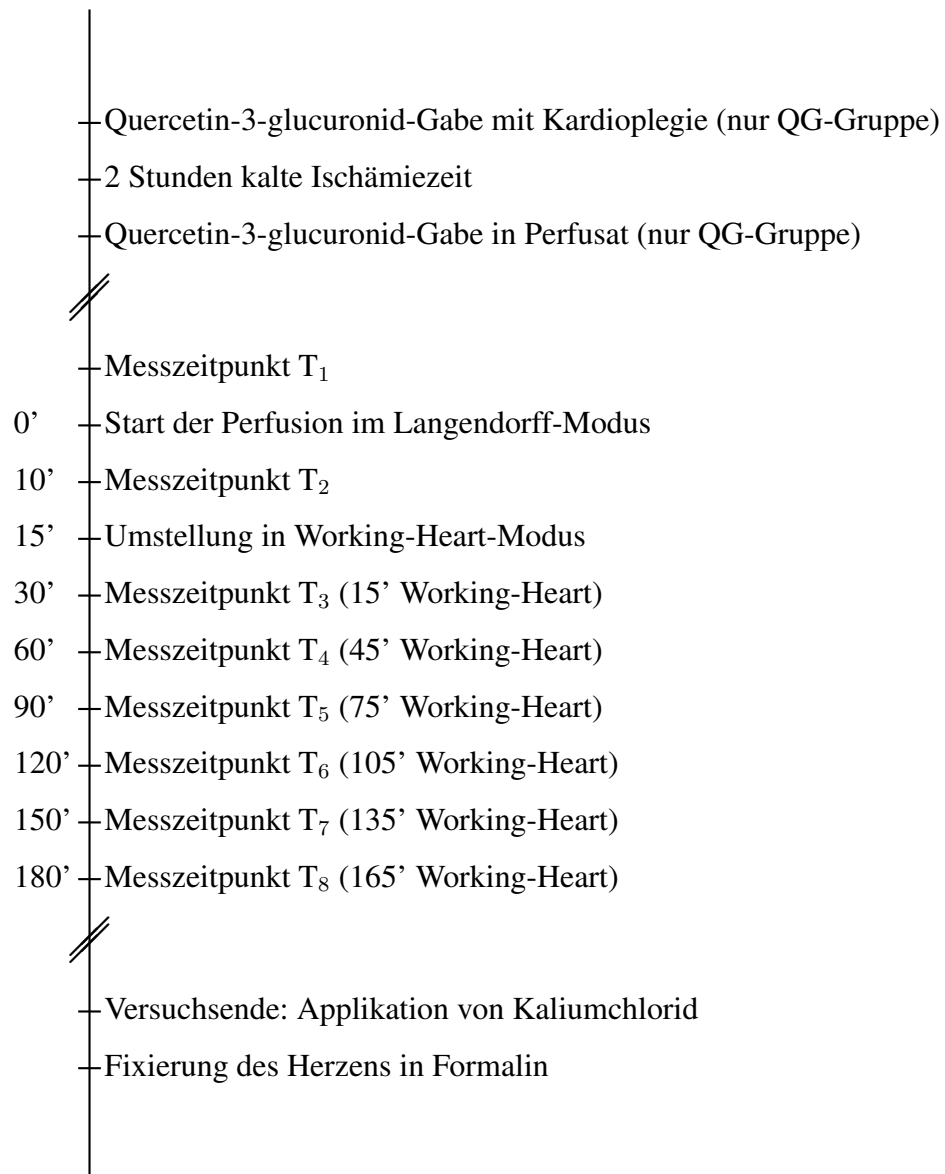


Abbildung 2.7: Versuchsablauf

## 2.5 Messparameter

Jeder Messzeitpunkt  $T_1, T_2, T_3, T_4, T_5, T_6, T_7$  und  $T_8$  diente zur Datenerhebung durch die folgenden Punkte:

- Messung hämodynamischer Parameter
- arterielle und venöse Blutgasanalyse
- Hämatologische Untersuchung
- Perfusatabnahme für spätere Laborbestimmungen

### 2.5.1 Funktionsparameter

Die Parameter zur Hämodynamik und  $O_2$ -Verbrauchskalkulation wurden aus den Daten der Druckmessungen, Volumenmessungen, Blutgasanalysen und hämatologischen Untersuchungen für die Messzeitpunkte  $T_3$  bis  $T_8$  errechnet.

#### 2.5.1.1 Hämodynamik

**Druckmessung** Die Druckverhältnisse wurden kontinuierlich während des gesamten Versuchs registriert (Siemens SC 8000 Patientenmonitor, München, Deutschland; PiCCO plus PULSION Medical Systems SE, München, Deutschland). An den einzelnen Messzeitpunkten  $T_1$  bis  $T_8$  wurden die Werte auf dem Versuchsprotokoll vermerkt.

Durch einen Druckabnehmer (P1) an der Aorta wurden der systolische (saP = [mmHg]), diastolische (daP = [mmHg]) und mittlere (maP = [mmHg]) arterielle Blutdruck, sowie die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dPmax = [mmHg/s]) gemessen.

Über den PiCCO-Katheter (P3) wurden im linken Ventrikel zusätzlich zum systolischen, diastolischen und mittleren ventrikulären Druck der dPmax, die Herzfrequenz (HF =  $\text{min}^{-1}$ ) und die Temperatur registriert.

Zwischen Vorlastresevoir und linken Vorhof wurde ein Druckabnehmer (P2) zur Messung des links-atriale Drucks (LAP = [mmHg]) angebracht.

**Arterieller Blutfluss** Der arterielle Blutfluss (ABF = [ml/min]) wurde gemessen, indem an den Messzeitpunkten  $T_3$  bis  $T_8$  das aus dem Nachlastreservoir abfließende Per-

fusat über einen Zeitraum von 10-20 Sekunden gesammelt und anschließend der Blutfluss in ml pro Minute errechnet wurde.

**Koronarer Blutfluss und koronarer Blutflussindex** Der koronaren Blutfluss (CBF = [ml/min]) wurde an den Messzeitpunkten T<sub>3</sub> bis T<sub>8</sub> durch das Sammeln des Perfusats aus der Pulmonalarterie über einen Zeitraum von einer Minute bestimmt. Da der Zufluss in den rechten Vorhof und somit auch in den rechten Ventrikel nur aus dem venösen Koronarblut bestand, konnte die Messung auf diese Weise durchgeführt werden.

Der koronare Blutflussindex (CBFI = [ml/min/g]) beschreibt den koronaren Blutfluss pro Gramm Herzgewebe:  $CBFI = CBF / \text{Herzgewicht}$

**Herzzeitvolumen** Das Herzzeitvolumen (HZV = [ml/min]) wurde durch Addition des ABF und CBF errechnet:  $HZV = ABF + CBF$ .

**Herzzeitvolumenindex** Der Herzzeitvolumenindex (HI = [ml/min/g]) spiegelt das HZV pro Gramm Herzgewebe wider:  $HI = HZV / \text{Herzgewicht}$ .

**Schlagarbeitsindex** Der Schlagarbeitsindex (SWI = [erg/g]) ist ein wichtiger Herzleistungsparameter, in dessen Berechnung Druck- und Volumenparameter miteinfließen:  $SWI = ((maP - LAP) \times HZV \times 1333) / (HF \times \text{Herzgewicht})$ .

#### 2.5.1.2 O<sub>2</sub>-Verbrauchskalkulation

**Arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz** Die arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz (AVDO<sub>2</sub> = [ml/dl]) beschreibt die Menge an Sauerstoff in ml, die von 100 ml Blut entnommen wird. Sie wurde durch Subtraktion des arteriellen und venösen Sauerstoffgehalts (CaO<sub>2</sub>, CvO<sub>2</sub>) errechnet:  $AVDO_2 = CaO_2 - CvO_2 = (1,34 \times Hb \times SO_{2art} / 100 + 0,003 \times pO_{2art}) - (1,34 \times Hb \times SO_{2ven} / 100 + 0,003 \times pO_{2ven})$

**Myokardialer Sauerstoffverbrauch** Der myokardiale Sauerstoffverbrauch (MVO<sub>2</sub> = [ml/g]) gibt den Sauerstoffverbrauch pro Gramm Herzgewebe an und wurde durch den koronaren Blutflussindex multipliziert mit der arteriovenösen Sauerstoffverbrauchsdifferenz errechnet:  $MVO_2 = CBFI \times AVDO_2$ .

**Myokardiale Effizienz** Die myokardiale Effizienz ( $ME = [\%]$ ) wurde wie folgt berechnet:  $ME = HI \times maP / MVO_2$ .

### 2.5.2 Blutgasanalyse

Anhand der arteriellen (A) und venösen (V) Blutgasanalysen konnten sofort notwendige Änderungen am Gasflowmeter, an der Glucosezufuhr, am Calciumgehalt und am pH-Wert vorgenommen werden. Für die späteren Berechnungen des Sauerstoffverbrauchs wurden die arterielle und venöse Sauerstoffstättigung ( $SO_{2art}$ ,  $SO_{2ven}$ ), sowie der arterielle und venöse Sauerstoffpartialdruck ( $pO_{2art}$ ,  $pO_{2ven}$ ) bestimmt. Ebenso konnte die Laktatkonzentration im arteriellen und venösen Perfusat gemessen werden.

### 2.5.3 Hämatologie

Die hämatologische Untersuchung fand direkt nach jeder Perfusatabnahme statt. Untersucht wurden neben der Anzahl an Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten auch der Hämoglobingehalt und der Hämatokrit (Coulter Ac·T 8, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland).

### 2.5.4 Laborparameter

Die koronarvenöse Perfusatprobe für alle folgenden Laboruntersuchungen wurde bei der Messung des CBF über die *Arteria pulmonalis* gewonnen. Für die Untersuchungen wurde das Perfusat in ein Serum-Röhrchen gefüllt und bei 4000 U/min 10 Minuten zentrifugiert (Standzentrifuge Rotanta K, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend wurde das abpipettierte Serum bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}C$  gelagert.

#### 2.5.4.1 Myokardläsion

Zur Quantifizierung des Myokardschadens wurden die Konzentration der herzspezifischen Creatinkinase (CK-MB-Masse) sowie die beiden nicht herzspezifischen Laborparameter Laktatdehydrogenase (LDH) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)



bestimmt (Standardverfahren des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität, München).

#### **2.5.4.2 Anti-pig-Antikörper**

Mit einem Test konnten Anti-pig-Antikörper (APA) im humanen Blut und im Perfusat gemessen werden, die unter Zugabe von Komplement in der Lage waren, Schweineerythrozyten zu lysieren.

Zur Durchführung des Tests wurden die Proben bei 56°C für 30 Minuten erhitzt, wodurch es zu einer Inaktivierung von Komplement kam. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei 17000 G zentrifugiert. Danach wurde mittels Komplementfixationsverdünner (CFD, Complement fixation test dilution, ICN, Costa Mesa, USA) von jeder Probe eine Verdünnungsreihe von 1:2,5 bis 1:1280 auf einer Mikrotiterplatte erstellt. Zu den Platten wurden Schweineerythrozyten hinzugegeben an deren Oberfläche es zur Bindung von APA während einer einstündigen Inkubation bei 37°C kam. Nach dem Pipettieren von 100 µl CFD zu jeder Probe wurden die Platten bei Raumtemperatur mit 500 G für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte eine erneute Zugabe von 200 µl CFD mit anschließendem Zentrifugieren bei 500 G für 10 Minuten. Der Überstand wurde wieder entfernt und danach Kaninchen-Komplement (Baby Rabbit Complement, Serotec, Kidlington, UK) hinzugegeben, was zu einer Lyse der mit APA besetzten Schweineerythrozyten führte. Die Platten wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend bei 500 G 10 Minuten zentrifugiert. Von dem Überstand wurden jeweils 100 µl in eine Photometerplatte pipettiert und diese bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen. Hierdurch konnte die Absorption berechnet werden und die Ergebnisse mittels AUC-Einheiten (area under the curve) dargestellt werden. Als Kontrollstandard diente ein mit 1000 AUC-Einheiten bewertetes Humanserum.

#### **2.5.4.3 IL-6 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

**Humaner Interleukin 6 (IL-6) ELISA** Zur quantitativen Bestimmung des humanen IL-6 wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Die verwendeten Mikrotiterplatten waren mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanes IL-6 beschichtet. Bei

Zugabe der Proben wurde jedes IL-6 an einen dieser Antikörper gebunden. Nach Abwaschen aller ungebundenen Substanzen wurden zu den Proben enzym-gekoppelte polyklonale Antikörper gegen IL-6 gegeben. Anschließend wurden erneut alle ungebundenen Substanzen von den Proben entfernt und eine Substratlösung zugegeben. Durch die initiierte Enzym-Substrat-Reaktion kam es zu einem Farbumschlag. Nach Stoppen dieser Reaktion wurde die Farbintensität, welche proportional zur gebundenen IL-6 Anzahl war, gemessen.

Die Durchführung des ELISA-kits (R&D Systems, Minneapolis, USA) erfolgte nach Vorgabe des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Materialien. Die Sensitivität lag bei einer minimal messbaren Dosis von 0,70 pg/ml IL-6. Durch die hohe Spezifität kam es zu keiner Kreuzreaktion mit porcinem IL-6.

**Porciner Interleukin 6 (IL-6) ELISA** Zur quantitativen Bestimmung des porcinen IL-6 wurde ebenfalls ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Die verwendeten Mikrotiterplatten waren mit einem polyklonalen Antikörper gegen porcines IL-6 beschichtet. Bei Zugabe der Proben wurde jedes IL-6 an einen dieser Antikörper gebunden. Nach Abwaschen aller ungebundenen Substanzen wurden zu den Proben enzym-gekoppelte polyklonale Antikörper gegen IL-6 gegeben. Anschließend wurden erneut alle ungebundenen Substanzen von den Proben entfernt und eine Substratlösung zugegeben. Durch die initiierte Enzym-Substrat-Reaktion kam es zu einer Blaufärbung, die durch Zugabe einer Stopp-Lösung nach Gelb umschlug. Die Farbintensität, welche proportional zur gebundenen IL-6 Anzahl war, wurde gemessen.

Die Durchführung des ELISA-kits (R&D Systems, Minneapolis, USA) erfolgte nach Vorgabe des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Materialien. Die Sensitivität lag bei einer minimal messbaren Dosis von 2,03 pg/ml IL-6. Durch die hohe Spezifität kam es zu keiner Kreuzreaktion mit humanem IL-6.

### **2.5.5 Herzgewicht**

Um die Ödembildung und Hämorrhagien im Herz während der Perfusion zu quantifizieren, wurden die Herzen vor und nach der Perfusion gewogen und die prozentuale Gewichtszunahme berechnet.

## 2.6 Statistik

Die statistischen Datenauswertungen und die Erstellungen der Graphen erfolgten mit der Statistik-Software SigmaPlot 11.0 für Windows (Systat Software Inc., USA).

Um die Unterschiede der beiden Gruppen zu mehreren Messzeitpunkten zu untersuchen, wurden der Two Way Repeated Measures ANOVA und anschließend der Student-Newman-Keuls Test angewandt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of the mean) angegeben. Als Signifikanzniveau wurde  $P < 0,05$  festgelegt.

Für die graphischen Darstellungen wurden Balkendiagramme verwendet, bei welchen die Mittelwerte durch die Balkenhöhe und die SEMs durch eine senkrechte Linie am Ober- und am Unter- rand der Balken abgebildet wurden.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Antikörperbindung

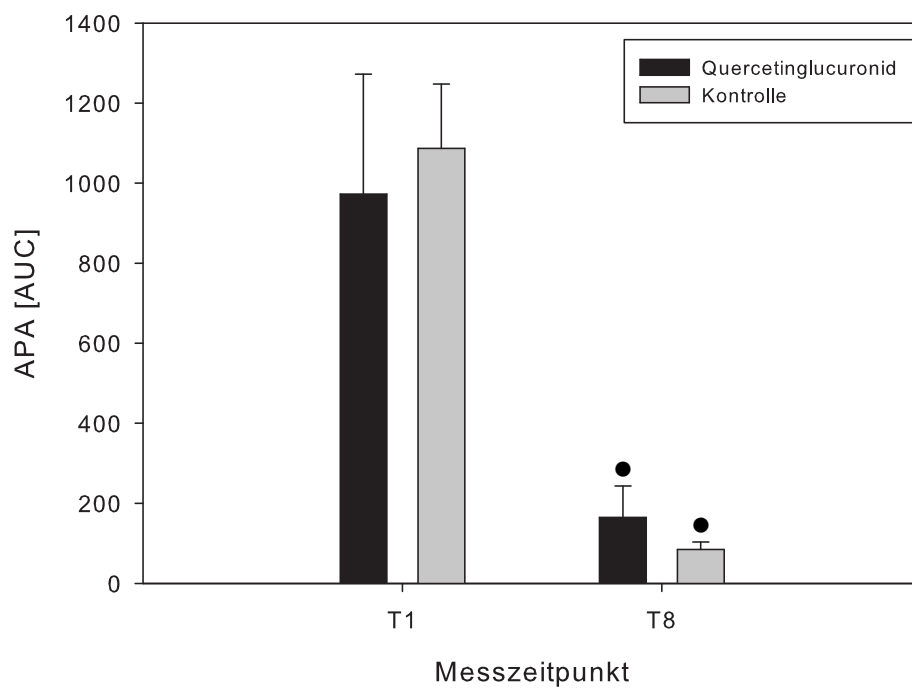


Abbildung 3.1: Anti-pig-Antikörper (APA)

- $P < 0,05$   $T_1$  vs.  $T_8$

Die Anti-pig-Antikörper (APA) wurden vor Beginn ( $T_1$ ) und am Ende der 180-minütigen xenogenen Perfusion ( $T_8$ ) gemessen. In beiden Gruppen kam es bei vergleichbaren Ausgangswerten zu einem signifikanten Abfall der APA. In der Kontrollgruppe sanken die

APAs von  $1087 \pm 161$  AUC auf  $85 \pm 18$  AUC. Bei der QG-Gruppe betrugen diese Werte  $973 \pm 300$  AUC und  $165 \pm 78$  AUC. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand nicht.

## 3.2 Leukozytenzahl

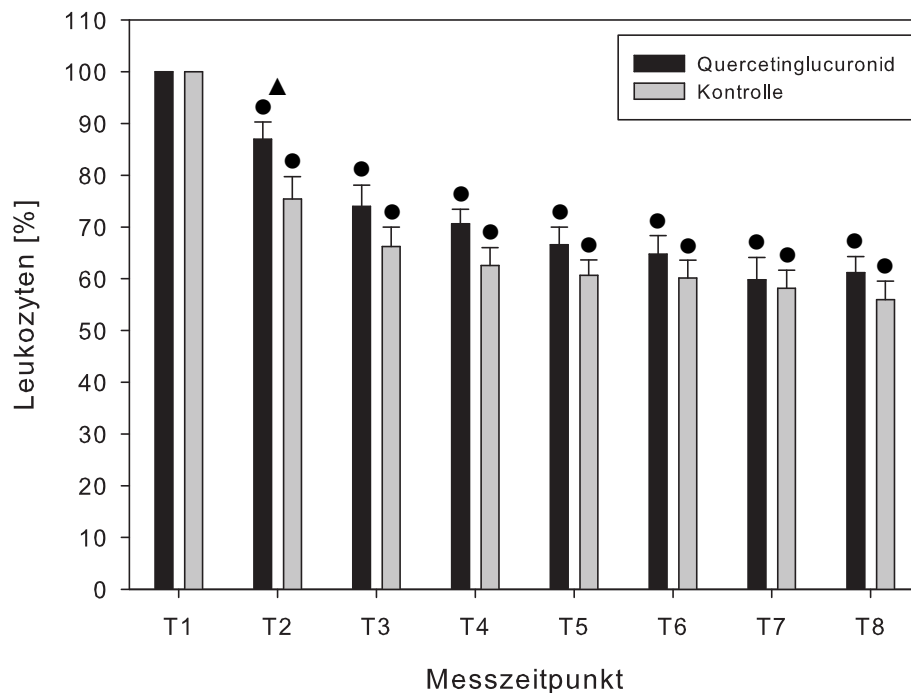


Abbildung 3.2: Leukozyten

- $P < 0,05$  T<sub>1</sub> vs. T<sub>2</sub> bis T<sub>8</sub>
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

Es wurden die relativen Veränderungen der Leukozytenzahl über den Perfusionszeitraum im Vergleich zum Ausgangswert bei T<sub>1</sub> betrachtet. Zwischen den Messzeitpunkten T<sub>1</sub> und T<sub>8</sub> zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikanter Abfall der Leukozyten. In der Kontrollgruppe fiel die Leukozytenzahl auf  $56 \pm 4$  % ab. Die QG-Gruppe hatte am letzten Messzeitpunkt T<sub>8</sub> einen Endwert von  $61 \pm 3$  %. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen fand sich lediglich am Messzeitpunkt T<sub>2</sub>, an welchem bei der QG-Gruppe ein Abfall auf  $87 \pm 3$  %, bei der Kontrollgruppe jedoch ein Abfall auf  $75 \pm 4$  % zu beobachten war.

### 3.3 Thrombozytenzahl

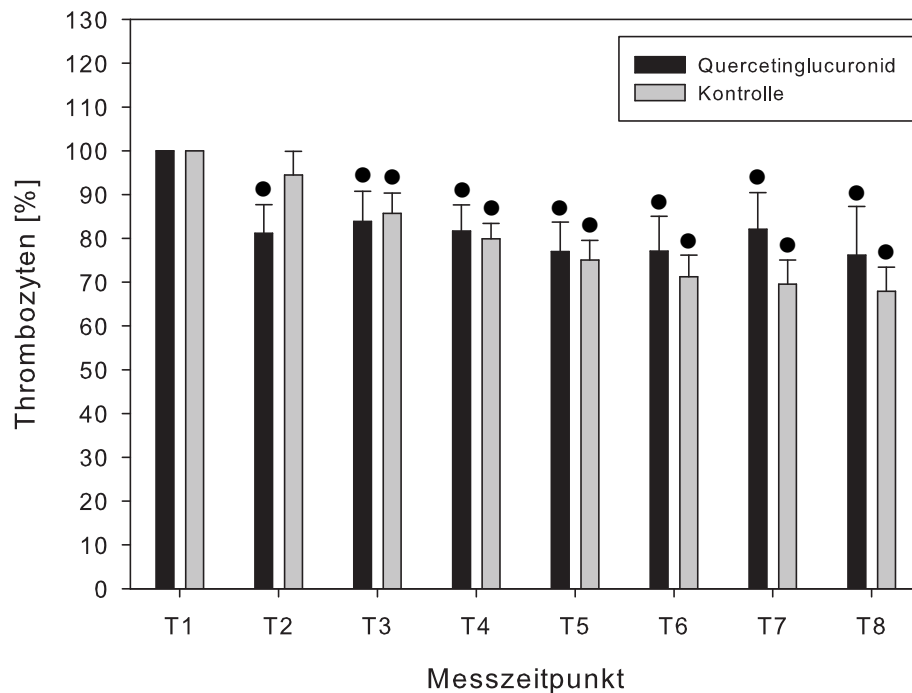


Abbildung 3.3: Thrombozyten

- $P < 0,05$   $T_1$  vs.  $T_2$  bis  $T_8$  (Quercetinglucuronid) bzw.  $T_3$  bis  $T_8$  (Kontrolle)

Es wurden die relativen Veränderungen der Thrombozytenzahl über den Perfusionszeitraum im Vergleich zum Ausgangswert bei  $T_1$  betrachtet. In beiden Gruppen kam es zu einem signifikanten Abfall der Thrombozyten über die Zeit. In der Kontrollgruppe fielen die Thrombozyten auf einen Wert von  $68 \pm 6$  % ab, in der QG-Gruppe auf einen Wert von  $76 \pm 11$  %. Zwischen den beiden Gruppen bestand allerdings zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.

### 3.4 Entzündungsmediatoren

Als Entzündungsmediatoren wurden das porcine und das humane Interleukin 6 (IL-6) bestimmt. Es kam in beiden Gruppen sowohl beim porcinen als auch beim humanen IL-6 zu einem signifikanten Anstieg über die Zeit.

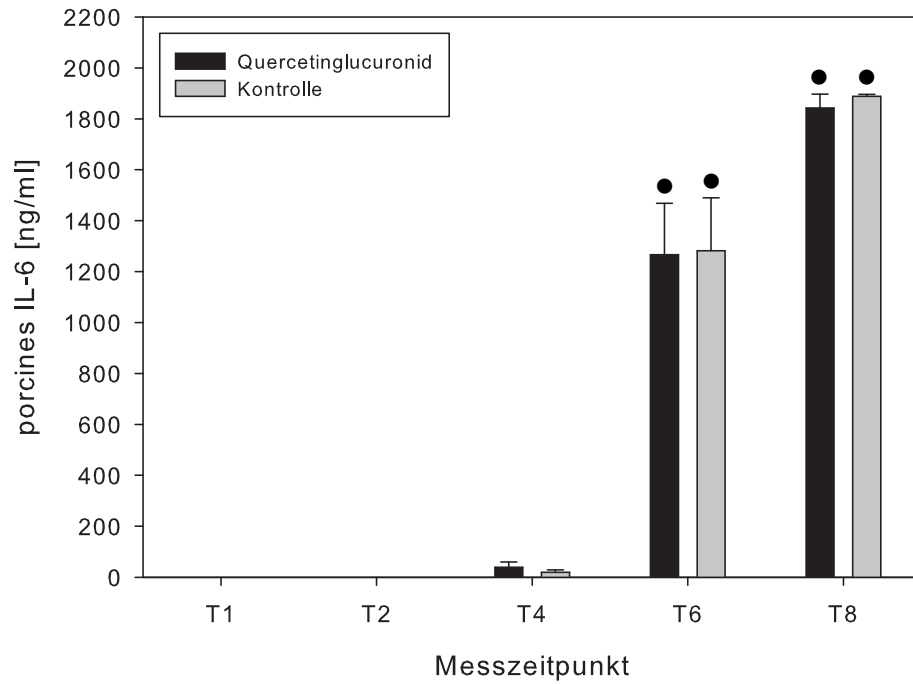


Abbildung 3.4: Porcines Interleukin 6 (IL-6)

- $P < 0,05$   $T_1$  vs.  $T_6$  und  $T_8$

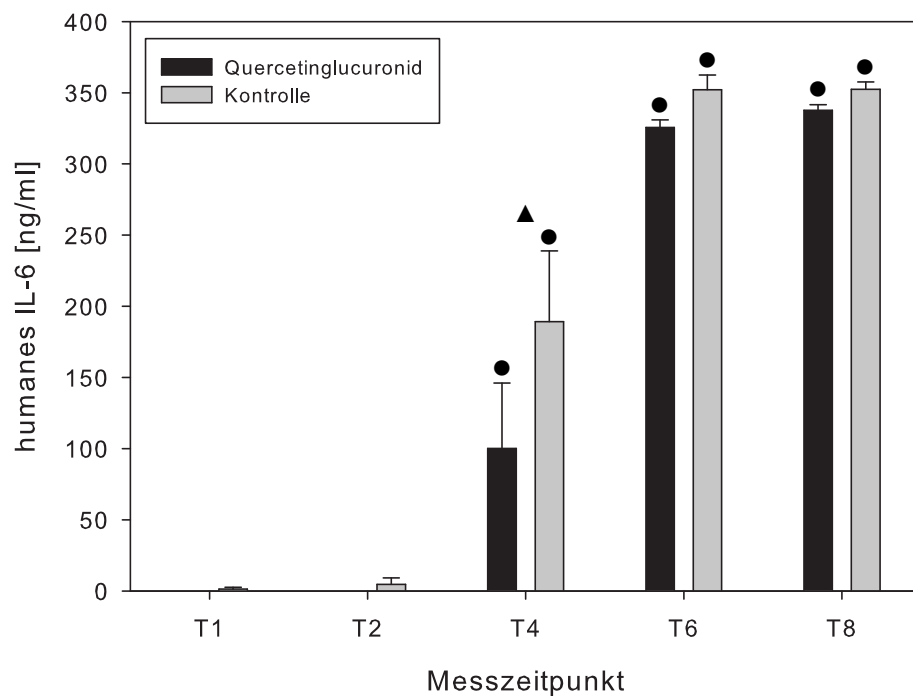


Abbildung 3.5: Humanes Interleukin 6 (IL-6)

- $P < 0,05$   $T_1$  vs.  $T_4$  bis  $T_8$
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

Ein signifikanter Anstieg des porcinen IL-6 war in beiden Versuchsgruppen am Messzeitpunkt  $T_6$  zu beobachten. Zwischen beiden Gruppen gab es zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied.

Beim humanen IL-6 fand sich am Messzeitpunkt  $T_4$  ein signifikanter Anstieg in beiden Versuchsgruppen. Ein weiterer deutlicher Konzentrationsanstieg erfolgte vom Messzeitpunkt  $T_4$  zu  $T_6$ . In der QG-Gruppe war am Messzeitpunkt  $T_4$  ein signifikant geringeres IL-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten.

### 3.5 Herzgewicht

Durch Schädigung des Endothels kam es zum Übertritt von Blutbestandteilen in das Myokard, was eine Organschwellung mit Ödembildung und Hämorrhagien zur Folge hat. Zur Quantifizierung dieser Schädigung wurde die Herzgewichtszunahme beider Gruppen in % gegenübergestellt.

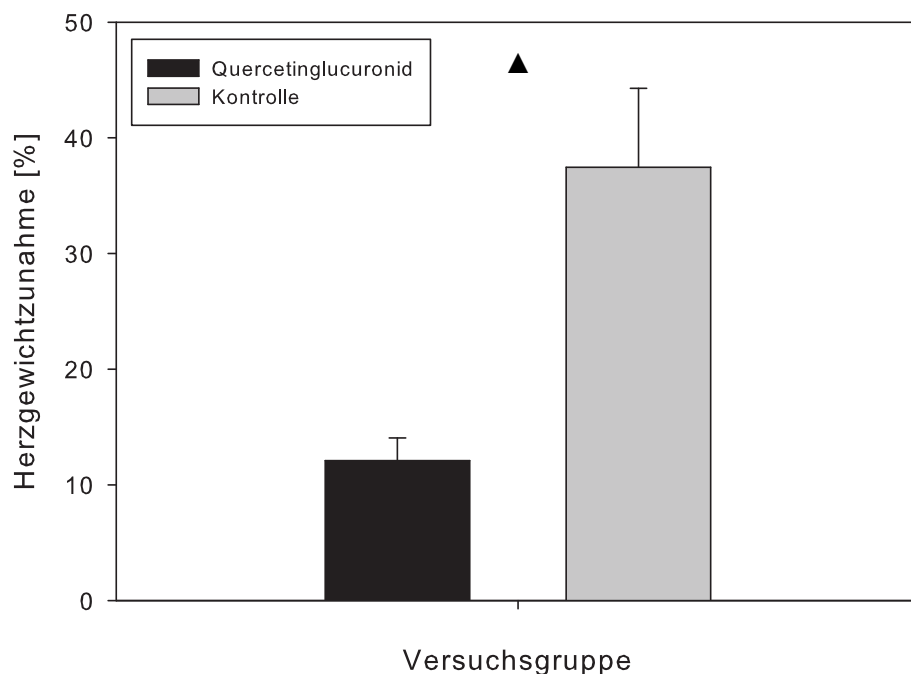


Abbildung 3.6: Herzgewichtszunahme

▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

Während in der Kontrollgruppe die Gewichtszunahme im Mittel 37 % betrug, kam es bei



den durch QG geschützten Herzen jedoch nur zu einer Erhöhung des Organgewichts um 12 %.

## 3.6 Hämodynamische Parameter

### 3.6.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

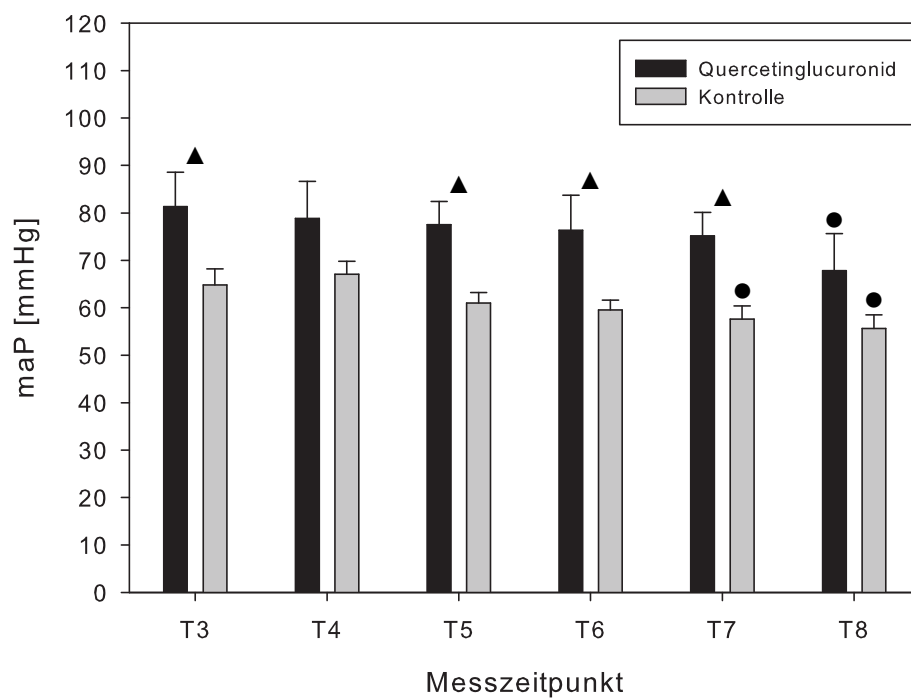


Abbildung 3.7: Mittlerer arterieller Druck (maP)

- $P < 0,05$  T<sub>3</sub> vs. T<sub>7</sub> und T<sub>8</sub>
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

Beim Aufbau des Perfusionssystems wurde durch die Höhe des Nachlastreservoirs festgelegt, dass die Herzen einen Druck von ca. 55 mmHg überwinden müssen. Aufgrund der Resistance des Schlauchsystems waren aber auch höhere Drücke im arteriellen Schenkel möglich.

Der mittlere arterielle Druck (maP) war bei der QG-Gruppe zu jedem Messzeitpunkt höher als bei der Kontrollgruppe, wobei in beiden Gruppen ein signifikanter Abfall des Druckes über die Zeit zu beobachten war. Der Anfangsdruck der QG-Gruppe von  $81 \pm 7$  mmHg fiel auf einen Endwert von  $68 \pm 8$  mmHg ab; bei der Kontrollgruppe lagen diese

Werte bei  $65 \pm 3$  mmHg und  $56 \pm 3$  mmHg. An den Zeitpunkten T<sub>3</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub> und T<sub>7</sub> waren die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant.

### 3.6.2 Links-atrialer Druck

Durch die Festlegung der Vorlastsäule auf eine bestimmte Höhe wurde der Links-atriale Druck (LAP) eingestellt.

Zwischen den Gruppen gab es zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied. Der LAP lag in der QG-Gruppe im Mittel bei 7 mmHg und in der Kontrollgruppe im Mittel bei 9 mmHg.

### 3.6.3 Herzzeitvolumenindex

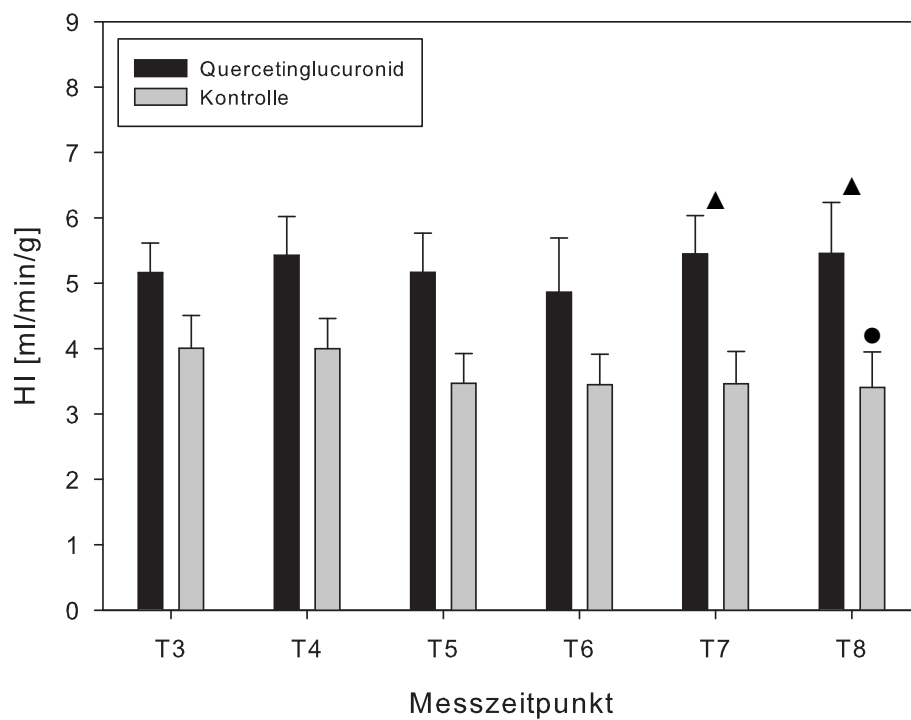


Abbildung 3.8: Herzzeitvolumenindex (HI)

- $P < 0,05$  T<sub>3</sub> vs. T<sub>8</sub>
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

Das Auswurfvolumen in Bezug auf das Herzgewicht und die Zeit wird durch den Herzzeitvolumenindex (HI) abgebildet.

Bei der Kontrollgruppe kam es vom Messzeitpunkt  $T_3$  bis  $T_8$  zu einem signifikanten Abfall von  $4,0 \pm 0,5$  ml/min/g auf  $3,4 \pm 0,5$  ml/min/g. In der QG-Gruppe zeigten sich im zeitlichen Verlauf dagegen stabile Werte an den Messzeitpunkten  $T_3$  ( $5,2 \pm 0,5$  ml/min/g) bis  $T_8$  ( $5,5 \pm 0,8$  ml/min/g). Der HI der QG-Gruppe war zu den Messzeitpunkten  $T_7$  und  $T_8$  signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

### 3.6.4 Schlagarbeitsindex

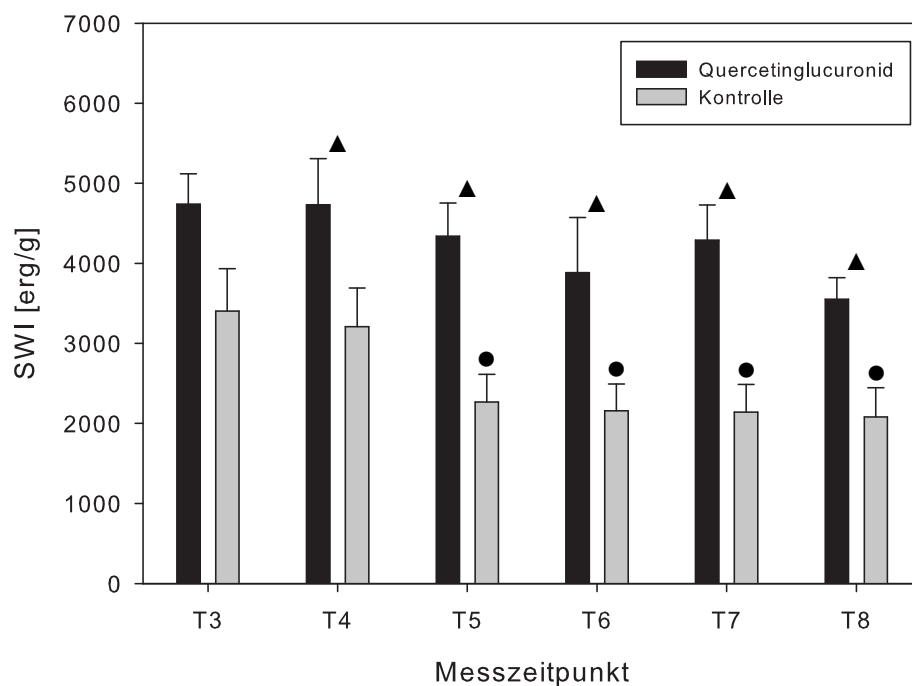


Abbildung 3.9: Schlagarbeitsindex (SWI)

- $P < 0,05$   $T_3$  vs.  $T_5$  bis  $T_8$
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

Mit dem Schlagarbeitsindex (SWI) kann die Druck- und Volumenleistung jedes Herzschlages berechnet werden.

Die QG-Gruppe war über die gesamte Versuchszeit hinweg leistungstärker als die Kontrollgruppe. Von Messzeitpunkt  $T_4$  bis  $T_8$  waren die Unterschiede signifikant. Während es in der QG-Gruppe zu keinem signifikanten Abfall des SWI im Versuchsverlauf kam,

war in der Kontrollgruppe der SWI ab dem Messzeitpunkt  $T_5$  jedoch signifikant reduziert. Der maximale Wert der QG-Gruppe am Messzeitpunkt  $T_3$  lag bei  $4741 \pm 380$  erg/g; der niedrigste Wert am Messzeitpunkt  $T_8$  ( $3554 \pm 267$  erg/g) war höher als der Maximalwert der Kontrollgruppe bei  $T_3$  ( $3406 \pm 529$  erg/g).

### 3.7 Myokardläsion

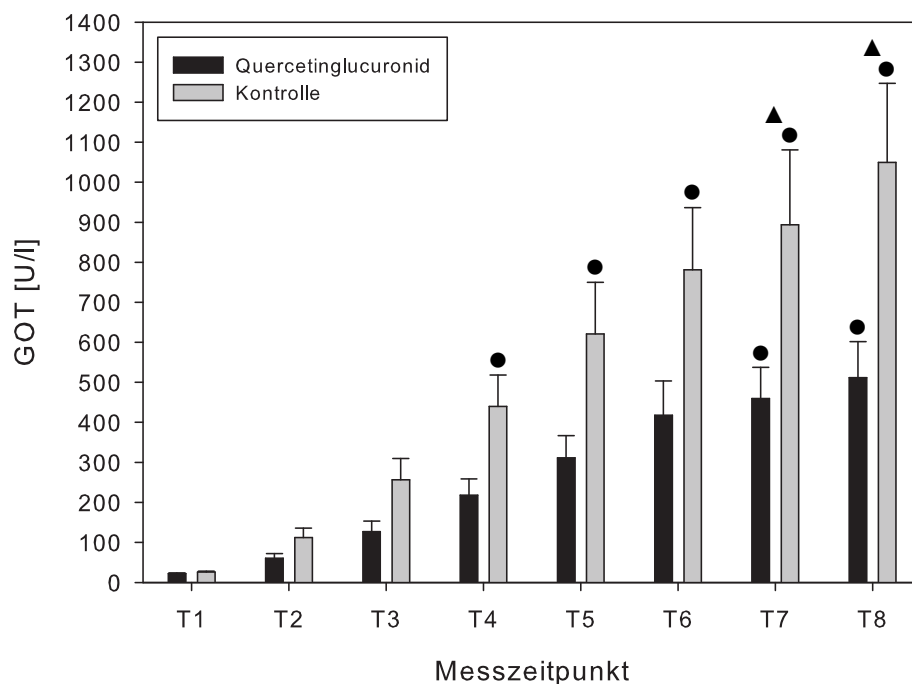


Abbildung 3.10: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

- $P < 0,05$   $T_1$  vs.  $T_7$  und  $T_8$  (Quercetinglucuronid) bzw.  $T_4$  bis  $T_8$  (Kontrolle)
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

Zur Quantifizierung des myokardialen Zelluntergangs wurden die unspezifischen Zelllyseparameter GOT und LDH sowie der herzspezifische Parameter CK-MB-Masse bestimmt. Alle drei Parameter haben einen tendenziell ähnlichen Verlauf, der auf einen geringeren Myokardschaden in der QG-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hindeutet. Die Parameter GOT und LDH zeigten einen kontinuierlich signifikanten Anstieg in beiden Gruppen vom Messzeitpunkt  $T_1$  bis  $T_8$ . Hierbei fanden sich bei der Kontrollgruppe stets höhere Mittelwerte als bei der QG-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied beider Gruppen bestand bei den Messzeitpunkten  $T_7$  und  $T_8$ . In der Kontrollgruppe ergab sich für GOT

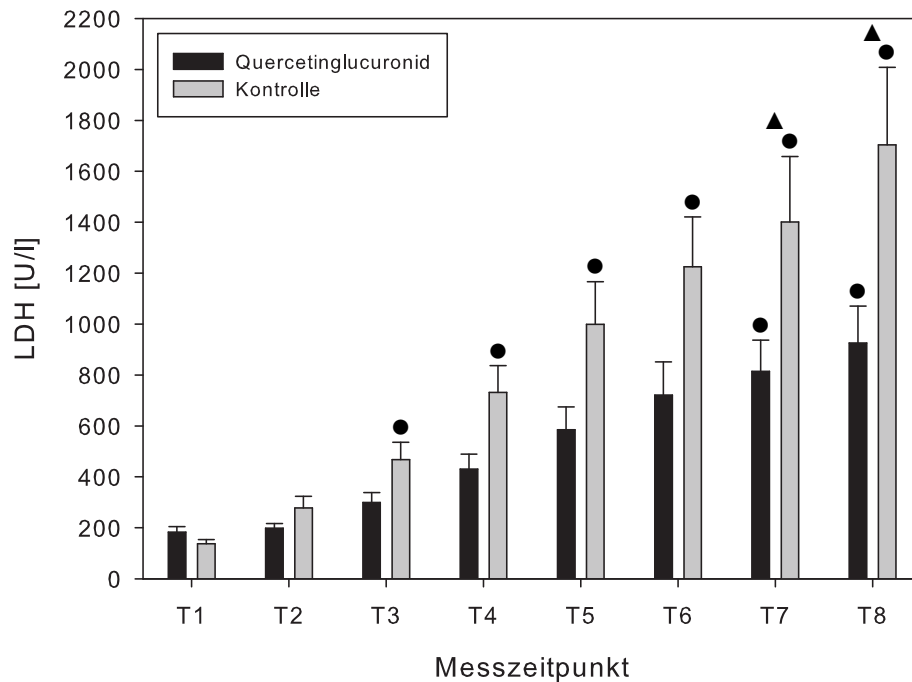


Abbildung 3.11: Laktatdehydrogenase (LDH)

- $P < 0,05$  T<sub>1</sub> vs. T<sub>7</sub> und T<sub>8</sub> (Quercetinglucuronid) bzw. T<sub>3</sub> bis T<sub>8</sub> (Kontrolle)
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

ein Anstieg von  $26 \pm 2$  U/l auf  $1049 \pm 198$  U/l und für LDH von  $138 \pm 16$  U/l auf  $1704 \pm 305$  U/l. In der QG-Gruppe zeigte sich ein GOT-Anstieg von  $22 \pm 2$  U/l auf  $512 \pm 90$  U/l und ein LDH-Anstieg von  $183 \pm 22$  U/l auf  $925 \pm 146$  U/l.

Beim Parameter CK-MB-Masse war in beiden Gruppen ebenso ein signifikanter Anstieg vom Messzeitpunkt T<sub>1</sub> bis T<sub>8</sub> zu verzeichnen. Auffällig waren dabei die zu jedem Messzeitpunkt höheren Werte der Kontrollgruppe und deren kontinuierlicher Anstieg vom Messzeitpunkt T<sub>1</sub> ( $6 \pm 1$  ng/ml) zu T<sub>8</sub> ( $200 \pm 42$  ng/ml). Bei der QG-Gruppe fand sich ein kontinuierlicher Anstieg der CK-MB-Masse lediglich vom Messzeitpunkt T<sub>1</sub> ( $4 \pm 1$  ng/ml) bis T<sub>6</sub>; danach zeigte sich bis zum Messzeitpunkt T<sub>8</sub> ( $109 \pm 35$  ng/ml) keine wesentliche Zunahme mehr. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte hierbei jedoch nicht gefunden werden.

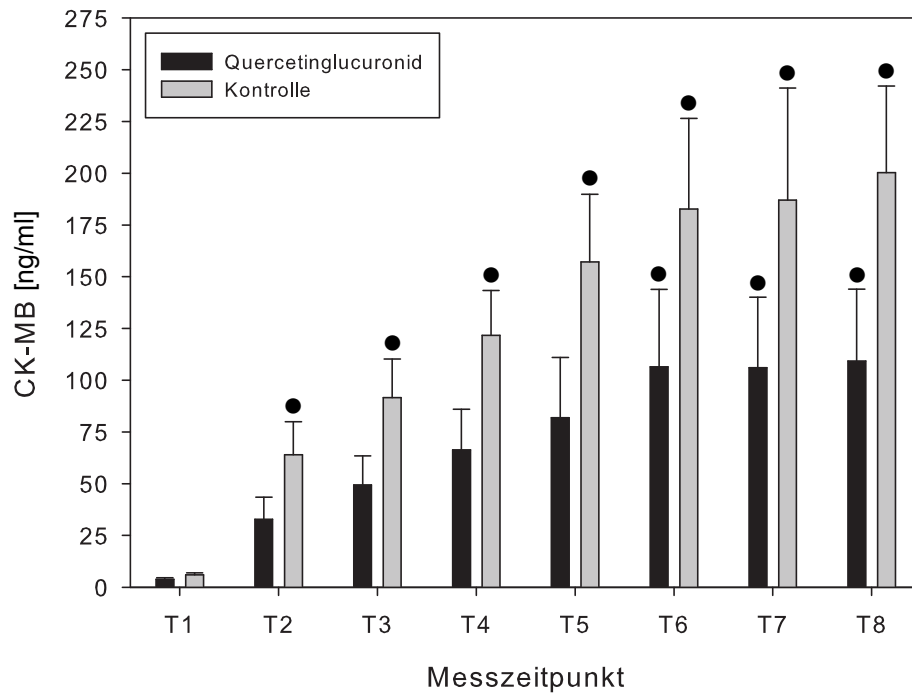


Abbildung 3.12: Creatinkinase-MB-Masse (CK-MB)

- $P < 0,05$   $T_1$  vs.  $T_6$  bis  $T_8$  (Quercetinglucuronid) bzw.  $T_2$  bis  $T_8$  (Kontrolle)

## 3.8 Myokardialer Metabolismus

### 3.8.1 Venöse Laktatkonzentration

Wenn das Myokard nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird, findet ein Wechsel von einer aeroben zur einer anaeroben Stoffwechsellaage statt. Dieser Wechsel geht mit höheren Laktatkonzentrationen im Blut einher.

Die beiden Gruppen hatten zu Beginn einen ähnlichen Ausgangswert der venösen Laktatkonzentration von  $2,41 \pm 0,28$  mmol/l in der Kontroll- und  $2,07 \pm 0,24$  mmol/l in der QG-Gruppe. Der Laktatverlauf unterschied sich allerdings deutlich. In der Kontrollgruppe kam es vom Messzeitpunkt  $T_1$  zu  $T_2$  zu einem signifikanten Anstieg, der sich bis  $T_5$  mit einer maximalen Konzentration von  $5,72 \pm 1,00$  mmol/l noch vergrößerte und anschließend wieder etwas abfiel. In der QG-Gruppe waren keine großen Schwankungen in der Laktatkonzentration zu finden. Der höchste Wert wurde hier am Messzeitpunkt  $T_8$

mit  $2,91 \pm 0,81$  mmol/l gemessen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand an den Zeitpunkten T<sub>3</sub> bis T<sub>5</sub>.

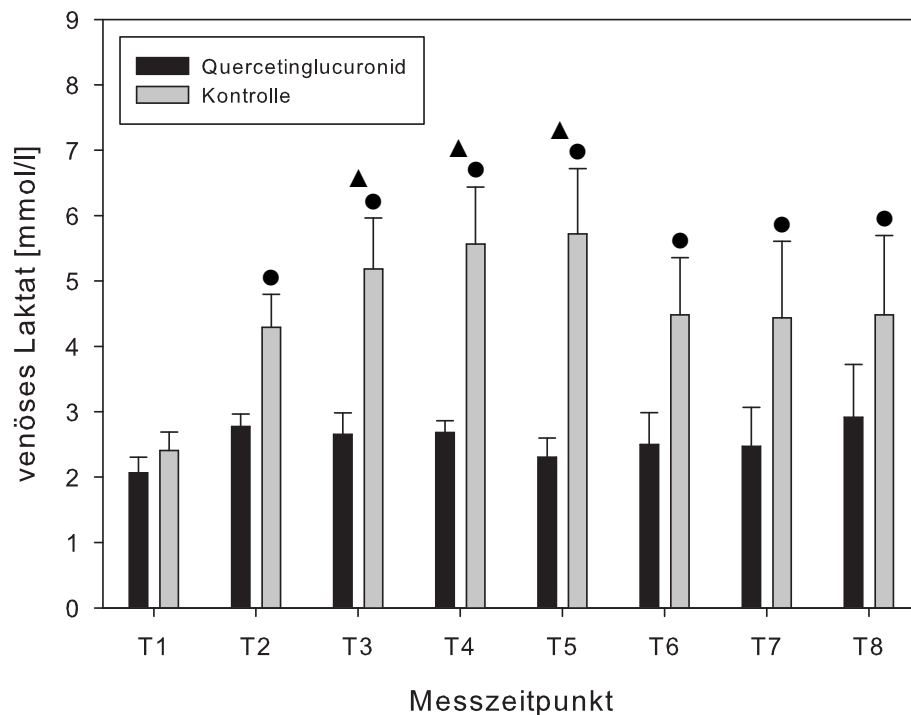


Abbildung 3.13: Venöse Laktatkonzentration

- $P < 0,05$  T<sub>1</sub> vs. T<sub>2</sub> bis T<sub>8</sub>
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

### 3.8.2 Arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz

Die arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz (AVDO<sub>2</sub>) zeigte in beiden Gruppen eine zu Beginn höhere Sauerstoffausschöpfung, die während des Versuchs kontinuierlich und signifikant abnahm. Bei der Kontrollgruppe kam es zwischen den Messzeitpunkten T<sub>7</sub> und T<sub>8</sub> jedoch erneut zu einem Anstieg der Sauerstoffausschöpfung. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen den beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt.

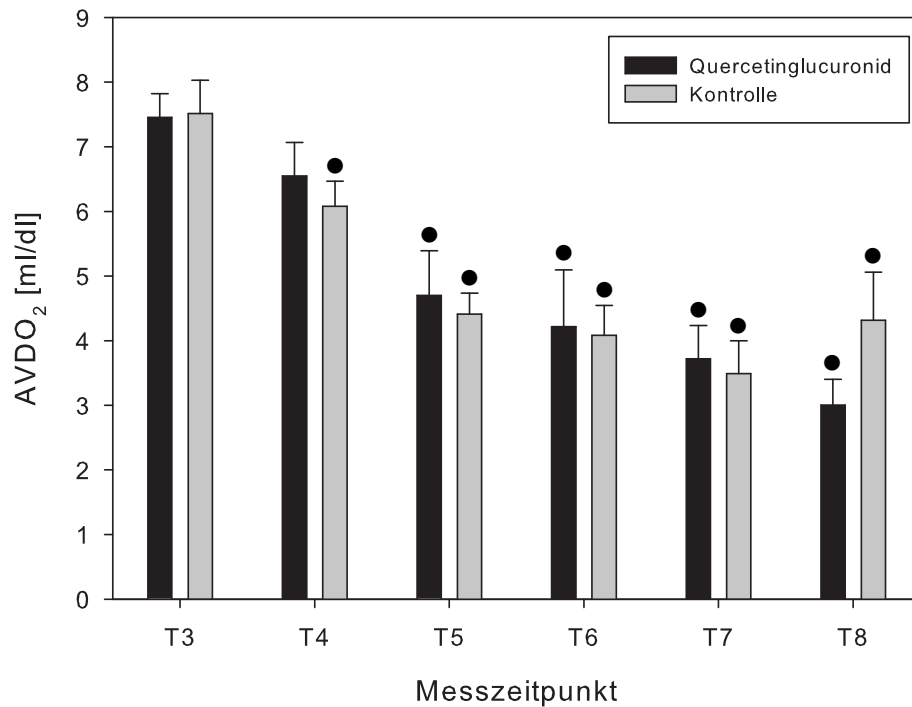


Abbildung 3.14: Arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz (AVDO<sub>2</sub>)

●  $P < 0,05$  T<sub>3</sub> vs. T<sub>5</sub> bis T<sub>8</sub> (Quercetinglucuronid) bzw. T<sub>4</sub> bis T<sub>8</sub> (Kontrolle)

### 3.8.3 Koronarer Blutflussindex

Der koronare Blutfluss pro Gramm Herzgewebe (CBFI) stieg in beiden Gruppen kontinuierlich über die Zeit an. Zwischen den Messwerten am Anfang und am Ende des Versuchs war in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme des Blutflusses zu erkennen. Für den CBFI wurden in der Kontrollgruppe am Messzeitpunkt T<sub>3</sub>  $0,72 \pm 0,09$  ml/min/g und am Messzeitpunkt T<sub>8</sub>  $1,72 \pm 0,18$  ml/min/g gemessen; die entsprechenden Werte bei der QG-Gruppe betrugen  $0,95 \pm 0,07$  ml/min/g und  $1,74 \pm 0,24$  ml/min/g. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zeigte sich nicht.



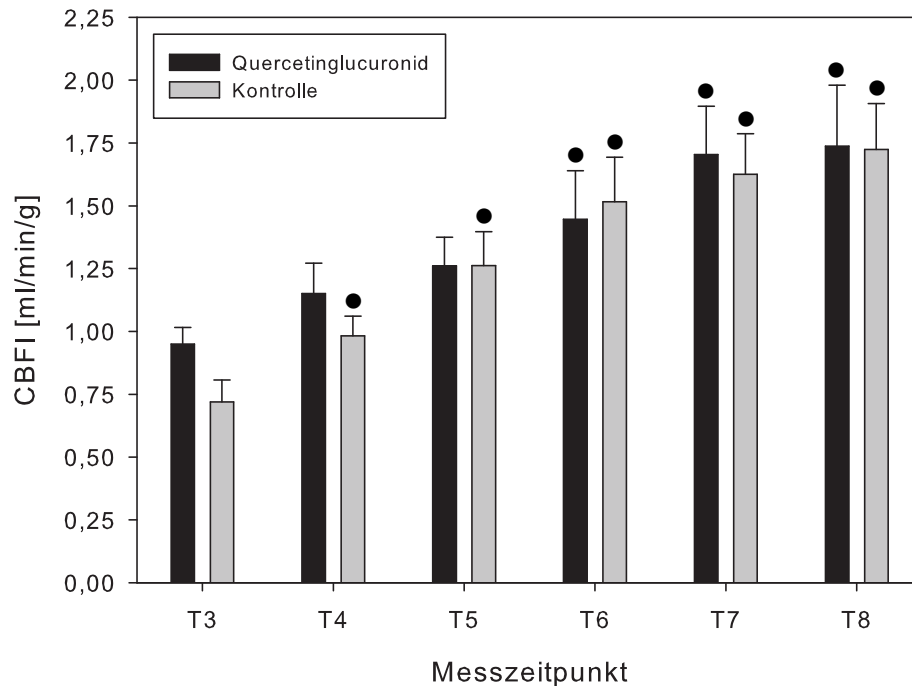


Abbildung 3.15: Koronarer Blutflussindex (CBFI)

- $P < 0,05$  T<sub>3</sub> vs. T<sub>6</sub> bis T<sub>8</sub> (Quercetinglucuronid) bzw. T<sub>4</sub> bis T<sub>8</sub> (Kontrolle)

### 3.8.4 Myokardiale Effizienz

Bei der Berechnung der Myokardialen Effizienz (ME) wird das Produkt aus Herzzeitvolumenindex (HI) und mittleren arteriellen Druck (maP) in Relation zum myokardialen Sauerstoffverbrauch ( $MVO_2$ ) gesetzt.

Zu Beginn fanden sich nur geringe Unterschiede zwischen beiden Gruppen, wobei die Kontrollgruppe einen Ausgangswert von  $52 \pm 7$  % und die QG-Gruppe von  $59 \pm 5$  % hatte. Am Messzeitpunkt T<sub>5</sub> ergab sich ein gegensätzlicher Verlauf beider Gruppen, was zu einem signifikanten Unterschied der Gruppen an den Messzeitpunkten T<sub>5</sub> bis T<sub>8</sub> führte. Die ME der QG-Gruppe stieg ab dem Messzeitpunkt T<sub>5</sub> leicht an und blieb bis zum Messzeitpunkt T<sub>8</sub> mit einem Maximalwert von  $72 \pm 8$  % tendenziell erhöht. Diese Veränderungen waren allerdings nicht signifikant. In der Kontrollgruppe kam es im Verlauf der Perfusion zu einem leichten Abfall der ME. Am Versuchsende wurde hier ein Minimalwert von  $32 \pm 6$  % gemessen, der signifikant niedriger war als die ME am Versuchsbeginn.

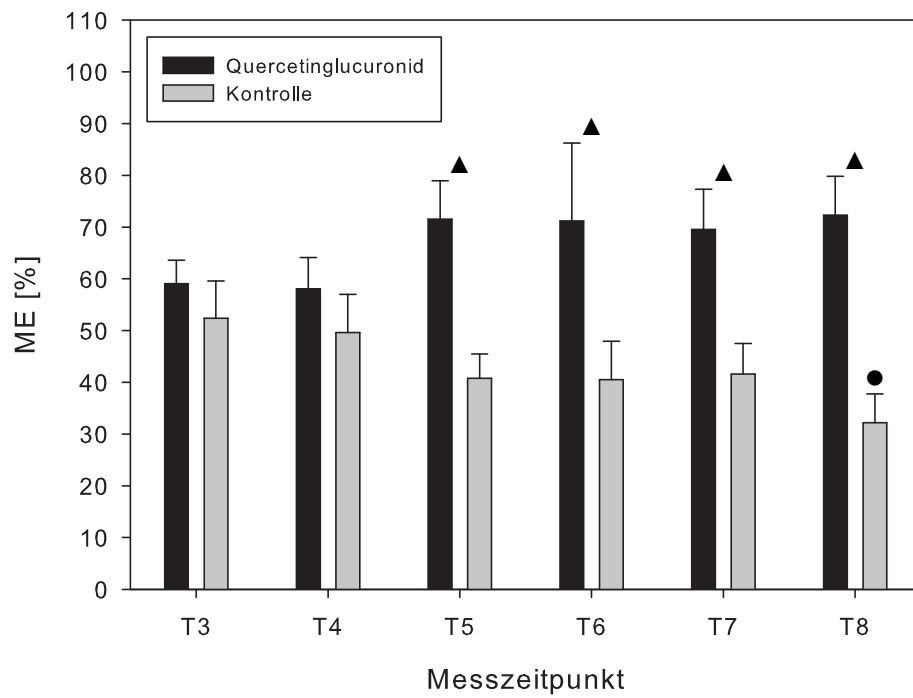


Abbildung 3.16: Myokardiale Effizienz (ME)

- $P < 0,05$  T<sub>3</sub> vs. T<sub>8</sub>
- ▲  $P < 0,05$  Quercetinglucuronid vs. Kontrolle

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Einführung

In Anlehnung an den von Juchem et al. [87] nachgewiesenen protektiven Effekt von Quercetin-3-glucuronid (QG) auf die Endothelfunktion unter inflammatorischen Bedingungen, setzten wir diese Substanz bei Untersuchungen zur hyperakuten Abstoßung (HAR) und Ischämie-Reperfusion (I/R) in einem xenogenen *ex vivo* Perfusionsmodell ein.

Wir konnten zeigen, dass die Gabe von QG mit der kardioplegen Lösung und im Perfusat neben einer positiven Wirkung auf inflammatorische Prozesse zu einer Steigerung der Herzfunktion, zu einem geringeren Myokardschaden sowie zu einem verbesserten myokardialen Metabolismus führte. In unserem Versuchsaufbau, bei welchem es zu einer massiven Schädigung der endothelialen Barriere kommt, konnte die für QG beschriebene endothelzellprotektive Wirkung nachgewiesen werden.

### 4.2 Wirkung von Quercetin-3-glucuronid im xenogenen Working-Heart-Modell

#### 4.2.1 Immunologische und inflammatorische Reaktion

Bei der Perfusion eines Schweineherzens mit humanem Blut im Rahmen der Xenotransplantation kommt es neben der Problematik des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R) in den ersten Minuten bis Stunden zur hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR). Aus-

gangspunkt dieser ist die Bindung präformierter natürlicher Antikörper (PNAK) aus dem humanen Blut an die Gefäßendothelzellen im Schweineherz. Es folgt die Aktivierung des Komplementsystems und damit verbunden eine unmittelbare Schädigung des Endothels [30, 31]. Das Ausmaß der Ablagerung der PNAK wurde durch die Messung des Abfalls der Anti-pig-Antikörper (APA) (Abbildung 3.1) bestimmt, welche sowohl  $\alpha$ -Gal-Antikörper (Gal-AK) als auch non- $\alpha$ -Gal-Antikörper (Non-Gal-AK) beinhalten. Die Ausgangswerte der PNAK waren in beiden Versuchsgruppen gleich hoch. Es zeigte sich, wie zu erwarten war, dass die PNAK-Bindung durch Quercetin-3-glucuronid (QG) nicht beeinflusst wurde und somit der initiale Schritt der HAR in beiden Gruppen in gleichem Maße stattfand. Die Größenordnung zwischen den Ausgangswerten und dem Abfall der APA war vergleichbar mit bisherigen Untersuchungen an einem analogen Versuchsaufbau [59, 88, 89].

In Folge der durch die PNAK-Bindung ablaufenden Immunprozesse und der vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen im Rahmen der I/R kommt es am Endothel unmittelbar bei Perfusionsbeginn zu einer Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten. In unseren Versuchen war bei der Therapie mit QG 10 Minuten nach Reperfusion ein signifikant niedrigerer Abfall der Leukozyten (Abbildung 3.2) gegenüber der Kontrollgruppe zu sehen. *In vitro* Studien mit aktivierten Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen konnten eine Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1 und ICAM-1) unter Anwesenheit von QG und Quercetin zeigen [80, 79]. Zusätzlich war dies bei Quercetin auch für die Expression von E-Selektin zu beobachten [79]. Dies könnte den initialen Unterschied im Abfall der Leukozytenzahlen in unseren Versuchen erklären.

Im weiteren Verlauf kam es in beiden Gruppen zu einer stetigen, jedoch nur allmählichen Verringerung der Leukozytenkonzentration. Dies ist zum einen durch das Fortschreiten der in Gang gesetzten HAR und den I/R-Schaden zu erklären; zum anderen kann hierfür auch der Versuchsaufbau verantwortlich sein. Bei Kontakt des Blutes mit den nicht-physiologischen Oberflächen des Schlauchsystems kommt es zur Initiierung immunologischer Prozesse mit Zellaktivierung [90]. Zudem kann es durch den Einsatz einer Rollerpumpe zur mechanischen Zelllyse kommen. Diese Vorgänge konnten durch die Zugabe von QG nicht beeinflusst werden.

Bei der Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen werden Entzündungsmediatoren, wie das Zytokin Interleukin 6 (IL-6) freigesetzt, welches sowohl die Leukozytenaktivierung als auch deren Adhäsion am Endothel verstärkt [81]. Um die Herkunft des IL-6 differenzieren zu können, wurde neben dem humanen IL-6 (Abbildung 3.5), welches in unserem Versuchsaufbau von den Leukozyten im Perfusat gebildet wurde, zusätzlich das porcine IL-6 (Abbildung 3.4) bestimmt. Dieses stammte ausschließlich aus den Schweineherzen und wurde dabei insbesondere von den porcinen Endothelzellen produziert. Eine hohe Spezifität der hierbei verwendeten ELISAs mit geringer Kreuzreaktivität ermöglichte diese Differenzierung [91, 92].

Mit leichter zeitlicher Verzögerung kam es nach dem Abfall der Leukozytenzahlen zu einem Anstieg des humanen und später auch des porcinen IL-6. Zwischen der QG- und der Kontrollgruppe war analog zu den Veränderungen der Leukozytenzahl zu Beginn auch ein signifikanter Unterschied bei der Veränderung der humanen IL-6-Konzentration zu verzeichnen. Einem weniger stark ausgeprägten initialen Abfall der Leukozyten unter QG folgte auch ein anfänglich reduzierter Anstieg der humanen IL-6-Konzentration. Flavonoide können also einen direkten Einfluss auf die Zytokinproduktion von humanen Leukozyten haben. Auch ein *in vitro* Versuch an humanen mit Lipopolysachhariden stimulierten neutrophilen Granulozyten zeigte eine signifikant reduzierte Ausschüttung von IL-6 unter dem Einfluss von Quercetin, was sich zudem durch eine geringere intrazelluläre Konzentration und mRNA Menge von IL-6 bestätigen ließ [81]. Diese für Quercetin nachgewiesene Eigenschaft kann neben dem geringeren Leukozytenabfall in der QG-Gruppe am Versuchbeginn zu dem signifikanten Unterschied in der humanen IL-6 Konzentration beigetragen haben.

Beim Anstieg des porcinen IL-6 zeigte sich hingegen kein Unterschied zwischen den Gruppen, was darauf hindeutet, dass die Endothelzellen in beiden Gruppen durch die oben genannte Bindung der PNAK und der nachfolgenden Komplementaktivierung auf ähnliche Weise aktiviert wurden. Eine inhibitorische Wirkung von QG auf die IL-6-Ausschüttung der Endothelzellen konnte in unseren Versuchen nicht ermittelt werden. Im Gegensatz hierzu konnte Reiterer et al. zeigen, dass durch Quercetin die Produktion von IL-6-mRNA bei mit Linolsäure aktivierten porcinen Endothelzellen reduziert werden

konnte [82]. Hierzu waren jedoch weitaus höhere Konzentrationen des Flavonoids notwendig, die in unseren Versuchen durch die Verdünnung im Perfusat nicht vorlagen.

Die inflammatorischen und immunologischen Vorgänge der HAR sowie der I/R führen zu einer Erhöhung der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität und zu venulären Thrombosen, die Gewebseinblutungen nach sich ziehen [30, 32, 38, 37]. Dies hat eine deutliche Gewichtszunahme des perfundierten Gewebes durch Ödembildung und interstitielle Hämorrhagien zur Folge. In unseren Versuchen kam es in der Kontrollgruppe zu einer circa dreifach höheren Gewichtszunahme im Vergleich zur QG-Gruppe. Makroskopisch waren die Herzen der QG-Gruppe wesentlich weniger von Ödemen und Hämorrhagien betroffen als die der Kontrollgruppe. Eine Erklärung hierfür liefert die stabilisierende Eigenschaft von QG auf die endotheliale Barrierefunktion, die eine Ödembildung und Extravasation von Blutzellen verhindert [87]. Juchem et al. konnten zeigen, dass sich unter inflammatorischen Bedingungen interzelluläre Lücken im Endothel ausbilden, die zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führen. Dieser Vorgang konnte durch die Zugabe von QG verhindert oder innerhalb von Stunden wieder rückgängig gemacht werden. Im Endothel bewirkt QG einen Umbau des intrazellulären Aktinsystems wodurch eine höhere Stabilität der Zellen entsteht und die endotheliale Barrierefunktion positiv beeinflusst wird. Blutbestandteile gelangen in geringerem Maße in das umliegende Gewebe und die Kontraktion der Endothelzellen wird vermindert [87].

Die Intaktheit des Endothels führt zu einer geringeren Präsentation von subendothelialen Strukturen und dadurch auch zu einer weniger ausgeprägten Thrombozytenaktivierung und -adhäsion. In verschiedenen Studien ließ sich für Flavonoide, wie Quercetin und QG, eine antithrombotische Wirkung durch Verhinderung der Plättchenaggregation nachweisen [85, 86, 87]. Trotz des makroskopisch sichtbaren Unterschieds zwischen den Herzen der Kontroll- und der QG-Gruppe war in unseren Beobachtungen zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied des Thrombozytenabfalls (Abbildung 3.3) messbar. Der prothrombotische Stimulus durch die HAR, die I/R und den Versuchsaufbau mit Oberflächen aus Fremdmaterialien ist bei unseren Untersuchungen zu gravierend, als dass die antithrombotische Wirkung von QG in diesem Maße zum Tragen kommt.

Durch die I/R kommt es zum oxidativen Stress mit Bildung von reaktiven Sauerstoffspe-

zies (ROS), die in der Lage sind Zellstrukturen zu zerstören und dadurch eine zusätzliche Schädigung des Endothels und des Myokards herbeizuführen. Sowohl QG als auch andere Flavonoide gelten als antioxidativ wirkende Substanzen, indem sie ROS entweder direkt abfangen oder sie die Aktivität bzw. Expression von Enzymen, wie die Xanthinoxidase und die NADPH-Oxidase, inhibieren [87, 78, 61, 66]. Auch diese bekannten Effekte von QG könnten bei unseren Untersuchungen die teilweise beobachteten Unterschiede der inflammatorischen Reaktionen in den Versuchsgruppen erklären. Im Rahmen unserer Studie wurde dies jedoch nicht untersucht.

Die dargestellten protektiven Wirkungsmechanismen von QG bei den immunologischen und inflammatorischen Vorgängen während der HAR und der I/R haben auch eine direkte Auswirkung auf die Herzfunktion und das Myokard der porcinen Herzen.

#### **4.2.2 Herzfunktion**

Bei der Betrachtung der Herzfunktionsparameter wird der protektive Effekt von Quercetin-3-glucuronid (QG) im xenogenen Working-Heart-Modell besonders deutlich. Sowohl bei der Druck- als auch bei der Volumenarbeit erwiesen sich die mit dem Zusatz von QG perfundierten Herzen als leistungstärker.

Bei der Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes (maP) (Abbildung 3.7) konnte in der QG-Gruppe fast über die gesamte Versuchszeit ein signifikant höherer Wert aufgezeichnet werden.

Über das Vorlastreservoir wurde den Herzen das Blut zur Füllung des linken Vorhofs angeboten. Es war auffällig, dass trotz der durch den Versuchsaufbau festgelegten statischen Vorlast ein im Durchschnitt etwas geringerer links-atriale Druck (LAP) in der QG-Gruppe zu verzeichnen war. Dies lässt sich auf die sehr gute Pumpfunktion der Herzen in der QG-Gruppe zurückführen, durch die das angebotene Blutvolumen effektiver ausgeworfen werden konnte. Hierbei kann eine Sogwirkung auf das Vorlastreservoir entstehen, da der Blutfluss durch den Widerstand des Schlauchsystems begrenzt wird.

Eine bessere und nach 150 Minuten signifikant höhere Auswurfleistung der QG-Gruppe wurde auch bei der Berechnung des Herzzeitvolumenindex (HI) (Abbildung 3.8) sichtbar. Bei der Kontrollgruppe kam es hingegen zu einem signifikanten Abfall des HI von

Versuchsbeginn bis Versuchsende, was den Beobachtungen in vorhergehenden Versuchen der Arbeitsgruppe entsprach. Brandl et al. erreichten bei Versuchen mit hDAF-transgenen Herzen, die zusätzlich das  $\alpha$ -Gal-Analogon GAS914 erhielten, Höchstwerte des HI von ca. 4 ml/min/g [59]. Diese entsprachen ungefähr den Werten unserer Kontrollgruppe, waren jedoch deutlich geringer als die der QG-Gruppe.

Die insgesamt stärkere Leistung der Herzen in der QG-Gruppe stellte sich insbesondere bei der Bestimmung des Schlagarbeitsindex (SWI) (Abbildung 3.9) dar. Dieser Parameter berücksichtigt sowohl die Volumen- als auch die Druckkomponente der Herzarbeit und ist daher in besonderem Maße für die Bewertung der Herzleistung geeignet. Bereits nach 90 Minuten konnten wir eine signifikant bessere Leistung in der QG-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnen, die bis zum Perfusionsende erhalten blieb. Die mittleren SWI-Werte der QG-Gruppe am Versuchsende waren sogar höher als die Anfangswerte der Kontrollgruppe. Bemerkenswert ist, dass die mit dem Zusatz von QG perfundierten Herzen leistungsstärker waren als hDAF-transgene Herzen ohne bzw. mit einer effektiven Gerinnungshemmung durch Tirofiban [60, 52].

Sowohl bei der Bestimmung des HI als auch des SWI beobachteten wir Werte, die deutlich über Vergleichsparametern aus vorhergehenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe lagen. Hierzu haben maßgeblich die Modifikationen am Perfusionssystem beigetragen, welche aus physiologischer Sicht die früheren Versuche optimierten. Zur Konnektion der Herzen mit dem Perfusionssystem verwendeten wir Kanülen, die im Vergleich zu den früheren Studien einen größeren Innendurchmesser besaßen. Somit wurde keine funktionelle Stenose im Ausflusstrakt der Herzen erzeugt. Zusätzlich dazu erreichten wir durch den Einbau eines Windkessels in der Aorta eine Verringerung der Druckdifferenz zwischen Systole und Diastole. Dies wirkte sich positiv auf die Perfusion der Koronargefäße und somit auch auf die Herzversorgung aus. Eine entscheidende Veränderung nahmen wir an der Zusammensetzung des Perfusats vor. Bedingt durch das Perfusionssystem ist es nötig, die zur Verfügung stehenden 500 ml Blut durch Zugabe einer Lösung in ihrem Volumen zu vergrößern. In den vorhergehenden Versuchen wurde hierzu NaCl 0,9% verwendet. Wir entschieden uns hingegen, ein Plasmaersatzmittel zu verwenden, das aus physiologischer Sicht enorme Vorteile bietet. Es wirkt kolloidosmotisch und enthält eine balancierte



Elektrolytzusammensetzung. Da die Modifikationen des Versuchsaufbaus jedoch in der Kontroll- und der QG-Gruppe gleichermaßen erfolgten, haben diese keinen Einfluss auf den beobachteten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Die in unseren Versuchen deutlich bessere Herzleistung der QG-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe steht möglicherweise im Zusammenhang mit einem ausgeprägterem Myokardschaden durch die HAR und die I/R bei den Kontrollherzen.

### **4.2.3 Myokardläsion und myokardialer Metabolismus**

Die direkte Schädigung des Myokards und der damit verbundene Untergang von Myozyten durch die HAR und den I/R-Schaden wurden laborchemisch untersucht. In dem von uns verwendeten Versuchsaufbau wurden intrazelluläre Enzyme vorrangig aus geschädigten Myozyten und Blutzellen freigesetzt. Hierbei kann zwischen spezifischen Myokardmarkern, die weitestgehend nur in Myozyten vorkommen, und unspezifischen Parametern, die sowohl von Herzmuskelzellen als auch von Blutzellen stammen, unterschieden werden.

Bei dem spezifischen myokardialen Zelllyseparameter Creatinkinase Subtyp MB (CK-MB-Masse) (Abbildung 3.12) kam es in der Kontrollgruppe bereits 10 Minuten nach Beginn der xenogenen Perfusion zu einem statistisch signifikanten Anstieg, wohingegen in der QG-Gruppe ein solcher erst nach 120 Minuten zu verzeichnen war. Ab diesem Zeitpunkt hielten sich die CK-MB-Werte der QG-Gruppe stabil auf diesem Niveau; in der Kontrollgruppe kam es allerdings zu einem stetigen Anstieg bis zum Versuchsende. Aufgrund der großen Streuung der Parameter war zwischen den Versuchsgruppen jedoch zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied nachzuweisen.

Bei den beiden unspezifischen Parametern Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) (Abbildung 3.10) und Laktatdehydrogenase (LDH) (Abbildung 3.11) war ein signifikant höherer Anstieg in der Kontrollgruppe über die Versuchszeit zu verzeichnen. Diese Parameter werden allerdings nicht nur durch den Myokarduntergang freigesetzt, sondern entstehen auch bei anderen durch das Perfusionssystem bedingten Zellschädigungen, wie z.B. der Lyse von Blutzellen.

Anhand der Messung der Zelllyseparameter werden die bereits beschriebenen protekti-

ven Wirkungsweisen von QG bei inflammatorischen und immunologischen Vorgängen verdeutlicht. Eine verbesserte Endothelfunktion und das dadurch verminderte Auftreten von Hämorrhagien und Gewebsödemen führt auch zu einer laborchemisch nachweisbaren geringeren Schädigung des Myokards auf Zellebene.

Als Folge der Schädigung durch die HAR bzw. die I/R und der Unterversorgung des Organs mit Sauerstoff kommt es im Myokard zu einem anaeroben Stoffwechsel, für welchen die venöse Laktatkonzentration (Abbildung 3.13) in unseren Versuchen als Marker diene. Eine während der Reperfusion persistierende Laktatausschüttung deutet auf eine inadäquate Protektion des Myokards und eine verspätete Erholung des regulären aeroben Metabolismus hin [41, 45]. In der Kontrollgruppe war eine stets und zeitweise auch signifikant höhere Laktatkonzentration zu detektieren. Die QG-Gruppe erreichte dagegen lediglich eine venöse Laktatkonzentration, die mit Werten von allogenen perfundierten Herzen aus unserer Arbeitsgruppe vergleichbar ist. Dies zeigt, dass die mit dem Zusatz von QG perfundierten Herzen wieder schneller und effektiver einen aeroben Stoffwechsel aufnahmen, welches in Zusammenhang mit der geringeren Myokardschädigung, der besseren Herzfunktion und einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff steht.

Um die myokardiale Sauerstoffversorgung näher zu analysieren, wurde der koronare Blutflussindex (CBFI) und die arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz ( $AVDO_2$ ) bestimmt. Der CBFI (Abbildung 3.15) stieg während des Versuchs in beiden Gruppen stetig an. Der zu Beginn noch geringe CBFI lässt sich durch die während der kalten Ischämiezeit angefallenen vasokonstriktiven Substanzen, wie Endothelin, und den Verlust von NO erklären. Schmoeckel et al. maßen im xenogenen *ex vivo* Perfusionsmodell gerade zu Beginn eine hohe Endothelin-1-Konzentration, die im Verlauf abfiel. Im Gegenzug stieg der CBFI in etwa vergleichbar mit den Messungen unserer Gruppen an [52]. Bei Versuchsbeginn war der CBFI in der QG-Gruppe etwas höher als in der Kontrollgruppe, was auf eine verstärkte Produktion des Vasodilatators NO durch QG hindeuten kann. Bei der Zugabe von aus Flavonoiden bestehenden Rotweinextrakt zu humanen Endothelzellen von Umbilikalvenen konnte eine erhöhte Expression von endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und dadurch eine gesteigerte Bildung von NO ermittelt werden [77]. Diese Wirkungsweise wurde auch im Zusammenhang mit dem Nutzen der Flavonoide bei myokardialem

I/R-Schaden beschrieben [78].

Die  $AVDO_2$  (Abbildung 3.14) verlief in beiden Gruppen gegenläufig zum CBFI, da die Sauerstoffversorgung des Myokards durch die sich mit der Zeit verbessernde Koronardurchblutung aufrechterhalten wurde.

Auffällig ist, dass beide Gruppen zwar einen relativ identischen Sauerstoffverbrauch hatten, die Herzen der QG-Gruppe jedoch eine deutlich höhere Leistung erbrachten als die der Kontrollgruppe. Dies zeigte sich eindrücklich bei der Berechnung der myokardialen Effizienz (ME) (Abbildung 3.16), die ab 90 Minuten Perfusionsdauer bei der QG-Gruppe signifikant besser war als bei der Kontrollgruppe. In dieser war sogar ein stetiger Abfall der ME zu messen, der in der QG-Gruppe bis zum Versuchsende nicht auftrat. Für den Vergleich der Gruppen war wichtig, dass trotz abnehmender ME bei den Kontrollherzen in allen Versuchen die festgesetzte Perfusionsdauer von 180 Minuten erreicht wurde.

### **4.3 Limitationen des verwendeten Working-Heart-Modells**

Als Versuchsaufbau diente ein erstmals von Forty et al. [48] beschriebenes *ex vivo* Perfusionsmodell, welches die Untersuchung der hyperakuten Abstoßung (HAR) und des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R) an xenoperfundierten Herzen ermöglicht. Das hier verwendete System wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München nachgebaut und weiterentwickelt. Es hat sich ebenso wie bauähnliche Modelle durch seinen standardisierten Aufbau und die damit verbundene gute Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen bei Untersuchungen zur Xenotransplantation über Jahre bewährt [49, 50, 51, 52]. Eine exakte Abbildung physiologischer Bedingungen und Abläufe ist im *ex vivo* Modell allerdings nicht möglich.

Durch die Konstruktion als Links-Herz-Belastungssystem ist die Beurteilung der Herzfunktion auf das linke Herz beschränkt.

Im Gegensatz zum Gefäßsystem ist der Innendurchmesser des Schlauchsystems festgelegt und kann sich durch die fehlenden elastischen Eigenschaften nicht anpassen. Um die Druckdifferenz zwischen Systole und Diastole zu verringern, bauten wir einen Windkessel distal der Aortenklappe in das Schlauchsystem ein, um die elastische Funktion der Aorta zu simulieren. Hierdurch wurde der systolische Spitzendruck reduziert und zugleich

der Mitteldruck erhöht, was zu einem etwas physiologischeren Blutfluss in den Koronargefäßen führte.

Da während des Versuchsablaufs das Perfusat in ständigem Kontakt mit den nicht-physiologischen Oberflächen des Schlauchsystems und des Oxygenators steht, kann es zur Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten kommen. Zudem wird das Komplementsystem aktiviert und die Bildung von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gefördert [90]. Dieser Problematik steht man bei jeder extrakorporalen Perfusion, insbesondere im Rahmen herzchirurgischer Operationen, gegenüber. Um sowohl die Aktivierung und Adhäsion von Zellen als auch die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems zu reduzieren, wurden in den Versuchen mit Phosphorylcholin (Ph.I.S.I.O<sup>®</sup>, Sorin Group, Italien) beschichtete Schlauchsysteme und Oxygenatoren verwendet. Der Einsatz von Heparin als Inhibitor der plasmatischen Gerinnung war analog zu dessen Einsatz bei klinisch verwendeten Herz-Lungen-Maschinen. Allerdings brachte dies mit sich, dass eine Beurteilung der plasmatischen Gerinnung nicht möglich war.

Die zur Bereitstellung von ausreichend oxygeniertem Blut in der Vorlastsäule benötigte Rollerpumpe trägt zusätzlich zu einem Verlust von Blutzellen bei, da diese durch mechanische Belastung zerstört werden. Dies hat einen kontinuierlichen Abfall der Blutzellen während des Versuchs zur Folge.

Der Entstehung von Luftblasen und der damit verbundenen Gefahr der Luftembolie und der Aktivierung des Immun- und Gerinnungssystems wurde durch sorgfältiges Entlüften des Systems und des Herzens entgegengewirkt. Eine komplette Vermeidung des Entstehens von Verwirbelungen und Kontakt des Perfusats mit Luft ist allerdings nicht möglich, wodurch eine gewisse Aktivierung des Immun- und Gerinnungssystems nicht ausgeschlossen werden konnte.

Da dem System für den Stoffwechsel wichtige Organe fehlen, war eine ständige Kontrolle des Perfusats von entscheidender Bedeutung. So konnte gewährleistet werden, dass dem Herzen ausreichend Sauerstoff und Glucose zur Energieversorgung zur Verfügung steht. Ebenso hatte man in gewissem Maße die Möglichkeit in den Säure-Base- und Elektrolythaushalt einzugreifen, wenn dies nötig war. Als limitierender und nicht beeinflussbarer Faktor der langfristigen Perfusion muss das Fehlen von Leber und Niere angesehen

werden, welches zur Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte im Perfusat führt. Die Akkumulation dieser Stoffe kann im Verlauf das Herz schädigen und dessen Funktion einschränken. Zur Minimierung dieser Problematik, wurde bei den Versuchen eine beschränkte Perfusionsdauer von 180 Minuten festgesetzt.

Die hier diskutierten Einschränkungen des Perfusionssystems betreffen die Kontroll- und QG-Gruppe in gleichem Maße und haben somit keinen Einfluss auf den Vergleich beider Gruppen untereinander. Sie müssen aber bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse unserer Untersuchungen berücksichtigt werden.

## **4.4 Relevanz von Quercetin-3-glucuronid für die Xenotransplantation**

Ein großer Schritt auf dem Weg zu einer erfolgreichen Xenotransplantation, ist die Möglichkeit der Züchtung transgener Schweine. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Modifikation von Genen, die insbesondere für die Problematik der Antikörperbindung und Komplementaktivierung im Rahmen der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) verantwortlich sind. Zum einen sind dies Gene, die regulatorische Proteine des Komplementsystems exprimieren und zum anderen Gene, die die  $\alpha 1,3$ -Galaktosyltransferase codieren, welche für die Bildung der Gal $\alpha(1,3)$ Gal-Kohlenhydratreste auf dem Endothel verantwortlich ist.

Komplementregulatorproteine greifen hemmend in die Komplementkaskade ein und verhindern somit eine überschießende Aktivierung des Komplementsystems. Beobachtungen von Atkinson und White et al. [93, 94] deuten darauf hin, dass es bei unterschiedlichen Spezies zu Inkompatibilitäten der Komplementregulatorproteine kommt, die unter xeno-genen Bedingungen ihrer Aufgabe als Inhibitoren nicht gerecht werden. Hingegen waren Zelllinien von Mäusen, die humane Komplementregulatorproteine bildeten, vor Angriffen des humanen Komplementsystems geschützt. Der Einsatz solcher transgener Tiere erscheint bei der Verhinderung der HAR in der Xenotransplantation sinnvoll. Inzwischen wird insbesondere die quantitative Ausprägung der Komplementregulatorproteine für deren Wirksamkeit als wichtig erachtet [95].

In Versuchen zur Xenotransplantation kommen heute folgende humane Komplementregulatorproteine (hCRP) zum Einsatz, die eine erhöhte Resistenz der Transplantate gegenüber eines komplementvermittelten Schadens erreichen:

- hCD55 (hDAF = human Decay Acceleratin Factor) greift sehr früh in die Komplementkaskade ein, da es den Abbau der C3-Konvertase beschleunigt [95, 53, 96].
- hCD46 (hMCP = human Membran Cofactor Protein) dient als Kofaktor für die Inaktivierung der Komplementfaktoren C3b und C4b [95, 54, 97].
- hCD59 (human Protectin) blockiert erst am Ende der Komplementkaskade die Bildung des Membranangriffskomplexes, indem es die Verbindung der Komplementfaktoren C9 und C8 verhindert [95, 55].

Phelps et al. [98] und Dai et al. [99] klonierten erstmalig  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase-Knockout-Schweine (Gal-KO), durch welche die Bildung endothelialer Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antigene im Spendertier ausgeschaltet wird. Es kommt folglich zu keiner Bindung präformierter Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper (Gal-AK) aus dem Empfängerblut an das Spenderendothel, wodurch der Hauptauslöser der HAR beseitigt ist. In den ersten Schwein-Pavian-Transplantationen mit Gal-KO-Herzen von Kuwaki et al. [56] und Tseng et al. [57] war ein verlängertes Organüberleben zu verzeichnen. Dies bestätigte sich auch in späteren Versuchen [58, 29].

Durch die Kombination von Gal-KO mit humanen Komplementregulatorproteinen erhoffte man sich, die Problematik der HAR weitestgehend zu überwinden. In neueren Studien wird jedoch immer deutlicher, dass neben den Gal-AK auch non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper (non-Gal-AK) eine entscheidende Rolle bei den xenogenen Abstoßungsreaktionen spielen. Im Vergleich zu den Gal-AK ist die Konzentration der non-Gal-AK im Blut von Menschen und nicht-humanen Primaten zwar geringer, allerdings wurde im Verlauf von experimentellen Xenotransplantationen eine verstärkte Produktion von non-Gal-AK durch Sensibilisierung beobachtet [29, 58, 57, 96, 100].

Non-Gal-AK sind in der Lage einen Transplantatschaden zu bewirken, der durch Antikörperbindung und Komplementaktivierung an den Gefäßendothelien vermittelt ist. In verschiedenen Untersuchungen waren non-Gal-AK in der Lage, an porcine aortale Endo-

thelzellen von Gal-KO-Tieren zu binden und auf diese zytotoxisch und lysierend zu wirken [101, 100, 28].

Bei heterotoper xenogener Herztransplantation von Gal-KO-Schweinen zu Pavianen wurde ohne Immunsuppression ein Organversagen innerhalb von 24 Stunden beobachtet. Histopathologisch zeigte sich ein durch Antikörper vermittelter Schaden mit vaskulärer Ablagerung von IgG, IgM und Komplementfaktoren [58].

Unter Verwendung von hDAF-transgenen Nieren im Schwein-Pavian-Modell kam es trotz Elimination von Gal-Ak bei einem Pavian mit hohem non-Gal-IgG-Titer zu einem frühen Organversagen. Kurz nach Beginn der Perfusion verfärbte sich das Transplantat und im Verlauf stiegen die Kreatininwerte an. Nach 50 min war in der Histologie bereits eine massive Ablagerung von IgG und Fibrin zu sehen [100].

Bei Versuchen zur xenogenen Herztransplantation im Schwein-Pavian-Modell berichten McGregor et al. [29] vom Auftreten eines Falles einer HAR trotz Verwendung von Gal-KO-Tieren. Es zeigten sich nach 90 Minuten typische Zeichen der HAR. Das Herz färbte sich dunkel und es kam schnell zu einem Organversagen. Histologisch wurden ausgeprägte Hämorrhagien und vaskuläre Ablagerungen von IgM und Komplementfaktor 5b nachgewiesen. Das Spenderserum unterschied sich in seiner Konzentration an präformierten non-Gal-AK und der Toxizität gegenüber porcinen aortalen Endothelzellen nicht von den anderen Spenderseren. Die non-Gal-AK waren hier in der Lage, eine HAR bei Gal-KO-Hezen auszulösen.

Wenn die HAR durch den Einsatz genmodifizierter Tiere und starker Immunsuppression überwunden wird, kommt es zum Auftreten der acute humoral xenograft rejection (AHXR), die derzeit den Erfolg der Xenotransplantation limitiert. Synonym für den Begriff der AHXR werden in der Literatur auch delayed xenograft rejection (DXR) und acute vaskular rejection (AVR) verwendet.

Die AHXR beginnt nach 24 Stunden Reperfusion und kann innerhalb von Tagen bis Wochen zu einem Organversagen führen [53, 102, 38]. Ähnlich der HAR wird die AHXR durch Antikörper und der damit verbundenen Komplementaktivierung initiiert [29, 38, 102, 53]. Von Bedeutung sind hierbei Gal-AK und non-Gal-AK [26, 27], die entweder vor der Transplantation bereits vorhanden waren oder erst später durch Sensibilisierung

entstehen [29, 28]. Bei der Verwendung von Gal-KO-Organen sind alleine die non-Gal-AK für das Auftreten der AHXR verantwortlich [26, 28, 30, 100].

In Schwein-Pavian-Modellen konnten die Ablagerung von Immunglobulinen (IgG und IgM) und Komplementfaktoren auf den Gefäßendothelien nachgewiesen werden [29, 97, 54]. Durch immunologische Abläufe kommt es zur Aktivierung, Schädigung und Integritätsverlust des Endothels. Das histopathologische Bild der AHXR unterscheidet sich kaum von dem der HAR [38]. Es ist gekennzeichnet durch Hämorrhagien, Ödeme, Thrombose und Myozytennekrosen. Zusätzlich beobachtet man bei der AHXR Infiltrationen von Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und NK-Zellen in das perivaskuläre Gewebe [38, 102, 53, 97].

Es wird deutlich, dass sowohl bei der HAR als auch bei der AHXR die Schädigung des Endothels als initialer Angriffspunkt aller Abstoßungsreaktionen eine enorme Bedeutung hat. Hinzu kommt der bei jeder Transplantation entstehende Endothelschaden durch Ischämie-Reperfusion (I/R). Für einen verbesserten Transplantationserfolg ist es sicherlich sinnvoll Möglichkeiten in Betracht zu ziehen, die zur Stabilisierung eines intakten vaskulären Endothels beitragen.

In unserem xenogenen *ex vivo* Perfusionsmodell konnten wir zeigen, dass QG einen protektiven Effekt auf das Gefäßendothel hat, obwohl die Versuchsbedingungen eine Maximalvariante für endothelschädigende Einflüsse darstellen. Zusätzlich wurde ein geringerer Untergang des Myokardgewebes und eine gesteigerte Herzleistung beobachtet. Unter Berücksichtigung dieser prädestinierenden Eigenschaften kann ein additiver Einsatz von QG bei Xenotransplantationsversuchen diskutiert werden.

Ob QG die HAR und den I/R-Schaden bei Herzen von transgenen Tieren zusätzlich positiv beeinflussen kann, muss weiter untersucht werden. Hierzu sind Versuche im *ex vivo* Perfusionsmodell notwendig, bei denen Gal-KO- und Gal-KO/hCRP-Herzen mit und ohne QG perfundiert werden.

Inwieweit sich QG sogar positiv bei der AHXR auswirken kann ist im xenogenen *ex vivo* Perfusionsmodell nicht zu ermitteln. Hierzu ist ein *in vivo* Einsatz von QG im Schwein-Pavian-Modell nötig.

Aufgrund der endothelzellprotektiven Wirkung von QG und den Ergebnissen unserer Stu-



die muss es als eine vielversprechende Substanz für die xenogene und darüber hinaus auch für die allogene Transplantation angesehen werden.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Der Xenotransplantation wird bei der zukünftigen Behebung des immer größer werdenden Organmangels in der Transplantationsmedizin ein hoher Stellenwert zugeschrieben. Bei der Übertragung von Schweineorganen auf den Menschen steht man in den ersten Minuten bis Stunden nach Transplantation insbesondere der Problematik der hyperakuten Abstoßung und der Ischämie-Reperfusion gegenüber. Die hyperakute Abstoßungsreaktion wird durch die Bindung präformierter natürlicher Antikörper aus dem humanen Blut an Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Kohlenhydratverbindungen auf dem Endothel des Transplantats initiiert. Sowohl bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion als auch bei der Ischämie-Reperfusion ist das Gefäßendothel als Grenze und Kontaktfläche zwischen Blut und Gewebe der Angriffspunkt für schädigende Einflüsse. Es kommt durch immunologische, inflammatorische und thrombotische Ereignisse zum Übertritt von Blutbestandteilen in das Interstitium, was die Ausbildung von Hämorrhagien und Gewebsödemen zur Folge hat und schließlich zu einem raschen Organversagen führt.

Vor diesem Hintergrund ist in der Xenotransplantation der Einsatz von Substanzen mit endothelprotektiven Eigenschaften sinnvoll, um der Problematik der hyperakuten Abstoßungsreaktion und des Ischämie-/Reperfusionsschadens zu begegnen.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Wirkung von Quercetin-3-glucuronid bei Versuchen zur xenogenen Herztransplantation. Die Substanz gehört zur Stoffklasse der Flavonoide, welchen antioxidative, antiinflammatorische, antithrombotische und kardioprotektive Wirkungsweisen zugeschrieben werden. Bei *in vitro* Versuchen an myokardialen postkapillären Venolen wurde für Quercetin-3-glucuronid eine protektive Wirkung auf

das Endothel unter inflammatorischen Bedingungen gezeigt. Diese Eigenschaften prädestinieren Quercetin-3-glucuronid im Rahmen der Forschung zur Xenotransplantation eingesetzt zu werden.

Für unsere Studie wurden Herzen deutscher Landrasseschweine explantiert und in ein Working-Heart-Modell eingesetzt, welches als etabliertes *ex vivo* Perfusionsmodell eine möglichst physiologische Perfusion von Schweineherzen mit humanem Blut gewährleistet. Der Quercetinglucuronidgruppe (QG-Gruppe) wurde im Unterschied zur Kontrollgruppe zweimalig Quercetin-3-glucuronid zugeführt.

Ziel dieser Arbeit war eine erstmalige Untersuchung der Wirkung von Quercetin-3-glucuronid auf immunologische und inflammatorische Abläufe, die Herzfunktion, den Myokardschaden und den myokardialen Metabolismus im xenogenen Herztransplantationsmodell.

Wir konnten nachweisen, dass es bei den Herzen der QG-Gruppe zu einer signifikant geringeren Herzgewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe kam (12% vs. 37%,  $P < 0,05$ ), was auf eine geringere Ausbildung von Hämorrhagien und Ödemen zurückzuführen ist. Durch den Zusatz von Quercetin-3-glucuronid kam es zu einer verbesserten Herzfunktion, die insbesondere bei der Berechnung des Schlagarbeitsindex (SWI) deutlich wurde. Ab einer Perfusionsdauer von 60 Minuten war der SWI in der QG-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $P < 0,05$ ). In der QG-Gruppe wurden Werte zwischen  $4741 \pm 380$  erg/g und  $3554 \pm 267$  erg/g erreicht, wohingegen der Maximalwert in der Kontrollgruppe lediglich  $3406 \pm 529$  erg/g betrug. Die gute Herzfunktion der QG-Gruppe ist unter anderem bedingt durch einen geringeren Myokardschaden. Sowohl bei der Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) als auch bei der Laktatdehydrogenase (LDH) war gegen Ende des Versuchs eine signifikant höhere Konzentration in der Kontrollgruppe messbar (GOT  $1049 \pm 198$  U/l vs.  $512 \pm 90$  U/l, LDH  $1704 \pm 305$  U/l vs.  $925 \pm 146$  U/l,  $P < 0,05$ ). Bei der Betrachtung der myokardialen Effizienz (ME) waren in der QG-Gruppe ab einer Perfusionsdauer von 90 Minuten signifikant bessere Werte zu verzeichnen ( $P < 0,05$ ). Am letzten Messzeitpunkt wurde in der QG-Gruppe eine ME von  $72 \pm 4$  % vs.  $32 \pm 6$  % in der Kontrollgruppe errechnet.

Mit unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass Quercetin-3-glucuronid neben einer

positiven Wirkung auf inflammatorische Prozesse zu einer Steigerung der Herzfunktion, zu einem geringeren Myokardschaden sowie zu einem verbesserten myokardialen Metabolismus führte. In unserem Versuchsaufbau, bei welchem es bedingt durch die hyperakute Abstoßungsreaktion und den Ischämie-/Reperfusionsschaden zu einer massiven Schädigung der endothelialen Barriere kommt, konnte die für Quercetin-3-glucuronid beschriebene protektive Wirkung auf das Endothel nachgewiesen werden.

Bei Versuchen zur Xenotransplantation kommen seit Jahren auch Herzen transgener Tiere zum Einsatz, bei welchen eine Modifikation von Genen durchgeführt wurde, die für die Problematik der Antikörperbindung und Komplementaktivierung im Rahmen der hyperakuten Abstoßung verantwortlich sind. Ob Quercetin-3-glucuronid die hyperakute Abstoßung und den Ischämie-/Reperfusionsschaden von transgenen Herzen zusätzlich positiv beeinflussen kann, muss durch die Perfusion solcher Herzen mit und ohne Quercetin-3-glucuronid im *ex vivo* Perfusionsmodell weiter untersucht werden. Inwieweit sich Quercetin-3-glucuronid sogar positiv bei der nach Überwindung der hyperakuten Abstoßungsreaktion auftretenden AHXR (acute humoral xenograft rejection) auswirken kann, sollte durch den *in vivo* Einsatz von Quercetin-3-glucuronid im Schwein-Pavian-Modell näher erforscht werden.

Aufgrund der endothelzellprotektiven Wirkung von Quercetin-3-glucuronid ist es folgerichtig, dieses als eine vielversprechende Substanz für die xenogene und darüber hinaus auch für die allogene Transplantation anzusehen.

# Literaturverzeichnis

- [1] C. N. Barnard. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J*, 41(48):1271–4, Dec 1967.
- [2] R. Y. Calne, D. J. White, K. Rolles, D. P. Smith, and B. M. Herbertson. Prolonged survival of pig orthotopic heart grafts treated with cyclosporin A. *Lancet*, 1(8075):1183–5, 1978.
- [3] J. Y. Deschamps, F. A. Roux, P. Sai, and E. Gouin. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 12(2):91–109, 2005.
- [4] K. Dickstein, A. Cohen-Solal, G. Filippatos, J. J. McMurray, P. Ponikowski, P. A. Poole-Wilson, A. Stromberg, D. J. van Veldhuisen, D. Atar, A. W. Hoes, A. Keren, A. Mebazaa, M. Nieminen, S. G. Priori, and K. Swedberg. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail*, 10(10):933–89, 2008.
- [5] J. K. Kirklin, D. C. Naftel, R. L. Kormos, L. W. Stevenson, F. D. Pagani, M. A. Miller, K. L. Udisney, J. T. Baldwin, and J. B. Young. Second INTERMACS annual report: more than 1,000 primary left ventricular assist device implants. *J Heart Lung Transplant*, 29(1):1–10, 2010.
- [6] D. K. Cooper and J. J. Teuteberg. Pig heart xenotransplantation as a bridge to allotransplantation. *J Heart Lung Transplant*, 29(8):838–40, 2010.

- [7] R. Y. Calne. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc*, 2(4):550–6, 1970.
- [8] J. D. Hardy, F. D. Kurrus, C. M. Chavez, W. A. Neely, S. Eraslan, M. D. Turner, L. W. Fabian, and T. D. Labecki. Heart transplantation in man. Developmental studies and report of a case. *JAMA*, 188:1132–40, 1964.
- [9] L. L. Bailey, S. L. Nehlsen-Cannarella, W. Concepcion, and W. B. Jolley. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA*, 254(23):3321–9, 1985.
- [10] D. K. Cooper, A. M. Keogh, J. Brink, P. A. Corris, W. Klepetko, R. N. Pierson, M. Schmoeckel, R. Shirakura, and L. Warner Stevenson. Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation: the present status of xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases. *J Heart Lung Transplant*, 19(12):1125–65, 2000.
- [11] D. A. Cooley, G. L. Hallman, R. D. Bloodwell, J. J. Nora, and R. D. Leachman. Human heart transplantation. Experience with twelve cases. *Am J Cardiol*, 22(6):804–10, 1968.
- [12] C. N. Barnard, A. Wolpowitz, and J. G. Losman. Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass. *S Afr Med J*, 52(26):1035–8, 1977.
- [13] D. H. Sachs. The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol*, 43(1-3):185–91, 1994.
- [14] C. Hammer, R. Linke, F. Wagner, and M. Diefenbeck. Organs from animals for man. *Int Arch Allergy Immunol*, 116(1):5–21, 1998.
- [15] M. Sykes, A. d’Apice, and M. Sandrin. Position paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association. *Xenotransplantation*, 10(3):194–203, 2003.

- [16] C. Patience, Y. Takeuchi, and R. A. Weiss. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med*, 3(3):282–6, 1997.
- [17] C. Patience, G. S. Patton, Y. Takeuchi, R. A. Weiss, M. O. McClure, L. Rydberg, and M. E. Breimer. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet*, 352(9129):699–701, 1998.
- [18] J. Denner, H. J. Schuurman, and C. Patience. The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes, chapter 5: Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation*, 16(4):239–48, 2009.
- [19] A. R. Rios, C. C. Conesa, P. Ramirez, M. M. Rodriguez, and P. Parrilla. Public attitude toward xenotransplantation: opinion survey. *Transplant Proc*, 36(10):2901–5, 2004.
- [20] G. Frati, P. Frati, L. Muzzi, G. Oricchio, U. Papalia, and M. H. Yacoub. Medical and ethical issues in xenotransplantation: the opinion of the public, patients, and transplant candidates in Italy. *Transplant Proc*, 33(1-2):1884–5, 2001.
- [21] J. L. Platt. Xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Curr Opin Immunol*, 8(5):721–8, 1996.
- [22] U. Galili, R. E. Mandrell, R. M. Hamadeh, S. B. Shohet, and J. M. Griffiss. Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun*, 56(7):1730–7, 1988.
- [23] M. E. Breimer. Gal/non-Gal antigens in pig tissues and human non-Gal antibodies in the GalT-KO era. *Xenotransplantation*, 18(4):215–28, 2011.
- [24] P. P. Rood, H. C. Tai, H. Hara, C. Long, M. Ezzelarab, Y. J. Lin, D. J. van der Windt, J. Busch, D. Ayares, J. N. Ijzermans, R. F. Wolf, R. Manji, L. Bailey, and D. K. Cooper. Late onset of development of natural anti-nonGal antibodies in infant

- humans and baboons: implications for xenotransplantation in infants. *Transpl Int*, 20(12):1050–8, 2007.
- [25] M. Diswall, J. Angstrom, H. Karlsson, C. J. Phelps, D. Ayares, S. Teneberg, and M. E. Breimer. Structural characterization of alpha1,3-galactosyltransferase knockout pig heart and kidney glycolipids and their reactivity with human and baboon antibodies. *Xenotransplantation*, 17(1):48–60, 2010.
- [26] G. W. Byrne, P. G. Stalboerger, Z. Du, T. R. Davis, and C. G. McGregor. Identification of new carbohydrate and membrane protein antigens in cardiac xenotransplantation. *Transplantation*, 91(3):287–92, 2011.
- [27] G. W. Byrne and C. G. McGregor. Cardiac xenotransplantation: progress and challenges. *Curr Opin Organ Transplant*, 17(2):148–54, 2012.
- [28] G. W. Byrne, P. G. Stalboerger, E. Davila, C. J. Heppelmann, M. H. Gazi, H. C. McGregor, P. T. LaBreche, W. R. Davies, V. P. Rao, K. Oi, H. D. Tazelaar, J. S. Logan, and C. G. McGregor. Proteomic identification of non-Gal antibody targets after pig-to-primate cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 15(4):268–76, 2008.
- [29] C. G. McGregor, D. Ricci, N. Miyagi, P. G. Stalboerger, Z. Du, E. A. Oehler, H. D. Tazelaar, and G. W. Byrne. Human CD55 expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts. *Transplantation*, 93(7):686–92, 2012.
- [30] 3rd Pierson, R. N., A. Dorling, D. Ayares, M. A. Rees, J. D. Seebach, J. A. Fishman, B. J. Hering, and D. K. Cooper. Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. *Xenotransplantation*, 16(5):263–80, 2009.
- [31] S. Saadi and J. L. Platt. Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J Exp Med*, 181(1):21–31, 1995.
- [32] J. S. Pober and R. S. Cotran. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*, 50(4):537–44, 1990.



- [33] Y. Banz and R. Rieben. Endothelial cell protection in xenotransplantation: looking after a key player in rejection. *Xenotransplantation*, 13(1):19–30, 2006.
- [34] J. L. Platt, G. M. Vercellotti, B. J. Lindman, Jr. Oegema, T. R., F. H. Bach, and A. P. Dalmaso. Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J Exp Med*, 171(4):1363–8, 1990.
- [35] S. Saadi, R. A. Holzknacht, C. P. Patte, D. M. Stern, and J. L. Platt. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med*, 182(6):1807–14, 1995.
- [36] F. H. Bach, S. C. Robson, H. Winkler, C. Ferran, K. M. Stuhlmeier, C. J. Wrighton, and W. W. Hancock. Barriers to xenotransplantation. *Nat Med*, 1(9):869–73, 1995.
- [37] M. D. Dooldeniya and A. N. Warrens. Xenotransplantation: where are we today? *J R Soc Med*, 96(3):111–7, 2003.
- [38] A. G. Rose and D. K. Cooper. Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection. *Xenotransplantation*, 7(1):31–41, 2000.
- [39] M. J. Gourdin, B. Bree, and M. De Kock. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol*, 26(7):537–47, 2009.
- [40] D. W. Haack, L. R. Bush, M. Schlafer, and B. R. Lucchesi. Lanthanum staining of coronary microvascular endothelium: effects of ischemia reperfusion, propranolol, and atenolol. *Microvasc Res*, 21(3):362–76, 1981.
- [41] S. Verma, P. W. Fedak, R. D. Weisel, J. Butany, V. Rao, A. Maitland, R. K. Li, B. Dhillon, and T. M. Yau. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*, 105(20):2332–6, 2002.
- [42] F. M. Sheridan, P. G. Cole, and D. Ramage. Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and reperfusion in an in vivo canine model. *Circulation*, 93(10):1784–7, 1996.

- [43] J. Vinten-Johansen. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 61(3):481–97, 2004.
- [44] A. P. Vakeva, A. Agah, S. A. Rollins, L. A. Matis, L. Li, and G. L. Stahl. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation*, 97(22):2259–67, 1998.
- [45] V. Rao, J. Ivanov, R. D. Weisel, G. Cohen, M. A. Borger, and D. A. Mickle. Lactate release during reperfusion predicts low cardiac output syndrome after coronary bypass surgery. *Ann Thorac Surg*, 71(6):1925–30, 2001.
- [46] H. Jaeschke and J. R. Mitchell. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 160(1):140–7, 1989.
- [47] B. M. Babior. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*, 64(5):959–66, 1984.
- [48] J. Forty, D. G. White, and J. Wallwork. A technique for perfusion of an isolated working heart to investigate hyperacute discordant xenograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 106(2):308–16, 1993.
- [49] M. M. Suckfull, O. Pieske, M. Mudsam, R. Babic, and C. Hammer. The contribution of endothelial cells to hyperacute rejection in xenogeneic perfused working hearts. *Transplantation*, 57(2):262–7, 1994.
- [50] S. C. Robson, V. K. Young, N. S. Cook, R. Metternich, W. Kasper-Konig, B. A. Lesnikoski, 3rd Pierson, R. N., W. W. Hancock, D. Candinas, D. J. White, and F. H. Bach. Thrombin inhibition in an ex vivo model of porcine heart xenograft hyperacute rejection. *Transplantation*, 61(6):862–8, 1996.
- [51] R. A. Manji, J. S. Manji, A. Koshal, G. S. Korbitt, and R. V. Rajotte. Human abo blood group is important in survival and function of porcine working hearts. *Am J Transplant*, 3(3):286–93, 2003.

- [52] M. Schmoeckel, G. Nollert, M. Shahmohammadi, V. K. Young, G. Chavez, W. Kasper-Konig, D. J. White, J. Muller-Hocker, R. M. Arendt, U. Wilbert-Lampen, C. Hammer, and B. Reichart. Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts. *Transplantation*, 62(6):729–34, 1996.
- [53] H. J. Schuurman, G. Pino-Chavez, M. J. Phillips, L. Thomas, D. J. White, and E. Cozzi. Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors. *Transplantation*, 73(7):1146–51, 2002.
- [54] L. E. Diamond, C. M. Quinn, M. J. Martin, J. Lawson, J. L. Platt, and J. S. Logan. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation*, 71(1):132–42, 2001.
- [55] G. W. Byrne, K. R. McCurry, M. J. Martin, S. M. McClellan, J. L. Platt, and J. S. Logan. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation*, 63(1):149–55, 1997.
- [56] K. Kuwaki, Y. L. Tseng, F. J. Dor, A. Shimizu, S. L. Houser, T. M. Sanderson, C. J. Lancos, D. D. Prabharasuth, J. Cheng, K. Moran, Y. Hisashi, N. Mueller, K. Yamada, J. L. Greenstein, R. J. Hawley, C. Patience, M. Awwad, J. A. Fishman, S. C. Robson, H. J. Schuurman, D. H. Sachs, and D. K. Cooper. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med*, 11(1):29–31, 2005.
- [57] Y. L. Tseng, K. Kuwaki, F. J. Dor, A. Shimizu, S. Houser, Y. Hisashi, K. Yamada, S. C. Robson, M. Awwad, H. J. Schuurman, D. H. Sachs, and D. K. Cooper. alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation*, 80(10):1493–500, 2005.
- [58] M. Ezzelarab, B. Garcia, A. Azimzadeh, H. Sun, C. C. Lin, H. Hara, S. Kelishadi, T. Zhang, Y. J. Lin, H. C. Tai, R. Wagner, J. Thacker, N. Murase, K. McCurry, R. N. Barth, D. Ayares, 3rd Pierson, R. N., and D. K. Cooper. The innate immune respon-

- se and activation of coagulation in alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout xenograft recipients. *Transplantation*, 87(6):805–12, 2009.
- [59] U. Brandl, M. Erhardt, S. Michel, H. Jockle, L. Burdorf, I. Bittmann, M. Rossle, V. Mordstein, P. Brenner, C. Hammer, B. Reichart, and M. Schmoeckel. Soluble Galalpha(1,3)Gal conjugate combined with hDAF preserves morphology and improves function of cardiac xenografts. *Xenotransplantation*, 14(4):323–32, 2007.
- [60] U. Brandl, H. Jockle, M. Erhardt, S. Michel, L. Burdorf, P. Brenner, I. Bittmann, M. Rossle, V. Mordstein, C. Hammer, E. Thein, B. Reichart, and M. Schmoeckel. Reduced fibrin deposition and intravascular thrombosis in hdaf transgenic pig hearts perfused with tirofiban. *Transplantation*, 84(12):1667–76, 2007.
- [61] J. V. Formica and W. Regelson. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 33(12):1061–80, 1995.
- [62] J. A. Manthey. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*, 7(6 Pt 2):S29–34, 2000.
- [63] M. Serafini, I. Peluso, and A. Raguzzini. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc*, 69(3):273–8, 2010.
- [64] H. Shapiro, S. Lev, J. Cohen, and P. Singer. Polyphenols in the prevention and treatment of sepsis syndromes: rationale and pre-clinical evidence. *Nutrition*, 25(10):981–97, 2009.
- [65] Jr. Middleton, E., C. Kandaswami, and T. C. Theoharides. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52(4):673–751, 2000.
- [66] M. Michalska, A. Gluba, D. P. Mikhailidis, P. Nowak, A. Bielecka-Dabrowa, J. Rysz, and M. Banach. The role of polyphenols in cardiovascular disease. *Med Sci Monit*, 16(5):RA110–9, 2010.

- [67] C. Morand, V. Crespy, C. Manach, C. Besson, C. Demigne, and C. Remesy. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol*, 275(1 Pt 2):R212–9, 1998.
- [68] P. Rathee, H. Chaudhary, S. Rathee, D. Rathee, V. Kumar, and K. Kohli. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 8(3):229–35, 2009.
- [69] A. J. Day, F. Mellon, D. Barron, G. Sarrazin, M. R. Morgan, and G. Williamson. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res*, 35(6):941–52, 2001.
- [70] M. G. Hertog, E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan, and D. Kromhout. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342(8878):1007–11, 1993.
- [71] X. Chen, O. Q. Yin, Z. Zuo, and M. S. Chow. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm Res*, 22(6):892–901, 2005.
- [72] J. Duarte, R. Perez-Palencia, F. Vargas, M. A. Ocete, F. Perez-Vizcaino, A. Zarzuelo, and J. Tamargo. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 133(1):117–24, 2001.
- [73] S. V. Rendig, J. D. Symons, J. C. Longhurst, and E. A. Amsterdam. Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38(2):219–27, 2001.
- [74] M. Flesch, A. Schwarz, and M. Bohm. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 2):H1183–90, 1998.
- [75] D. F. Fitzpatrick, S. L. Hirschfield, and R. G. Coffey. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol*, 265(2 Pt 2):H774–8, 1993.

- [76] M. Sanchez, M. Galisteo, R. Vera, I. C. Villar, A. Zarzuelo, J. Tamargo, F. Perez-Vizcaino, and J. Duarte. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 24(1):75–84, 2006.
- [77] J. F. Leikert, T. R. Rathel, P. Wohlfart, V. Cheynier, A. M. Vollmar, and V. M. Dirsch. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*, 106(13):1614–7, 2002.
- [78] M. Akhlaghi and B. Bandy. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 46(3):309–17, 2009.
- [79] I. Crespo, M. V. Garcia-Mediavilla, B. Gutierrez, S. Sanchez-Campos, M. J. Tunon, and J. Gonzalez-Gallego. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. *Br J Nutr*, 100(5):968–76, 2008.
- [80] S. Tribolo, F. Lodi, C. Connor, S. Suri, V. G. Wilson, M. A. Taylor, P. W. Needs, P. A. Kroon, and D. A. Hughes. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 197(1):50–6, 2008.
- [81] J. Liu, X. Li, Y. Yue, J. Li, T. He, and Y. He. The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell Mol Immunol*, 2(6):455–60, 2005.
- [82] G. Reiterer, M. Toborek, and B. Hennig. Quercetin protects against linoleic acid-induced porcine endothelial cell dysfunction. *J Nutr*, 134(4):771–5, 2004.
- [83] J. J. Bergan and G. W. Schmid-Schonbein. Therapeutic management of chronic venous insufficiency: microcirculation as a target. *Microcirculation*, 7(6 Pt 2):S23–8, 2000.

- [84] M. Sato, P. S. Ray, G. Maulik, N. Maulik, R. M. Engelman, A. A. Bertelli, A. Bertelli, and D. K. Das. Myocardial protection with red wine extract. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35(2):263–8, 2000.
- [85] M. L. Balestrieri, D. Castaldo, C. Balestrieri, L. Quagliuolo, A. Giovane, and L. Servillo. Modulation by flavonoids of PAF and related phospholipids in endothelial cells during oxidative stress. *J Lipid Res*, 44(2):380–7, 2003.
- [86] B. Wright, L. A. Moraes, C. F. Kemp, W. Mullen, A. Crozier, J. A. Lovegrove, and J. M. Gibbins. A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *Br J Pharmacol*, 159(6):1312–25, 2010.
- [87] G. Juchem, D. R. Weiss, M. Knott, A. Senftl, S. Forch, T. Fischlein, E. Kreuzer, B. Reichart, S. Laufer, and S. Nees. Regulation of coronary venular barrier function by blood borne inflammatory mediators and pharmacological tools: insights from novel microvascular wall models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(3):H567–81, 2012.
- [88] T. J. Kroshus, C. T. Salerno, C. G. Yeh, P. J. Higgins, 3rd Bolman, R. M., and A. P. Dalmaso. A recombinant soluble chimeric complement inhibitor composed of human cd46 and cd55 reduces acute cardiac tissue injury in models of pig-to human heart transplantation. *Transplantation*, 69(11):2282–9, 2000.
- [89] M. Suckfull, M. Mudsam, O. Pieske, G. Enders, R. Babic, and C. Hammer. Immunohistological studies of complement activation after xenogeneic perfusion of a working heart model. *Transpl Int*, 7(5):324–8, 1994.
- [90] H. P. Wendel and G. Ziemer. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 16(3):342–50, 1999.
- [91] Quantikine. Porcine IL-6 Immunoassay. For the quantitative determination of porcine interleukin 6 (IL-6) concentrations in cell culture supernates serum and plas-

- ma. Catalog Number P6000B. *R&D Systems Inc., Minneapolis, USA*, page 14, 2010.
- [92] Quantikine. Human IL-6 Immunoassay. For the quantitative determination of human interleukin 6 (IL-6) concentrations in cell culture supernates serum and plasma. Catalog Number D6050 S6050 PD6050. *R&D Systems Inc., Minneapolis, USA*, page 13, 2010.
- [93] J. P. Atkinson, T. J. Oglesby, D. White, E. A. Adams, and M. K. Liszewski. Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin Exp Immunol*, 86 Suppl 1:27–30, 1991.
- [94] D. J. White, T. Oglesby, M. K. Liszewski, I. Tedja, D. Hourcade, M. W. Wang, L. Wright, J. Wallwork, and J. P. Atkinson. Expression of human decay accelerating factor or membrane cofactor protein genes on mouse cells inhibits lysis by human complement. *Transplant Proc*, 24(2):474–6, 1992.
- [95] B. P. Morgan, C. W. Berg, and C. L. Harris. "Homologous restriction" in complement lysis: roles of membrane complement regulators. *Xenotransplantation*, 12(4):258–65, 2005.
- [96] T. T. Lam, R. Paniagua, G. Shivaram, H. J. Schuurman, D. C. Borie, and R. E. Morris. Anti-non-Gal porcine endothelial cell antibodies in acute humoral xenograft rejection of hDAF-transgenic porcine hearts in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation*, 11(6):531–5, 2004.
- [97] C. G. McGregor, S. S. Teotia, G. W. Byrne, M. G. Michaels, J. M. Risdahl, J. M. Schirmer, H. D. Tazelaar, R. C. Walker, and J. S. Logan. Cardiac xenotransplantation: progress toward the clinic. *Transplantation*, 78(11):1569–75, 2004.
- [98] C. J. Phelps, C. Koike, T. D. Vaught, J. Boone, K. D. Wells, S. H. Chen, S. Ball, S. M. Specht, I. A. Polejaeva, J. A. Monahan, P. M. Jobst, S. B. Sharma, A. E. Lamborn, A. S. Garst, M. Moore, A. J. Demetris, W. A. Rudert, R. Bottino, S. Bertera, M. Trucco, T. E. Starzl, Y. Dai, and D. L. Ayares. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 299(5605):411–4, 2003.



- [99] Y. Dai, T. D. Vaught, J. Boone, S. H. Chen, C. J. Phelps, S. Ball, J. A. Monahan, P. M. Jobst, K. J. McCreath, A. E. Lamborn, J. L. Cowell-Lucero, K. D. Wells, A. Colman, I. A. Polejaeva, and D. L. Ayares. Targeted disruption of the  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 20(3):251–5, 2002.
- [100] G. Chen, H. Sun, H. Yang, D. Kubelik, B. Garcia, Y. Luo, Y. Xiang, A. Qian, L. Copeman, W. Liu, C. J. Cardella, W. Wang, Y. Xiong, W. Wall, D. J. White, and R. Zhong. The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy. *Transplantation*, 81(2):273–83, 2006.
- [101] B. C. Baumann, G. Stussi, K. Huggel, R. Rieben, and J. D. Seebach. Reactivity of human natural antibodies to endothelial cells from Gal $\alpha$ 1,3Gal-deficient pigs. *Transplantation*, 83(2):193–201, 2007.
- [102] J. L. Platt. Acute vascular rejection. *Transplant Proc*, 32(5):839–40, 2000.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Bauer, der mich durch seine intensive Betreuung und Unterstützung sowie durch sein außerordentliches Engagement begleitet und damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Zugleich danke ich Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler für die Vergabe des Dissertationsthemas und Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Überlassung der Räumlichkeiten und Ausstattung zur Durchführung meiner Versuche im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die Forschungsarbeiten von Herrn Prof. Dr. Stephan Nees und Herrn Dr. med. Gerd Juchem zu Quercetin-3-glucuronid waren von grundlegender Bedeutung für die Festlegung meines Dissertationsthemas. Dafür danke ich herzlich.

Herrn Prof. Dr. med. Bruno Reichart gilt mein vornehmlicher Dank für die Leitung und Koordination des Sonderforschungsbereichs "Biologie der xenogenen Zell- und Organtransplantation".

Mein hervorgehobener Dank gebührt Herrn Dr. med. vet. Eckart Thein, Herrn Dr. med. vet. Michael Thormann und Herrn Johannes Postrach, die durch ihre hilfreiche Unterstützung einen wesentlichen Beitrag zur erfolgreichen Durchführung meiner Versuche geleistet haben.

Herrn Dr. med. Peter Göhring und Frau Antje Uhlig danke ich herzlich für ihre Hilfe bei der laborchemischen Auswertung der Blutproben.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen meiner Mutter Irene Ebert, meinen Geschwistern Dipl. Ing. Sebastian Ebert und Dr. med. Magdalena Ebert sowie Herrn Prof. Dr. Lothar Wächter für ihre ausnahmslose Unterstützung sowie das Korrekturlesen und Anbringen konstruktiver Kritik. Herzlich danke ich ebenso Herrn Dipl. Ing. Andreas Iliopoulos, der mir jederzeit bei technischen Fragen und Formatierungsarbeiten zur Seite stand.

# Eidesstattliche Versicherung

**Ebert, Regina Elisabeth**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**”Die protektive Wirkung von Quercetin-3-glucuronid bei xenogener Herztransplantation im ex vivo Perfusionsmodell”**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Regina Elisabeth Ebert

# Publikationen

A. Bauer, G. Juchem, J. Postrach, R. Ebert, J. Abicht, M. Thormann, P. Brenner, B. Reichart, S. Nees. Quercetin glucuronide improves cardiac function in an ex vivo model of pig-to-man heart transplantation. *31st Annual Meeting ISHLT, San Diego, USA*, 2011

A. Bauer, J. Postrach, R. Ebert, M. Thormann, S. Milz, D. Weiss, S. Nees, B. Reichart, G. Juchem. Quercetin glucuronide improves cardiac function in an ex vivo model of xenogeneic porcine heart transplantation. *40th Annual Meeting of the German Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, Stuttgart, Deutschland*, 59 - V97, 2011

A. Bauer, G. Juchem, J. Postrach, R. Ebert, J. M. Abicht, M. Thormann, S. Nees. Quercetin glucuronide improves cardiac function in an ex vivo model of pig-to-man heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(4), S102;292, 2011

A. Bauer, J. Postrach, J. M. Abicht, M. Thormann, R. Ebert, K. Sotlar, P. Brenner. High incidence of cardiac malformations in multitransgenic pigs-implications for xenotransplantation studies. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(4), S103;296, 2011