

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

Thema der Dissertation

**Der Einfluss von Defibrotide auf die Herzfunktion und den myokardialen
Schaden in einem ex vivo Perfusionsmodell der kardialen Xenotransplantation**

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

Vorgelegt von
Ioana-Cornelia Stanescu
aus Bukarest
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

Mitberichterstatter:
Prof. Dr. Bernhard F. Becker
Prof. Dr. Christian Schulz
Prof. Dr. Ellen Hoffmann

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

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2016

3 Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG</u>	5
1.1 BEDEUTENDE SCHRITTE IN DER GESCHICHTLICHEN ENTWICKLUNG	6
1.2 NUTZEN DER XENOTRANSPLANTATION	8
1.2.1 DAS SCHWEIN ALS ORGANSPENDER	8
1.3 ÄTIOLOGIE DER TRANSPLANTATABSTOßUNG	10
1.3.1 HYPERAKUTE ABSTOßUNG	10
1.3.2 AKUTE ABSTOßUNG	13
VASKULÄRE (HUMORALE) ABSTOßUNG	13
ZELLULÄRE ABSTOßUNG	14
1.3.3 CHRONISCHE ABSTOßUNG	15
1.4 ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN BEI ORGANTRANSPLANTATION	16
1.4.1 PATHOPHYSIOLOGIE DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS	16
1.4.2 ANSÄTZE ZUR VERMINDERUNG DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS	18
1.5 DEFIBROTIDE	19
1.6 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	23
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	25
2.1 PERFUSIONSSYSTEM (WORKING-HEART, LANGENDORFF)	25
2.1.1 AUFBAU	25
2.2 BLUTSPENDER	28
2.3 VERSUCHSTIERE	29
2.4 DEFIBROTIDE IN DER ANWENDUNG	30
2.5 OPERATIONSVERFAHREN	30
2.5.1 ANÄSTHESIE UND MONITORING	30
2.5.2 EXPLANTATION	31
2.5.3 ANSCHLUSS DES SCHWEINEHERZENS AN DAS PERFUSIONSSYSTEM	32
2.6 PERfusion	32
2.7 VERSUCHSPROTOKOLL	33
2.8 MESSPARAMETER	34
2.8.1 HÄMODYNAMIK	34
2.8.2 BLUTGASE	35
2.8.4 HERZENZYME	36
2.8.3 GERINNUNGSPARAMETER	36
2.8.5 ZELLOBERFLÄCHENMARKER	36
2.8.6 ZELLZAHLBESTIMMUNG	37
2.8.7 KOMPLEMENTSYSTEM	37
2.8.8 PGE ₂ / 6-KETO-PGF _{1A}	37
2.8.9 ANTI-PIG-ANTIKÖRPER	41
2.8.10 ANTI-GAL-A1,3-GAL	43
2.8.11 HERZGEWICHT	44
2.10 HISTOPATHOLOGIE	44
2.11 STATISTISCHE AUSWERTUNGSMETHODEN	45
<u>3. ERGEBNISSE</u>	46
3.1. ISCHÄMIE-REPERFUSIONSZEIT	46
3.2 MESSPARAMETER	46
3.2.1 HÄMODYNAMIK	47
3.2.2 BLUTGASE	60
3.2.3 HERZENZYME	63

4 Inhaltsverzeichnis

3.2.4 GERINNUNGSPARAMETER	65
3.2.5 ZELLOBERFLÄCHENMARKER	67
3.2.6 ZELLZAHLBESTIMMUNG	69
3.2.7 KOMPLEMENTSYSTEM	72
3.2.8 PGE ₂ / 6-KETO-PGF _{1A}	75
3.2.9 ANTI-PIG-ANTIKÖRPER	79
3.2.10 ANTI-GAL-A1,3-GAL	79
3.2.11 HERZGEWICHT	81
3.3 HISTOPATHOLOGIE	81
4. DISKUSSION	84
4.1 VOR-UND NACHTEILE DES PERfusionSSYSTEMS	84
4.2 KRITERIEN FÜR BLUTSPENDER	85
4.3 UNTERSCHIEDE IN DER GERINNUNG BEI ALLOGENER UND XENOGENER TRANSPLANTATION	85
4.4 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	89
4.4.1 GERINNUNG	89
4.4.2 ENDOTHELZELLAKTIVIERUNG, GEWEBSSCHÄDIGUNG UND HÄMODYNAMIK	89
4.4.3 IMMUNOLOGIE	90
4.4.4 HERZGEWICHT	91
4.4.5 HISTOPATHOLOGIE	91
4.5 BEWERTUNG DER WIRKUNG VON DEFIBROTIDE	91
5. ZUSAMMENFASSUNG	93
6. LITERATURVERZEICHNIS	96
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	113
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
9. ANHANG	121
9.1 PUBLIKATION	121
9.2 DANKSAGUNG	121

1. Einleitung

Transplantation bedeutet Verpflanzung von Zellen, Gewebe oder Organen. Die Allotransplantation beschreibt die Übertragung innerhalb der selben Spezies z.B. von Mensch zu Mensch, die Xenotransplantation hingegen beschreibt die Übertragung zwischen verschiedenen Spezies z.B. von Schwein zu Menschen.

Transplantationen werden bei terminalem Organversagen und bei irreversiblen Organschäden als lebenserhaltende oder therapeutische Maßnahme durchgeführt. Im Jahr 2013 wurden in Deutschland 1408 Nieren, 818 Lebern, 296 Herzen, 345 Lungen und 116 Bauchspeicheldrüsen transplantiert (Zahl der durchgeföhrten Transplantationen Stand 30.11.2013, Eurotransplant Statistics, Einbeziehung von Einzelorganen, Kombinationen und Lebendspenden), doch trotz dieser beträchtlichen Zahlen deckt das Angebot nur etwa ein Drittel der Nachfrage. In Deutschland warten 7860 Patienten auf eine Niere, 1552 auf eine Leber, 915 auf ein Herz, 455 auf eine Lunge und 230 auf eine Bauchspeicheldrüse (Anzahl der Menschen auf den Wartelisten von Eurotransplant Stand 30.11.2013, Eurotransplant Statistics, Einbeziehung von Einzelorganen, Kombinationen und Lebendspenden). Nierenkranke Patienten können größtenteils durch Dialyse solange am Leben erhalten werden bis eine passende Spenderniere gefunden wird, doch Patienten die auf ein Herz oder eine Leber warten, müssen meist wegen schlechten Allgemeinzustandes von der Warteliste genommen werden oder sterben, weil kein Organ rechtzeitig zur Verfügung steht. Auch die zur Verfügung stehenden extrakorporalen Hilfsmittel stellen nur eine geringe Hilfe dar, denn sie sind nur unter strenger Indikation anwendbar und bergen Komplikationen durch die notwendige Antikoagulation oder Risiken durch mögliche Infektionen (Mauer et al. 2003). Durch die Xenotransplantation könnte das Angebot an Spenderorganen gesteigert werden. Seit der Immunologe Peter Medawar 1945 in Oxford zeigte, dass die Abstoßung eines Transplantats die Folge einer aktiven Immunisierung ist (Medawar 1945), wofür er 1960 den Nobelpreis erhielt, ist es klar, dass die immunologische, die pharmakologische, sowie die chirurgische Forschung Hand in Hand gehen müssen. Speziell für die Xenotransplantation müssen zudem noch die physiologischen sowie die ethischen Aspekte berücksichtigt und hinterfragt werden.

1.1 Bedeutende Schritte in der geschichtlichen Entwicklung

Einen der ersten bedeutenden Meilensteine für die Transplantation setzte der Wiener Karl Landsteiner 1901 mit der Entdeckung des AB0-Blutgruppensystems (Deschamps, Roux et al. 2005). 1902 publizierte der Pariser Chirurg Alexis Carrel eine Beschreibung der Gefäßanastomosen-Technik (Carrel 1907). 1955 erfolgte in Boston die erste erfolgreiche Nierentransplantation bei eineiigen Zwillingen durch den Chirurgen Joseph Murray. Fünf Jahre später gelingt es ihm eine Nierentransplantation bei genetisch nicht identischen Brüdern durchzuführen (Murray, Merrill et al. 1956, Merrill, Murray et al. 1960). Für seine revolutionäre Arbeit auf dem Gebiet der Organtransplantation erhält Murray 1990 den Nobelpreis. 1958 wird die immunologische Forschung durch eine neue Erkenntnis bereichert als der französische Immunologe Jean Dausset das HLA-System beschreibt (Dausset, Colombani 1959; Dausset, Walford et al. 1969). Mit dem 1960 erstmalig in der Klinik eingesetzten Immunsuppressivum Azathioprin waren die Grundsteine für eine erfolgreiche Organspende gelegt. Die weltweit erste Transplantation einer Lunge erfolgte 1963 in Jackson, Mississippi durch James D. Hardy (Hardy, Eraslan et al. 1963; Hardy, Webb et al. 1963). Es folgte im Jahr 1966 eine Pankreastransplantation in Minneapolis, Minnesota durch Richard Lillehei (Lillehei and Manax 1966; Lillehei, Manax et al. 1966). Ein Jahr später erfolgte die erste Herztransplantation durch Christian Barnard in Kapstadt (Barnard 1967) und die erste Lebertransplantation durch Thomas E. Starzl (Starzl, Brettschneider et al. 1967) in Pittsburgh, Pennsylvania (Vollmar and Gerbes 2005).

Durch die klinische Etablierung und die zunehmende Zahl an Organtransplantationen erhöht sich die Nachfrage nach Spenderorganen stetig. Dem steht aber nur eine begrenzte Verfügbarkeit von Spenderorganen für die Allotransplantation gegenüber. Hier kann die Xenotransplantation eine mögliche Alternative bieten.

Eine der ersten Veröffentlichungen über xenogene Transplantation erfolgte durch Williams im Jahr 1894. Er versuchte einen Diabetespatienten mit der Übertragung von Schafspankreasgewebe zu behandeln. 1906 transplantierte Jaboulay einem Menschen Schweinenieren und erreichte ein Transplantatüberleben von 72 Stunden. Unger transplantierte 1910 eine Rhesusaffenniere und Neuhof transplantierte 1923 in New York eine Schafsniere. Beide mussten wie auch ihre Vorgänger feststellen, dass der Erfolg ausblieb, da die Organe in kürzester Zeit zerstört wurden. 1963 erzielte Keith Reemtsma in New Orleans den ersten Erfolg (Reemtsma 1969). Durch

7 Einleitung

postoperative Behandlung mit Immunsuppressiva und einer Antikoagulation überlebte die transplantierte Schimpansenniere 9 Monate. Ein Jahr später führte Hardy die erste xenogene Transplantation eines Herzens durch (Hardy, Kurrus et al. 1964), jedoch war das verwendete Schimpansenherz nicht groß genug um die Blutzirkulation aufrecht zu erhalten, sodass der Patient nach nur einer Stunde verstarb. Ross transplantierte 1968 ein Schweineherz und Cooley ein Schafsherz, jeweils bei Patienten mit terminaler Herzerkrankung. In beiden Fällen wurden die Transplantate hyperakut abgestoßen. Eine heterotope Herz xenotransplantation wurde 1977 von Barnard in Kapstadt durchgeführt (Barnard, Wolpowitz et al. 1977). Er pflanzte einem Patienten zur Kompensation eines linksventrikulären Herzversagens zusätzlich ein Pavian- und ein Schimpansenherz zur Unterstützung der eigene Herzfunktion ein. Der Patient verstarb jedoch nach vier Tagen da, sein eigenes Herz zu schwach war. 1984 übertrug Leonard Bailey in Riverside, Kalifornien das Herz eines Pavians auf ein Neugeborenes das sonst keine Überlebenschance gehabt hätte, da es mit einem hypoplastischen Linksherzsyndrom geboren wurde (Bailey, Nehlsen-Cannarella et al. 1985). Man hoffte, dass ein so junger Organismus das Transplantat besser akzeptieren würde, jedoch verstarb Baby Fae nach zwanzig Tagen durch eine immunbedingte Zerstörung des Pavianherzens und folgendem Versagen der restlichen Organe. Czaplicki führte 1992, bei einem Patienten mit Marfansyndrom, eine orthotope Herztranplantation eines Schweineherzen durch. Im Vorfeld der Transplantation wurden der Patient und das Spenderschwein mit Auszügen aus fetalem Thymus und fetalem Kalbserum behandelt, zudem wurde der Patient immunsupprimiert mit Cyclosporin und Azathioprin. Er perfundierte das Transplantat über einen extrakorporalen Kreislauf mit dem Blut des Empfängers, während dieser an einer Herz-Lungen-Maschiene angeschlossen war, um präformierte xenoreaktive Antikörper zu entfernen bzw. abzufangen. Anschließend transplantierte er dem Patienten ein anderes Schweineherz. Das orthotope Transplantat zeigte über 4 Stunden eine gute Pumpfunktion, anschließend sank jedoch die Auswurfleistung mit schlechter peripherer Versorgung. Der Patientin verstarb innerhalb von 24 Stunden, die histologische Beurteilung ergab jedoch keine hyperakute Abstoßung des Xenotransplantats (Czaplicki, Blonska et al. 1992).

1.2 Nutzen der Xenotransplantation

Die Xenotransplantation wirft immer noch zahlreiche medizinische Probleme auf und es ist noch nicht absehbar ob sie letztendlich in der Klinik anwendbar sein wird. Sie würde viele Chancen und Vorteile bieten (Hammer, Linke et al. 1998). Mit einer größeren Anzahl an zur Verfügung stehender Spenderorgane könnte sich die Indikationsbreite erweitern, sodass es möglich wäre jedem Patienten eine Organtransplantation anzubieten bevor sekundäre Organschäden entstehen. Es bestünde die Möglichkeit Operationen über längere Zeiträume zu planen, die Patienten immunologisch gezielt auf das Spenderorgan vorzubereiten und dieses direkt vor Ort zu transplantieren ohne lange Ischämiezeiten. Zudem könnte ein Schweineorgan zur Überbrückung längerer Wartezeiten auf ein neues menschliches Organ dienen (Ekser, Gridelli et al. 2009).

Eine Alternative ist die Herstellung und Weiterentwicklung künstlicher Organe. Jedoch sind die heute zur Verfügung stehenden technischen Systeme meist nicht im Stande, ein biologisches Organ vollständig zu ersetzen. Durch Forschung auf dem Gebiet des *tissue engineering* wird versucht natürliche Gewebe im Labor zu züchten und diese für Transplantationen zu verwenden. Erste Erfolge konnten schon ausgewiesen werden, beispielsweise bei der Transplantation von Haut, Knorpel und Knochen. Aufgrund der technischen Schwierigkeiten besteht aber auf diesem Gebiet noch viel Forschungsbedarf. Eine Erhöhung der Anzahl an Spenderorganen könnte auch durch eine Gesetzesänderung im Sinne einer Widerspruchsregelung, wie es in anderen europäischen Ländern der Fall ist, erreicht werden. Dementsprechend hätte der Tote zu Lebzeiten der Entnahme seiner Organe ausdrücklich widersprechen müssen. Allerdings ist diese Handhabung immernoch moralisch umstritten und daher nicht in absehbarer Zeit zu erwarten. Am 01.11.2012 trat in Deutschland das Gesetz zur Regelung der Entscheidungslösung im Transplantationsgesetz in Kraft. Demnach müssen Krankenkassen und Ämter bei allen Bürgern ab 16 Jahren eine regelmäßige Befragung zur Spendebereitschaft durchführen. Jedoch wäre es selbst dadurch nicht möglich allen Patienten die ein Organ benötigen eine Transplantation zu ermöglichen (Taniguchi and Cooper 1997).

1.2.1 Das Schwein als Organspender

Aufgrund des Spendermangels wird eine Alternative zur Allotransplantation gesucht. Obgleich Primaten phylogenetisch näher mit dem Menschen verwandt sind als

9 Einleitung

Schweine, bieten letztere eine vielversprechendere Möglichkeit zur Verwendung als xenogene Organspender: hohe Anzahl an Nachwuchs, früh geschlechtsreif, kostengünstig, einfach verfügbar, Möglichkeit der Züchtung auf die gewünschte Größe, adäquate physiologische Herzfunktion und Blutzirkulation möglich (Platt 1996; Hammer, Linke et al. 1998; Platt 2000; Platt 2000; Vial, Ostlie et al. 2000; Ibrahim, Busch et al. 2006), keine hohen ethischen Bedenken wie z.B. bei Primaten (Cozzi and Ancona 2003) und Möglichkeit der Genmanipulation und damit der Genom/DNA Modifizierung (Niemann and Kues 2000; Lai, Kolber-Simonds et al. 2002; Ramsoondar, Machaty et al. 2003). Damit hätte man jederzeit die Möglichkeit eine Transplantation zu planen und das genau passende Schwein für den Empfänger in kürzester Zeit zu züchten.

Es bestehen zwar zahlreiche Unterschiede zwischen Menschen- und Schweineorganismus wie beispielsweise in der Proteinbiosynthese, im Hormonsystem oder im Gerinnungssystem (Hammer, Linke et al. 1998), diese können jedoch durch medikamentöse Therapien ansatzweise überwunden werden. Die bisherigen Studien verzeichnen Erfolge von bis zu 6 Monaten Transplantatüberleben in einem heterotopen Modell und bis zu 2 Monate in einem orthotopen Modell, jedoch mit einer klinisch nicht akzeptablen Dosis an Immunsuppressiva. Eine große Problematik stellt zudem die unter Immunsuppressiva verminderte Immunkompetenz und damit erhöhte Infektionsanfälligkeit dar, v.a. in Betracht auf mögliche Übertragungen von Xenozoonosen wie z.B. PERV (porciner endogener Retrovirus) (Chapman, Folks et al. 1995; Allan 1996; Allan 1996; Chapman, Heneine et al. 1999; Chapman 2009; Denner, Schuurman et al. 2009; Pierson, Dorling et al. 2009), das in der DNA von Schweinezellen integriert ist. Bislang wurde jedoch keine in-vivo Infektion humaner Zellen durch PERV beobachtet (Michie 2001; Ekser, Rigotti et al. 2009). Um ein eventuelles Risiko zu reduzieren wird angestrebt,erregerfreie Schweinstämme zu züchten, d.h. PERV mit Hilfe eines gentechnologischen *Knock-out* Verfahrens aus dem Genom der Schweine zu eliminieren. Zudem können Schweine unter pathogenfreien Bedingungen gehalten werden (*qualified pathogen free keeping*) (Iverson and Talbot 1998; Tucker, Belcher et al. 2002) um eventuelle Infektionen zu verhindern.

Eine zusätzliche Strategie wäre die engmaschige Überwachung des Organenempfängers kombiniert mit der Archivierung des Xenotransplantatgewebes. Somit könnten bei infizierte Empfänger bekannte wie auch unbekannte Erreger

10 Einleitung

erkannt und katalogisiert werden um zukünftig Therapien gegen diese zu entwickeln. Dieser Prozess setzt jedoch die Bereitschaft der Xenotransplantatempfänger voraus an engmaschigen Überwachungen über einen langen Zeitraum teil zu nehmen (Pierson 2009; Denner, J., H. J. Schuurman, et al. 2009).

Die WHO (World Health Organisation) hat Regeln und Voraussetzungen festgelegt für xenogene Transplantationsversuche an Menschen (First WHO Global Consultation on Regulatory Requirements for Xenotransplantation Clinical Trials. Changsha, China 19-21 Nov 2008). Können diese erfüllt werden liegt das Ziel dem Organmangel durch Einsatz von Schweineorganen entgegenzuwirken nicht mehr fern.

1.3 Ätiologie der Transplantatabstoßung

Bei einer Organtransplantation können drei Ätiologien der Transplantatabstoßung beobachtet werden: die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßung.

Im Falle der Xenotransplantation ist auch die Unterscheidung in konkordant und diskonkordant (Calne 1970) von Bedeutung. Konkordant bezeichnet die Transplantation von Organen phylogenetisch nah verwandter Spezies wie Primat und Mensch. In diesem Fall wird das Transplantat mit der selben Geschwindigkeit und Intensität abgestoßen wie ein Allotransplantat. Die hyperakute Abstoßung findet hier in der Regel nicht statt.

Diskordant ist dementsprechend die Übertragung von Organen zwischen phylogenetisch weiter entfernter Spezies wie Schwein und Mensch, wobei das Spenderorgan durch die Reaktion präformierter Antikörper beim Empfänger hyperakut, d.h. innerhalb weniger Minuten, abgestoßen wird. Diese Antikörper binden an organismusfremde Antigene, wodurch das Komplementsystem aktiviert wird. Dadurch wird fremdes Gewebe angegriffen und zerstört. Diese Abstoßungsreaktion ist vergleichbar mit der Reaktion einer ABO-Inkompatibilität (Galili 2006).

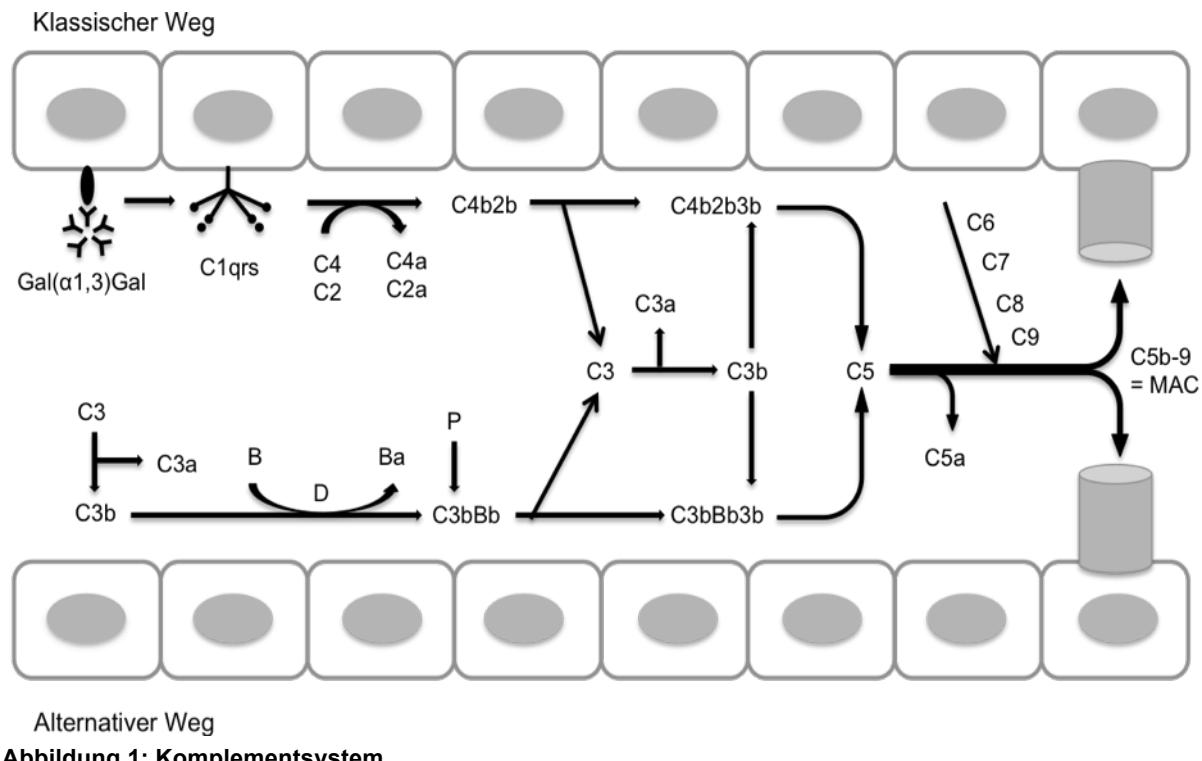
1.3.1 Hyperakute Abstoßung

Bei der Organübertragung zwischen diskordanten Spezies werden als Folge des hohen Grades an Diskompatibilität verschiedene Stufen der Abstoßung beobachtet. Bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion binden präformierte natürliche Antikörper

11 Einleitung

(PNAK), meist der Klasse IgM (Cooper, Koren et al. 1994; Parker, Bruno et al. 1994), im Blut des Empfängers an spezifische Epitope auf den Endothelzellen des Xenotransplantats. Diese PNAK werden, wie auch die Agglutinine des AB0-Systems, als „natürliche“ Antikörper bereits kurze Zeit nach der Geburt als Reaktion auf die Kohlenhydratantigene von Darmbakterien gebildet (Galili, Mandrell et al. 1988). Die hierbei entscheidenden Antigenstrukturen sind Galaktosyl-alpha-1,3-Galaktosyl-Reste (Gal- α 1,3-Gal) (Galili, Shohet et al. 1988; Good, Cooper et al. 1992; Oriol, Ye et al. 1993; Sandrin, Vaughan et al. 1993; Zhu 2000; Galili 2001) von Glykoproteinen und Glykolipiden, die den Blutgruppenantigenen gleichen. Die resultierenden Immunkomplexe bewirken eine direkte Aktivierung des Komplementsystems (Dalmasso 1992; Dalmasso, Vercellotti et al. 1992; Roos and Daha 2002) vor allem über den klassischen Weg, in geringem Ausmaß auch über den alternativen Weg. Der am Ende der Komplementkaskade gebildete Membran-Angriffs-Komplex (MAC) verursacht eine Lyse der Endothelzellen, wodurch unter anderem P-Selektin, Histamin und Plättchen-Aktivierungs-Faktor (PAF) freigesetzt werden. Es kommt zu einer Kontraktion der Endothelzellen (Suckfüll, Pieske et al. 1994; Robson, Candinas et al. 1995) und zur Freilegung der subendothelialen Matrix und des Gewebefaktors (*tissue factor*). Dadurch wird die Thrombozytenaggregation gefördert und das Gerinnungssystem aktiviert, was wiederum zu Verschlüssen der Arteriolen durch Mikrothromben führt. Interstitielle Hämorrhagien führen zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität mit Ödemen. Mikroskopisch sind hierbei thrombotische Gefäßverschlüsse, venöse Stauungszeichen, entzündliche Reaktionen und Nekrosen mit Ablagerungen von Immunglobulinen, Komplement und Fibrin zu erkennen. In der Gesamtheit führen diese Prozesse innerhalb von Sekunden bis Minuten zu einer letztendlich ischämischen Zerstörung des Xenotransplantats (Pielsticker, Schilling et al. 1971; Lawson and Platt 1996; Platt 1996; Pierson, Dorling et al. 2009).

12 Einleitung



Klassischer Weg: PNAK reagieren mit den Gal- α 1,3-Gal-Epitopen auf den Endothelzellen und führen zur Bindung der ersten Komplementkomponente C1q, an die Fc-Teile zweier benachbarter Antikörpermoleküle. In Verbindung mit den zwei Molekülen C1r und C1s entsteht eine aktive Protease. Diese Serinesterase C1rs spaltet die α -Untereinheiten der Komponente C4 ab und nach der Anlagerung von C2 an C4b auch die von C2. Es entsteht die membrangebundene C3-Konvertase C4b2b. Dieser Komplex spaltet das C3-Molekül in den Entzündungsmediator C3a und C3b das sich mit C4b2b zu dem membranständigen Komplex C4b2b3b verbindet. Dieser Komplex spaltet wiederum C5 wobei das Anaphyltoxin C5a frei wird. C5b bindet an C6 und C7, welches eine Membranbindungsstelle besitzt. Die Bindung von C8 an C5b67 löst schon eine geringfügige Lyse aus. Durch die Polymerisierung von mehreren C9 Komponenten an C5b678 entsteht eine Tunnelstruktur, der Membran-Angriffs-Komplex (MAC) der zur Lyse der Zelle führt.

Alternativer Weg: Unter Umgehung der ersten Komplementkomponenten unterliegt C3 im Plasma auch einer limitierten Hydrolyse durch Plasmaproteasen. Das auf diese Weise in geringer Menge gebildete C3b kann kovalent an eine xenogene Oberfläche binden und ermöglicht die Anlagerung von Faktor B. Von diesem wird durch Faktor D der kleine Ba-Anteil abgespalten. Der enzymatisch aktive Komplex

13 Einleitung

C3bBb (C3- Konvertase) spaltet weitere C3- Moleküle in ihre Untereinheiten. Ein Teil der neu gebildeten C3b-Moleküle bindet kovalent an benachbarte Oberflächen und fungiert als neue Anlagerungsstelle für Faktor B (Verstärkungsschleife). Durch Ankopplung eines weiteren C3b-Moleküls entsteht die C5-Konvertase C3bBbC3b. Nach der Spaltung von C5 erfolgt die Bindung der restlichen Komponenten C6 – C9, so dass wie beim klassischen Weg der MAC aufgebaut werden kann.

Die hyperakute Abstoßung bei xenogener Transplantation kann durch verschiedene Ansätze vermieden werden. Beispielsweise besteht die Möglichkeit die Gal- α 1,3-Gal-Antikörper mittels einer Immunabsorptionssäule vorzeitig aus dem Blut des Empfängers zu eliminieren (Brenner, Hinz et al. 1999). Es stehen auch transgene Gal- α 1,3-Gal-knock-out-Schweine zur Verfügung (Lai, Kolber-Simonds et al. 2002; Nottle, Beebe et al. 2007; Sachs, Yamada et al. 2007), die im Idealfall das Antigen gar nicht oder nur in geringem Maße exprimieren. Zudem soll mit antiischämisch, antithrombotisch und antiinflamatorisch wirkenden Medikamenten, wie dem hier zu testenden Defibrotide, der Ischämie-Reperfusionsschaden verringert werden, um von vornherein eine bessere Leistung des Herzens zu gewährleisten.

1.3.2 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung kann in zwei Gruppen Unterteilt werden:

- Die vaskuläre (humorale) Abstoßung die, ähnlich wie bei der hyperakuten Abstoßung, zur Schädigung der Gefäße im transplantierten Organ führen.
- Die zelluläre Abstoßung bei der Makrophagen und natürliche Killerzellen des Immunsystems aktiviert werden und das Organ zerstören.

Vaskuläre (humorale) Abstoßung

Gelingt es die hyperakute Abstoßung zu überwinden, so kann in den darauffolgenden Stunden bis Tagen die akut vaskuläre Abstoßung einsetzen. Diese geht auf aktivierte B-Zellen des Empfängerorganismus zurück, welche hohe Titer von IgM und IgG produzieren. Diese Antikörper zielen unter anderem auf das Gal- α 1,3-Gal der xenogenen Endothelzellen ab. Im Falle der Transplantation von Schweineorganen ist auch die Entstehung spezieller Anti-Pig-Antikörper (APA) zu beobachten (Asaoka and Matsuda 1994; Nagayasu, Saadi et al. 2000; Zhu and Hurst 2002; Pierson, Dorling et al. 2009). Die weiteren Abläufe ähneln denen der hyperakuten Abstoßung und führen letztlich erneut über Thrombozytenaggregation,

14 Einleitung

Thrombusbildung (v.a. in den kleinen Gefäßen), Endothelzellruptur, Hämorrhagie, Leukozyteninfiltration und Entstehung interstitieller Ödeme zur ischämischen Organerstörung (Goddard, Dunning et al. 2001).

Da die akute vaskuläre Abstoßung durch neu gebildete Antikörper gekennzeichnet ist, kann sie Mittels spezieller B-Zell-Immunsuppressiva wie z.B. dem Zytostatikum Cyclophosphamid oder dem Anti-CD20 Antikörper Rituximab verzögert werden.

Zelluläre Abstoßung

Bei der hyperakuten Abstoßung wird eine direkte Endothelzellaktivierung (Typ I) beobachtet. Bei der akuten Abstoßung wird eine Typ II Endothelzellaktivierung beobachtet (Palmetshofer, Galili et al. 1998; Palmetshofer, Robson et al. 1998), die durch Induktion von Genen und Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und prokoagulatorischen Faktoren gekennzeichnet ist (Blakely, Van der Werf et al. 1994; Blakely, Van der Werf et al. 1994; Itescu, Kwiatkowski et al. 1998; Itescu, Tung et al. 1998; Itescu, Tung et al. 1998). Durch Bindung xenoreaktiver Antikörper an Gal-/non-Gal-Epitope wird die porcine Endothelzelle über Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert (Palmetshofer, Robson et al. 1998). Durch diese Aktivierung verliert die Endothelzelle ihre antithrombotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften. Durch verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und prokoagulatorischen Proteine, sowie Sekretion von Zytokinen (TNF- α , IFN, IL-6), vasokonstriktiven und prokoagulatorischen Stoffen wie tissue factor, plasminogen activator inhibitor und Thromboxan A₂, kommt es zu mikrovaskulären Thrombosierungen, thrombotischen Gefäßverschlüssen und folglich zu Infarzierungen im Transplantat (Ogata and Platt 2004).

Die akute zelluläre Abstoßung wird bei der Allotransplantation durch T-Zellen vermittelt, die Fremd-MHC (major histocompatibility complex) erkennen und zerstören (Samstein and Platt 2001; Perico, Benigni et al. 2002). Die speziespezifischen Unterschiede im Aufbau der MHC-Moleküle führen jedoch bei der Xenotransplantation vermutlich zu einer indirekten T-Zell-Aktivierung über antigenpräsentierende Zellen (APC) (Dorling, Binns et al. 1996; Dorling, Binns et al. 1996; Dorling, Lombardi et al. 1996). Es wird angenommen, dass T-Zellen bei der Transplantatabstoßung über zwei Mechanismen beteiligt sind. Zum einen über die Induktion der Synthese von Anti-Spender Antikörper um somit eine Antikörper abhängigen Zytotoxizität zu bewirken, zum anderen über eine direkte zytotoxische

15 Einleitung

Wirkung (Sebille, Gagne et al. 2001; Sebille, Guillet et al. 2001; Tanemura, Chong et al. 2002).

Zeitgleich bewirkt die Bindung xenoreaktiver Antikörper eine strukturelle Veränderung des Fc-Fragmentes, so dass sie von Fc-Rezeptoren auf Monozyten (Millan, Geczy et al. 1997) und NK-Zellen (Natürliche Killer Zellen) erkannt werden können (Goodman, von Albertini et al. 1996), was letztlich ebenso zur Freisetzung von Cytokinen und zur Lysierung von Endothelzellen führt.

NK-Zellen können aber auch Antikörper unabhängig xenogene Epitope erkennen und Endothelien zerstören (Goodman, Von Albertini et al. 1996). So wird die Monozytenadhäsion an das porcine Endothel und Migration durch das porcine Endothel unter anderem über einen NK-Zell-abhängigen Signalweg vermittelt (Itescu, Kwiatkowski et al. 2000). Weiterhin werden durch die Bindung von NK-Zellen an porcine Endothelzellen sowohl diese als auch die bindenden NK-Zellen aktiviert (Malyguine, Saadi et al. 1996; Sprangers, Waer et al. 2008).

Die für die Allotransplantation bereits etablierte Immunsuppression, die primär aus einem effektiven T-Zell Immunsuppressivum (z.B. Cyclosporin, Tacrolimus oder Sirolimus) besteht und durch Antimetabolite (z.B. Azathioprin) und Steroide unterstützt wird, wird auch zur Prophylaxe der akuten Abstoßung des Xenotransplantats verwendet (Cozzi, Vial et al. 2003).

1.3.3 Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung tritt in der Regel erst mehrere Monate nach erfolgter Transplantation auf und kann bei der Xenotransplantation derweil noch nicht beobachtet werden, da die Transplantate bisher keine dementsprechende Überlebenszeit vorweisen. Sie wird bei der Allotransplantation durch ähnliche Vorgänge verursacht wie bei der Pathogenese der Arteriosklerose und führt letztendlich zur Transplantarteriopathie (Weis and von Scheidt 2000). Durch die chronische Entzündungsreaktion kommt es zu einer ständigen Endothellaktivierung mit Intimaproliferation, Vermehrung der glatten Gefäßmuskelzellen, sowie einer Fibrosierung im Interstitium. Die Folgen dieses Umbaus sind Stenosen der Gefäße und eine darauß folgende Minderversorgung des Transplantats. Die chronische Abstoßung lässt sich derzeit nur unzureichend mit den zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva behandeln oder gar verhindern. Eine

16 Einleitung

Verbesserung der Prognose bringt eine Therapie mit Statinen (zur Lipidsenkung) (Jones 2001; Wenke, Meiser et al. 2003). Im Allgemeinen sollten die Risikofaktoren für die Entstehung von Arteriosklerose, wie z.B. Hypertonus, Hyperlipidämie oder Diabetes mellitus so gering wie möglich gehalten werden.

Positive Effekte hat auch das Immunsuppressivum Sirolimus. Es wirkt antiproliferativ auf glatte Muskelzellen und trägt dazu bei, die chronische Transplantatvaskulopathie und Nephropathie zu reduzieren (Groetzner, Kaczmarek et al. 2004).

1.4 Ischämie-Reperfusionsschaden bei Organtransplantation

Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist ein multifaktorielles Geschehen das eine bedeutende Rolle bei der Organtransplantation spielt und mitunter anderen eine Ursache für die primäre Transplantatdysfunktion darstellt. Die Schäden während der Ischämiezeit sind initial reversibel, werden aber bei zunehmender Ischämiedauer irreversibel und führen letztendlich zu Apoptosen und Gewebsnekrosen.

1.4.1 Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusioesschadens

Kurze Zeit nach Induktion der kalten Ischämie kommt es zu Umstellungsreaktionen im Gewebe als Antwort auf die anaerobe Stoffwechsellage. Der Umwandlungsprozess dauert am Herzmuskel ca. 8 Minuten (Klinische Kardiologie von Erland Ermann, 6. Auflage, Springer Verlag). Der Sauerstoffmangel führt zu einem Abbau von Adenosintriphosphat (ATP) was wiederum zu einem Anstieg des Abbauprodukts Hypoxanthin führt. Gleichzeitig bewirkt der Funktionsverlust der ATP abhängigen Ionentransporter einen Kaliumausstrom und einen Calciumeinstrom. Die anaerobe und damit azidotische Stoffwechsellage bewirkt eine akute Entzündungsreaktion mit erhöhter Gefäßpermeabilität und Bildung von Zytokinen wie TNF- α . TNF- α triggert die Umwandlung des Enzyms Xanthinhydrogenase zu Xanthinoxidase welches Hypoxanthin zu Xanthin oxidiert (Brass, Narciso et al. 1991; Zhang, Xu et al. 2006; Duran 2008). In diesem Prozess entstehen freie Sauerstoffradikale die das Gewebe direkt angreifen und schädigen und zu einer Endotheldysfunktion mit Störung der antithrombotischen und antiproliferativen Wirkung führen (Meiser, von Scheidt et al. 1997). Zudem beeinträchtigen freie Sauerstoffradikale die Bioverfügbarkeit von NO (Stickstoffmonoxid wird im Gefäßendothel freigesetzt) wodurch die NO abhängige Vasodilatation gestört wird (Zhang, Xu et al. 2006). Die Sauerstoffradikale und die Entzündung rufen eine

17 Einleitung

verstärkte Akkumulation von Leukozyten (v.a. neutrophile Granulozyten) hervor und begünstigen deren Rollen und die Gefäßmigration via Adhäsionsmolekülen. Aktivierte Leukozyten aktivieren wiederum Botenstoffe wie den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) oder auch Leukotriene (Hernandez, Grisham et al. 1987) was vermehrt zur Ausbildung von Mikrothromben führt und eine Inflammation verstärkt. Dieser Prozess ist ein *circulus vitiosus* bei dem das Gewebe durch die Zunahme der Gefäßpermeabilität und der damit verbundenen Ödementstehung massiv geschädigt wird, da durch den steigenden Druck im Gewebe eine Minderdurchblutung resultiert und die Azidose im geschädigten Gewebe zunimmt. Zusätzlich kommt es durch die Störung der Ionentransporter zu einer Ansammlung von Ionen in den Zellen und damit zu einer Wasserverschiebung von intravasal zu intrazellulär wodurch Zellen anschwellen und die Viskosität des zirkulierenden Blutes steigt (Day, Rayburn et al. 1995).

Bei anschließender Reperfusion des ischämischen Gewebes ist die Schädigung zum Teil reversibel doch kommt es in manchen Arealen des Myokards zu einem weiteren Absterben vitaler Zellen was als letaler Perfusionsschaden bezeichnet wird (Yellon and Baxter 1999; Hausenloy and Yellon 2004). Eine ebenso nach Reperfusion vorkommende Funktionsstörung ist das *myocardial stunning* bei der vitalen Zellen eine verminderte Kontraktilität aufweisen. Diese Störung ist nach einigen Tagen bis Wochen reversibel (Braunwald and Kloner 1982; Bolli and Marban 1999). Durch die in der Ischämiephase entstandene Calcium-Kaliumionenverschiebung (durch vorübergehende Inaktivität der Ionenpumpen) kommt es während der Reperfusion zu Arrhythmien, die das Myokard zusätzlich in seiner Funktion behindern (Braunwald and Kloner 1982; Ferdinand, Schulz et al. 2007). Die während der Ischämie entstandene Störung der Mikrozirkulation und die Gewebsödeme führen während der Reperfusion zu dem so genannten *no reflow Phänomen* (Land, Meemer 1996) bei dem trotz erneuter Durchblutung der großen Gefäße die Perfusion in Teilen der Mikrozirkulation sistiert (Vinten-Johansen 2004; Ito 2006). Auf zellulärer Ebene kann während der Ischämiezeit eine Veränderung in den Mitochondrien beobachtet werden. Es kommt zu erhöhten intra-mitochondrialen Calciumkonzentrationen, zu einer verminderten ATP-Konzentration und zu oxidativen Stress. Dies triggert die Bildung von Poren an der Innenmembran (mitochondrial permeability transition pore). Kommt es anschließend zur Reperfusion und damit zur Normalisierung des pH-Wertes öffnen sich diese Poren und erlauben diverse Proteine die innere Membran

18 Einleitung

zu passieren. Durch den osmotischen Gradienten ziehen die Proteine extrazelluläre Flüssigkeit in die Zellen wodurch diese anschwellen und platzen. Gleichzeitig werden mitochondriale Proteine aus den Zellen ausgeschwemmt was der Trigger zur Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) ist (Halestrap, Clarke et al. 2004; Zweier and Talukder 2006).

1.4.2 Ansätze zur Verminderung des Ischämie-Reperfusions schadens

Die Dauer der Ischämiezeit korreliert mit dem Schaden des Organs, daher sollte sie so kurz wie möglich gehalten werden (Brenner, Hinz et al. 1999; Brenner, Hinz et al. 2000). Während der Transplantation wird das Gewebe im Eisbad auf 4°C heruntergekühlt; dies bewirkt eine Minimierung metabolischer Prozesse und damit eine Senkung des Sauerstoffbedarfs im Organ. Ein Temperaturabfall von 10°C im Gewebe zeigt eine Reduktion der Enzymaktivität um das 1,5 – 2 fache (Jahania, Sanchez et al. 1999). Hypothermie vermindert zudem die durch Ischämie bedingte erhöhte Gefäßpermeabilität (Fischer, Renz et al. 1999) und die Endothelzellaktivierung mit Ausbildung von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten und Thrombozyten wie z.B. E-selectin (Johnson, Haddix et al. 1995; Haddix, Pohlman et al. 1996).

Ein weiterer Ansatz zur Preservation des Myokards während des Herzstillstandes ist die Verwendung organprotektiver Kardioplegialösungen z.B. Bretschneiderlösung. Sie ermöglichen durch Reduktion des transmembranösen Kaliumgradienten einen schnellen Herzstillstand innerhalb von 30-60 Sekunden (Jahania, Sanchez et al. 1999). Außerdem enthalten Kardioplegialösungen Substrate die der Aufrechterhaltung der Energieproduktion, der Azidosepufferung, der Membranstabilisierung und der Ödemverringerung dienen (Yang and He 2005).

Zusätzlich zu Hypothermie, Verkürzung der Ischämiedauer und Verwendung von Kardioplegialösung, wird in diesen Versuchen ein Mittel Namens Defibrotide angewandt. Durch Defibrotide soll eine bessere Oxygenierung des Gewebes nach Ischämie gewährleistet und damit eine Verminderung der anfallenden freien Sauerstoffradikale mit Reduktion der Myokardschädigung erreicht werden.

1.5 Defibrotide

Unser zu untersuchendes Medikament Defibrotide ist ein Produkt der italienischen Firma Gentium, das 1986 als Injektionslösung und 1992 als Tablette in Italien auf den Markt kam. Es ist ein polydisperses Gemisch aus 90% einzelstängigen Polydesoxyribonukleotiden, das durch kontrollierte Denaturierung und Depolymerisierung aus Schweinedarm-Mukosa gewonnen wird (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012).

Schon seit den 80'er Jahren wurde mit Defibrotide geforscht. Bisher wurde es auf dem Gebiet der VOD (hepatic veno-occlusive disease), eine starke thromboembolische Reaktion die nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (HSCT) oder Hochdosischemotherapie auftritt, erfolgreich eingesetzt (Corbacioglu, Kernan et al. 2012; Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Richardson, Soiffer et al. 2010; Zhang, Wang et al. 2012; Kornblum, Ayyanar et al. 2006; Shah, Jeevangi et al. 2009). Defibrotide reduziert das prokoagulatorische Milieu, wirkt antiischämisch (Niada, Porta et al. 1985; Niada, Porta et al. 1986), pro-fibrinolytisch und antithrombotisch (Gryglewski, Marcinkiewicz et al. 1989). Durch die genannten Eigenschaften soll Defibrotide die Infarktgröße im Myokard reduzieren und vor Folgen von Ischämie-Reperfusionsschäden schützen (Thiemermann, Thomas et al. 1989; Hohlfeld, Strobach et al. 1993) wodurch die Hämodynamik verbessert werden könnte (Rossoni, Pompilio et al. 1999).

Zwar sind noch nicht alle Effekte und Wirkmechanismen von Defibrotide untersucht, aber die bisherigen *in vitro* und *in vivo* Forschungen belegen die in der Tabelle 1 aufgeführten Einwirkungen auf das Endothel und die Hämostase und die damit verbundenen Effekte die wir uns in unserem Ischämie-Reperfusions-Modell zunutzte machen möchten um eine Transplantatdysfunktion zu verhindern.

Funktionen von Defibrotide

- a) erhöht die endogenen PGI_2 - und PGE_2 -Level wodurch der Lipooxygenaseweg gebremst wird → Reduktion der Leukotriene B_4 Level → antiischämische/ antiinflammatorische Wirkung und Vasodilatation; zudem wird durch erhöhte PGI_2 -Level TXA_2 antagonisiert → antithrombotische Wirkung
- b) stimuliert die Expression von Thrombomodulin in den Endothelzellen der Gefäße → antithrombotische Wirkung
- c) stimuliert die Fibrinolyse durch Erhöhung der t-PA und TFPI Aktivität und Reduktion der PAI-Level (Plasminogenaktivator-Inhibitor)
- d) es bindet an das Gefäßendothel über die Adenosin Rezeptoren A1 und A2 und wirkt dort als Agonist

Tabelle 1: Funktionen von Defibrotide (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013)

Zu a):

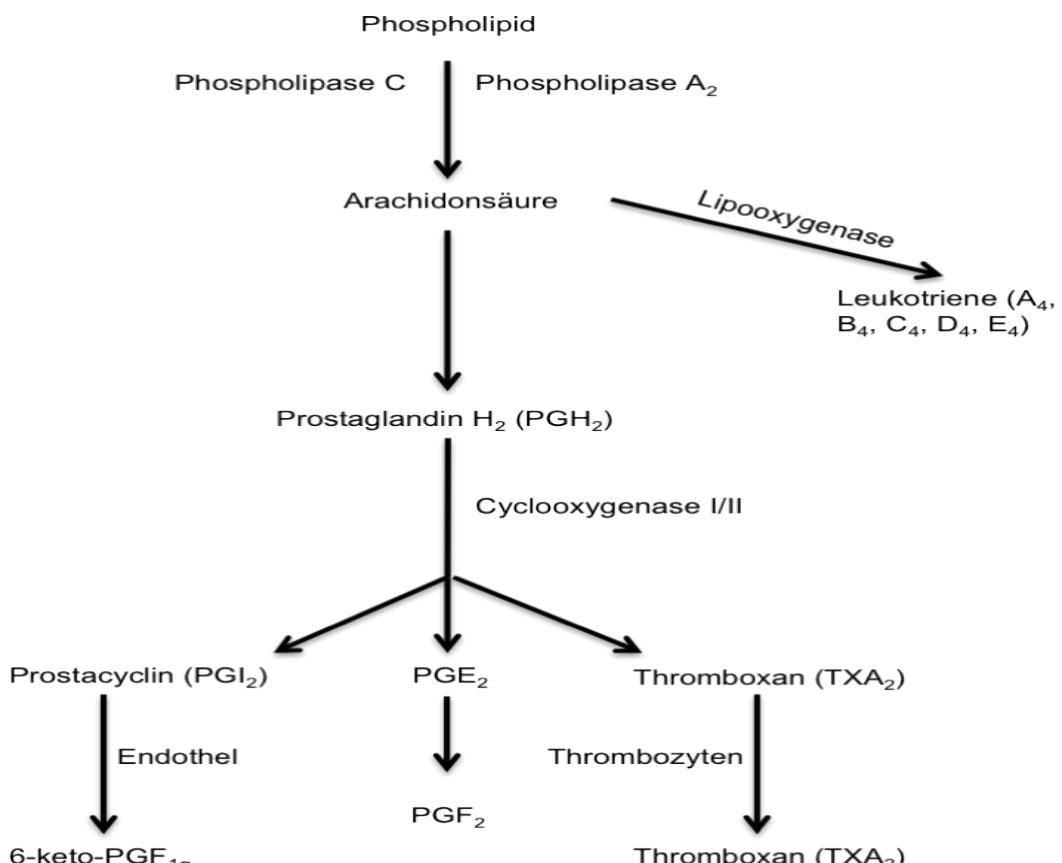


Abbildung 2: Entstehungsweg der Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene aus Arachidonsäure (Biochemie und Pathobiochemie; Löffler G., 7.Auflage, Springer-Verlag, 2002)

21 Einleitung

- Deibrotide erhöht den PGE₂-Spiegel (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013). PGE₂ bewirkt eine Vasodilatation über direkte Beeinflussung der Gefäße oder über Modulation am sympathischen Nervensystem der Gefäße und inhibiert die Migration von Leukozyten. Zudem vermittelt es während dem Entzündungsgeschehen die Schmerzsensibilisierung, die Temperaturerhöhung und die Ödembildung durch Förderung des Flüssigkeitsaustritts in das Gewebe. PGE₂ wirkt dabei an dem membranständigen, G-Protein gekoppelten Rezeptor EP₁. Die Signaltransduktion erfolgt über eine cAMP-Erhöhung. Das cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) ist ein *second messenger* der die Proteinkinase A aktiviert. Diese führt über eine Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase zu einer Relaxation der glatten Muskulatur (SMC) in arteriellen Blutgefäßen, während venöse Blutgefäße eher kontrahiert werden.
- Defibrotide erhöht den PGI₂-Spiegel (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013). PGI₂ wird vor allem von den Endothelzellen während einem Entzündungsprozess gebildet und wirkt als Gegenspieler (direkter Antagonist) zu TXA₂. Es relaxiert die glatte Muskulatur arterieller Gefäßwände, bewirkt dadurch eine Vasodilatation und hemmt die Thrombozytenaggregation reversibel (Matsumoto, Kihira et al. 1984) wodurch es eine bessere Durchblutung sicherstellt und antithrombotisch wirkt. In hohen Konzentrationen hat es einen kontraktilen Effekt auf Venen und Lymphgefäße. Die Signaltransduktion von PGI₂ am IP-Rezeptor erfolgt ebenfalls über eine cAMP-Erhöhung.
- TXA₂ (Thromboxan) wird hauptsächlich von Thrombozyten gebildet. Es fördert die Thrombozytenaggregation und bewirkt eine Vasokonstriktion. Bei vermehrter Aktivität kann es zu Thrombosen führen. TXA₂ wirkt über den TP-Rezeptor. Die Signaltransduktion erfolgt über den IP₃/DAG-Mechanismus und führt zur Ausschüttung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration und dadurch zu einer Aktivierung der Proteinkinase C, die der Phosphorylierung von Zielproteinen dient. Durch erhöhte PGI₂-Level wird TXA₂ antagonisiert womit eine antithrombotische Wirkung erzielt wird (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012;

22 Einleitung

Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013).

- LTB₄ (Leukotriens B₄) wird im Rahmen einer Entzündung durch Makrophagen ausgeschüttet um Leukozyten anzulocken (Chemotaxis). Daneben wirkt es vasokonstriktorisch und erhöht die Permeabilität der Gefäße, was zu einer Flüssigkeitsansammlung im extrazellulären Bereich (Ödembildung bei Entzündung) und somit zu ischämischen Zuständen im Gewebe führt. Durch Erhöhung der endogenen PGI₂- und PGE₂-Spiegel wird der Lipooxygenaseweg gebremst wodurch es zu einer Reduktion der Leukotriens B₄-Spiegel kommt und damit zu einer antiischämischen und antiinflammatorischen Wirkung durch Defibrotide (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013).

Zu b): Defibrotide stimuliert die Expression von Thrombomodulin (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013). Das Glycoprotein Thrombomodulin sitzt an der Oberfläche von Endothelzellen. Es bindet Thrombin mit hoher Affinität und kann es dadurch teilweise inaktivieren. Thrombin kann dadurch nicht mehr Fibrinogen zu Fibrin umwandeln. Stattdessen werden Protein C und S aktiviert, die gemeinsam in Anwesenheit von Calcium an gerinnungsfördernde negative Phospholipide binden und so die Faktoren V und VIII der Gerinnungskaskade inaktivieren.

Zu c): Unter physiologischen Bedingungen laufen Gerinnung und Fibrinolyse immer gleichzeitig ab. Die Fibrinolyse dient dabei dem Umbau des Thrombus, sodass die Verletzung im Gefäß repariert und der normale Blutfluss wiederhergestellt wird. Der Abbau des Fibrinnetzwerkes erfolgt durch Plasmin. Der Vorläufer des Plasmins ist Plasminogen, das durch t-PA (tissue-Plasminogenaktivator) in die aktive Form umgewandelt wird.

TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) reguliert die Produktion von Thrombin (Faktor IIa) indem es reversibel die Aktivierung von Faktor VII durch Tissue factor und damit die Aktivierung von Faktor X hemmt.

PAI (Plasminogenaktivator-Inhibitor) ist ein von den Endothelzellen hergestelltes

23 Einleitung

Glykoprotein welches dazu dient die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin zu inhibieren.

Defibrotide stimuliert die Fibrinolyse durch Erhöhung der t-PA- und TFPI-Aktivität und Reduktion der PAI-Spiegel (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013).

Zu d) Stoffe wie Defibrotide die agonistisch an den A₁-Rezeptor binden (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013) bewirken eine negative Inotropie (Reduktion der Kontraktilität), eine negative Dromotropie (Verzögerung der Erregungsleitung) und eine negative Chronotropie (Reduktion der Schlagfrequenz) durch Modulation am Sinus- und AV-Knoten.

Stoffe die agonistisch an den A₂-Rezeptor binden bewirken eine Vasodilatation der Koronargefäße (Chandrasekera, McIntosh et al. 2010).

Alle Adenosinrezeptortypen zusammen haben einen kardioprotektiven Effekt (Albrecht-Kupper, Leineweber et al. 2011; Tendera, Gaszewska-Zurek et al. 2012). Eine Wirkung am A₃-Rezeptor ist bisher nicht beschrieben.

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist, in einem xenogenem Perfusionsmodell ohne die Einflüsse immunsupprimierender Faktoren, die Wirkungsweise und den Einfluss von Defibrotide auf die Ischämie-Reperfusionphase zu zeigen. Die Hinzugabe von Defibrotide soll den Ischämie-Reperfusionsschaden vermindern, wodurch ein positiver Effekt auf die Funktionsfähigkeit des Xenotransplantates im Verlauf späterer Abstoßungsprozesse erreicht werden soll.

Die Abstoßungsreaktion von xenogenen Organen führt zu einem mikrovaskulären Endothelzellschaden. Dieser führt zur Aktivierung von Thrombozyten, intravaskulären Thrombosen und interstitiellen Hämorrhagien. Defibrotide ist eine polydisperse Mischung von porcinen Oligonukleotiden, die zu 90% als Einzelstränge vorliegen. Defibrotide reduziert das prokoagulatorische Milieu, wirkt antiischämisch (Niada, Porta et al. 1985; Niada, Porta et al. 1986), antithrombotisch und pro-fibrinolytisch (Gryglewski, Marcinkiewicz et al. 1989), ohne jedoch eine signifikante antikoagulatorische Wirkung auszuüben. Die Gabe von Defibrotide führt zu erhöhten

24 Einleitung

Spiegeln von Prostaglandinen und Prostazyklin und hat einen positiven Einfluss auf den Ischämie-Reperfusionschaden (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013). Das komplexe Wirkungsspektrum von Defibrotide hat möglicherweise einen hemmenden Einfluss auf die hyperakute Abstoßung nach Xenotransplantation.

Sollte es möglich sein, die angegebenen positiven Eigenschaften von Defibrotide in diesem Modell vorzuzeigen, so könnte es idealerweise in der Xenotransplantation als zusätzliche Medikation z.B. als Augmentation der kardioplegischen Lösung (Rossoni, Pompilio et al. 1999) verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Perfusionssystem (Working-Heart, Langendorff)

Das Modell sollte die extrakorporale Perfusion eines schlagenden Herzens unter physiologischen Bedingungen ermöglichen, daher sollten folgende Kriterien erfüllt sein:

- Physiologische Blutgase im arteriellen Blut: PCO_2 (32-45 mmHg), PO_2 (75-100 mmHg), pH (7,35-7,45), HCO_3^- (22-26 mmol/l), Hkt (30% entsprechend dem Hämatokrit von Schweinen), Na^+ (135-145 mmol/l), K^+ (3,6-5,4 mmol/l)
- Eine Temperatur zwischen 37-38°C

2.1.1 Aufbau

Das verwendete Perfusionssystem orientierte sich an dem Working-Heart Modell, welches in dieser Form erstmals 1993 von Forty (Forty, White et al. 1993) beschrieben wurde und von Suckfüll (Suckfüll, Pieske et al. 1994) weiter modifiziert wurde.

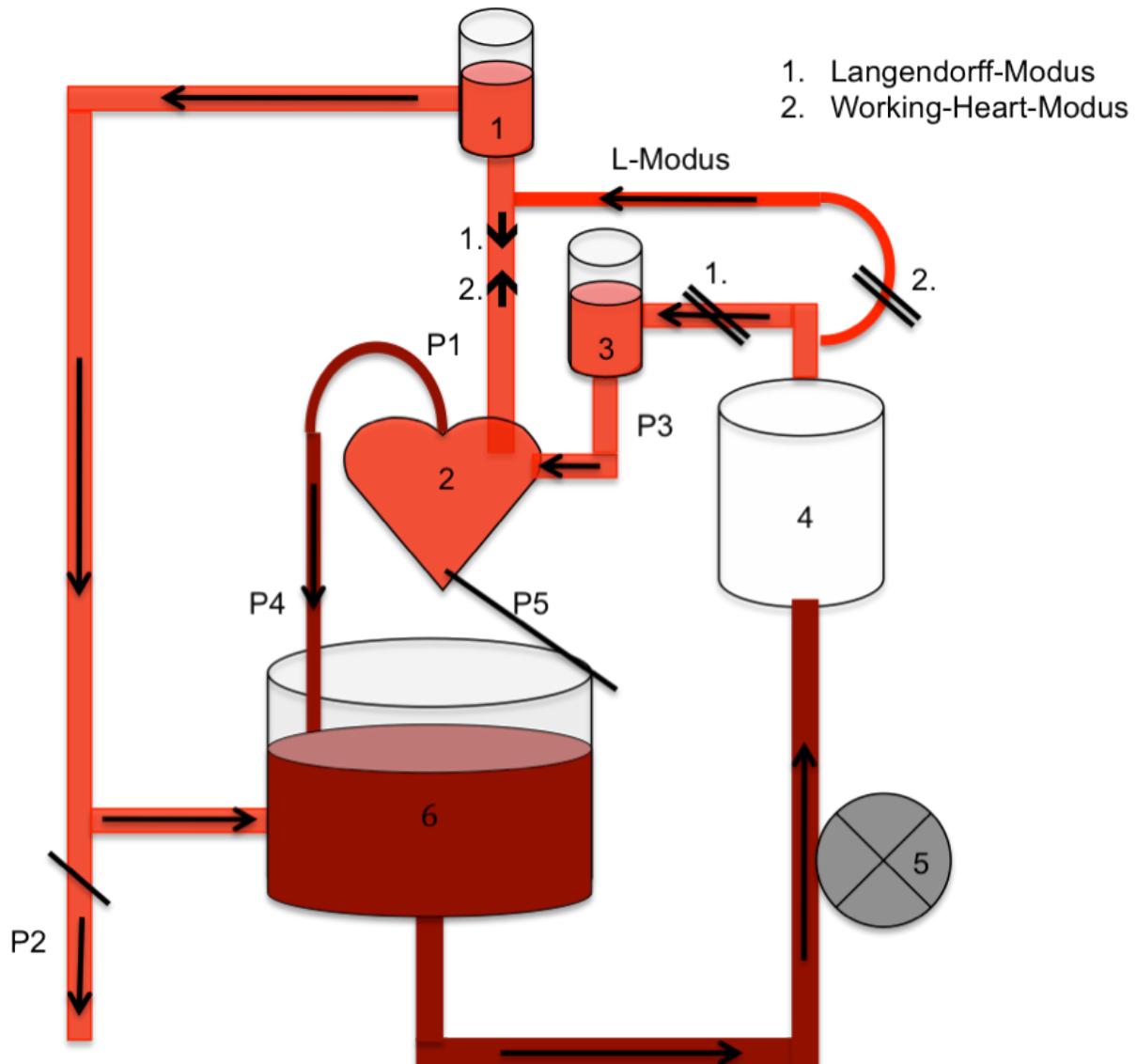


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Working-Heart Perfusionsmodells mit Blutflußrichtungen

- 1 Nachlastsäule (55 mmHg)
- 2 Herz
- 3 Vorlastsäule (11 mmHg)
- 4 Beheizter Oxygenator
- 5 Rollerpumpe
- 6 Blutreservoir mit temperaturregulierendem Wasserbad

- P1 Blutentnahme (arteriell) / Kanüle in Aorta
- P2 Messung des Overflows (mit Abklemmung) = ABF
- P3 Druckmessung von LAP = Vorlast / Kanüle in linken Vorhofohr (LAA)
- P4 Messung des koronaren Blutflusses = CBF, Blutentnahme (venös) / Kanüle in Pulmonalarterie
- P5 Messung von pAorta, HR, dP/dt max über PiCCO-Katheter, eingesetzt in linkem Ventrikel

L-Modus Blutverlauf während des Langendorff-Modus

\ Klemmensetzungsstellen für Wechsel von L-Modus zu Working-Heart-Modus

\ Kontrollierter Auslass zur Messung des Overflows



Abbildung 4: Working-Heart Perfusionssmodell

Das gesamte Perfusionssystem bestand aus einem vorgefertigten Schlauchsystem (Dideco Perfusion Tubing Systems, SORIN Group, Mirandola, Italien). Die Halterung war eine Plexiglasscheibe mit mehreren, speziell für unseren Versuch, platzierten Fassungen und einer verstellbaren Metallstange. Ein Wasserbad (Haake E423, Gebrüder Haake, D-Berlin) lieferte über einen Verbindungsschlauch warmes Wasser für das Hauptreservoir und den Oxygenator (Dideco D101 KIDS infant oxygenator, SORIN Group, Mirandola, Italien). Das Hauptreservoir war doppelwandig konstruiert, sodass das Blut im Reservoir permanent von außen angewärmt wurde. Der Oxygenator enthielt ein integriertes Wärmeaustauschsystem. Das gesamte Dideco System hatte eine spezielle Beschichtung die die Blutkompatibilität der Vorrichtung verbessert und die Plättchenadhäsion auf den beschichteten Flächen verringert. Die Einhaltung der Zieltemperatur des Perfusates von 37°C wurde über eine Temperatursonde im Hauptreservoir überwacht.

Das Blutreservoir war durch einen Schlauch mit dem Oxygenator verbunden. Das Blut wurde durch eine Rollerpumpe (MCP ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) in die der Verbindungsschlauch eingespannt war gepumpt. Die Rollergeschwindigkeit

28 Material und Methoden

war regulierbar und konnte je nach Pumpleistung angepasst werden. Der Oxygenator war mit einer Gasuhr verbunden die wiederum mit einer Sauerstoff-, Kohlenstoffdioxid- und Luftzufuhr verbunden war. Der Sauerstoff und die Luft stammten aus der zentralen Gasversorgung des Operationssaales. Die Kohlenstoffdioxidversorgung erfolgte über eine Gasflasche. Die Zufuhr der Gase konnte über die Gasuhr reguliert werden. Die Grundeinstellung für Sauerstoff war 0,2 l/min, für Kohlenstoffdioxid 0,01 l/min. Das Blut wurde aktiv durch den Oxygenator in einen Verbindungsschlauch zum Vorlastreservoir gepumpt, um dann passiv über den am Herzen platzierten Konnektor in den linken Vorhof zu fließen. Vom linken Vorhof aus wurde das Blut über den linken Ventrikel und den Konnektor der Aorta ascendens in den Nachlastschlauch gepumpt der an der verstellbaren Metallstange befestigt war. Auf diese Weise konnte durch Veränderung der Höhe der Nachlastdruck angepasst werden. An einem Konnektorstück am herznahen Teil des Schlauches wurde eine aufgezogene, leere Perfusorspritze platziert die die Windkesselfunktion der Aorta simulierte. Das Blut wurde aus dem Herzen in ein Blutreservoir ausgeworfen um von dort aus erneut den beschriebenen Kreislauf zu durchlaufen. Das über die Koronararterien und Koronarvenen/-sinus in den rechten Vorhof gepumpte Blut wurde über einen Schlauch an der kanülierten A. pulmonalis direkt in das Hauptreservoir zurückgeleitet. Zur kontinuierlichen Substitution von Glucose und Insulin wurde ein Perfusorgerät an das Blutreservoir konnektiert. Die Perfusorspritze enthielt ein Gemisch von 40 ml Glucose 20% (B.Braun, D-Melsungen) und 40 I.E. Insulin (Insulin Rapid 40 I.E./ml, B.Braun, D-Melsungen). Die Substitution lief mit einer Geschwindigkeit von 0,5 – 2 I.E./h. Die langsame und kontinuierliche Gabe über einen Perfusor erlaubte damit eine kontrollierte Substitution unter stetiger Überwachung mittels Blutgasanalysen.

2.2 Blutspender

Als Perfusat diente frisch entnommenes, humanes Vollblut von freiwilligen Spendern. Die Kriterien für eine Spende waren männliches Geschlecht, Alter zwischen 20 und 30 Jahren, keine aktuelle oder kürzlich erfolgte Infektion oder Medikamenteneinnahme, keine chronischen Erkrankungen und keine Allergien. Dadurch sollten ausgeprägte interindividuelle Unterschiede der Serumspiegel präformierter anti-Gal- α 1,3-Gal-Antikörper, bedingt durch Geschlecht oder fortgeschrittenes Alter, möglichst ausgeschlossen werden (Xu, Edwards et al. 1995;

29 Material und Methoden

Buonomano, Tinguely et al. 1999). Für das Projekt *ex-vivo-Perfusion von transgenen Schweineherzen mit Humanblut* wurde die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit der Blutentnahme zu Forschungszwecken durch die Ethikkommission der LMU zuerkannt.

Das benötigte Gesamtvolumen von 500 ml wurde mit 10 Perfusorspritzen à 50 ml (BD Plastipak™, Drogheda, Ireland) entnommen, die im Vorfeld jeweils mit 100 I.E. Heparin vorbefüllt waren (Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm®, Durchstechflasche, Ratiopharm, D-Ulm). Das entnommene heparinisierte Vollblut wurde bis zur Verwendung bei 37°C gelagert.

2.3 Versuchstiere

Es wurden zwei Gruppen gebildet: Landrasseschweineherzen mit Zugabe von Defibrotide (n=6) und Landrasseschweineherzen ohne Zugabe von Defibrotide (n=6). Anträge zur Durchführung der Versuchsvorhaben wurden der Regierung von Oberbayern vorgelegt und genehmigt. Die entsprechende Tierversuchsantragsnummer lautet: Az 55.2-1-54-2531.3-20-08. Die Landrasseschweine stammten aus einer landwirtschaftlichen Zucht des Lehr- und Versuchsgutes der Ludwig-Maximilians- Universität München in Oberschleißheim.

Wir verwendeten Schweine mit einem Gewicht zwischen 15 bis 18,5 kg (Herzgewicht zwischen 77 und 114 g) in der behandelten Gruppe und 14,5 bis 26 kg (Herzgewicht zwischen 78 und 135 g) in der Kontrollgruppe. Nach Ankunft der Spendertiere aus der Zuchstanstalt, wurden diese bis zum Tag der Organentnahme in den Stallungen des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU München (Walter-Brendel-Zentrum, D-München) versorgt. Die Haltung und Pflege der Versuchstiere erfolgten in Übereinstimmung mit den '*Principles of Laboratory Animal Care*' und dem '*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*' des '*Institute of Laboratory Animal Resources*' (NIH, National Institutes of Health, Publikation Nr. 23-86, 1985) und dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998, BGB II S.1105). Die Versuchstiere wurden regelmäßig veterinärmedizinisch versorgt und täglich durch geschultes tierpflegerisches Personal betreut.

2.4 Defibrotide in der Anwendung

Es wurden 3 ml Defibrotide (Defibrotide VOD, Gentium SpA, I- Villa Guardia; in Kooperation: Prof. Eißner, IZB, D-München) bei den Versuchen der Defibrotidegruppe jeweils in die Kardioplegie und direkt in das Perfusat gegeben, so wurde die erschlossene Wirkkonzentration von 25 µmol/l Humanblut gewährleistet. Die Kontrollgruppe erhielt kein Defibrotide.

2.5 Operationsverfahren

2.5.1 Anästhesie und Monitoring

Das Versuchstier wurde zunächst im Stall durch eine intramuskuläre Injektion in den Nacken mit einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid 10 mg/kg KG (Ketavet®, Pfizer, Pharmacia GmbH, D-Karlsruhe) und Azaperon 10 mg/kg KG (Stresnil®, Janssen-Cilag, D-Neuss) sediert.

Nach Wirkungseintritt der Prämedikation wurde das Ferkel unter Sauerstoffgabe in den Operationssaal gefahren. Zusätzlich wurde ein venöser Dauerkatheter (Introcan Safety® 22G, B.Braun Melsungen AG, D-Melsungen) über eine oberflächliche Vene am Ohr gelegt. Über diesen Zugang erfolgte die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose im Verlauf. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Fentanyl 0,2 - 0,3 mg i.v. (Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, D-Neuss), Propofol 20 - 40 mg i.v. (Disoprivan® 2%, MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, D-Bad Homburg), Atropinsulfat 0,5 mg i.v. (Atropinsulfat B.Braun, B.Braun Melsungen AG, D-Melsungen) zur Verhinderung der Hypersalivation und Vagusreizung bei Intubation und Pancuroniumbromid 0,1 mg/kg KG i.v. (Pancuronium Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH, D-Freiburg) zur Muskelrelaxation. Anschließend wurde das Ferkel endotracheal intubiert (Tracheal Tube 4,5 mm; Safety-Flex™, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland). Die Narkose wurde durch kontinuierliche Infusion von Propofol 40 - 80 mg/h i.v. (Disoprivan® 2%, MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, D-Bad Homburg) über ein Perfusionsgerät, sowie intermittierende Boli Fentanyl aufrecht erhalten. Die Beatmung erfolgte mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (Dräger Servo Ventilator 900B: Drägerwerk AG, D-Lübeck). Bei einer Beatmungsfrequenz von 20/min und einem Atemminutenvolumen von ca. 12 ml/kg KG/ min, mit jeweiliger Anpassung an den aktuellen CO₂-Wert, betrug der Beatmungsspitzendruck 20 mbar. Zur Volumensubstitution wurde eine Natrium-Chlorid Infusion (NaCl® B.Braun,

31 Material und Methoden

B.Braun Melsungen AG, D-Melsungen) verwendet. Die arterielle Sauerstoffsättigung wurde mithilfe eines Pulsoxymeters (Oxi-Pulse®, PSD, USA) am Ohr und Blutgasanalysen (Gas Analyser 348, Chiron Diagnostics, D-Fernwald) überwacht.

2.5.2 Explantation

In der Vorbereitung wurde das Operationsgebiet desinfiziert und steril abgedeckt. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Thorax durch eine mediane Sternotomie und Einsetzen eines Thoraxsperrers. Zur besseren Übersicht wurde der Thymus des Tieres entfernt, dann erfolgte die Längseröffnung des Perikards. Am Herzen wurden die Aorta ascendens und beide Vv. cavae angeschlungen. Nach erfolgter Vollheparinisierung mit 500 I.E./kg KG Heparin (Heparin-Natrium 25000-ratiopharm®, Ratiopharm GmbH, D-Ulm) wurde eine 5 French große Aortenwurzelkanüle (DLP® Aortic Root Cannula, Medtronic Inc., Minneapolis, USA) eingebracht. Es erfolgte die Ligatur der Vena cava superior und inferior (Ethibond Excel 2-0, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien). Zur antegraden Befüllung der Koronarien mit Kardioplegieflösung wurde die Aorta quergeklemmt, bis zur kompletten Füllung dieser. Der Herzstillstand wurde durch Infusion von 40 ml/kg KG, 4°C kalter Bretschneider-Kardioplegieflösung (Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) und topischer Kühlung mit 4°C kalter Ringer-Spüllösung (Ringer Fresenius, Fresenius Kabi AG, D-Bad Homburg) herbeigeführt. Zur linksventrikulären Entlastung bei Einströmen des Kardioplegie-Defibrotide Gemisch (keine Defibrotidegabe in der Kontrollgruppe) wurden die Lungenvenen eröffnet. Herz und Lungen wurden nach Durchtrennung der Vv. cavae, Aorta und Trachea "en-bloc" explantiert. Die Lungen wurde ex-vivo nach Ligatur und Durchtrennung der Aa. und Vv. pulmonales vom Herzen abgesetzt.

Um das Herz an das Perfusionssystem anschließen zu können wurden speziell gefertigte Gefäßkanülen (Institut für Cirurgische Forschung/ Walter-Brendel-Zentrum, D-München) in die Aorta ascendens, Arteria Pulmonalis und in den linken Vorhof über das Herzohr eingesetzt. Außerdem wurde ein PiCCO Katheter (PULSION Medical System AG, D-München) über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt für hämodynamisches Monitoring und Druckmessungen. Nach Erfassung des Herzgewichts (Mettler Feinwaage PL1200, Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz) und Entnahme einer Myokardbiopsie aus dem linken Ventrikel wurde zur

Verlängerung der Ischämietoleranz das Spenderherz bis zur Implantation kontinuierlich mit Ringer-Spüllösung gekühlt.

2.5.3 Anschluss des Schweineherzens an das Perfusionssystem

Das vorbereitete Spenderherz wurde, um nahezu physiologische Bedingungen zu schaffen, mit der Gefäßkanüle am Atrium sinister an einen Schlauch, der mit der Vorlastsäule verbunden ist, angeschlossen. Auf gleiche Weise wurden die Kanüle der Aorta ascendens mit der Nachlastsäule und die Kanüle der Arteria pulmonalis mit einem Ablaufschlauch ins Reservoir verbunden.

2.6 Perfusion

Zunächst wurde das Perfusionssystem mit einer Vollelektrolytlösung (Tutofusin, Baxter Deutschland GmbH, D-Unterschleißheim) befüllt, bis es komplett luftleer war. Bei Versuchsbeginn wurde das Vollblut über das Reservoir (siehe Abb.1) in das Perfusionssystem appliziert. Beim Einfüllen des Blutes vermischte es sich mit der im System befindlichen Vollelektrolytlösung, sodass es auf einen Hämatokrit von 30% dilutiert wurde, welcher dem für Schweine physiologischen Wert entspricht.

In der Defibrotidegruppe erfolgte zu diesem Zeitpunkt die zweite Gabe von Defibrotide direkt in das Perfusat (keine Defibrotidegabe in der Kontrollgruppe).

Anschließend wurden die Elektrolyte und Blutgase (Gas Analyser 348, Chiron Diagnostics, D-Fernwald) überprüft und eventuelle Abweichungen von den Normwerten ausgeglichen. Nach erneuter Blutgasanalyse wurde das Herz mit dem Perfusionssystem konnektiert.

Die Reperfusion des Schweineherzen erfolgte anfangs retrograd im sogenannten Langendorff-Modus. Dabei wurde die Verbindung von Oxygenator zur Vorlast mit einer Schlauchklemme unterbunden. Das Blut aus dem Oxygenator wurde somit unter Umgehung der Vorlastsäule gegen die Schwerkraft direkt in die Nachlastsäule gepumpt. Die Reperfusion der Koronargefäße erfolgte somit retrograd über den Blutfluss in der Nachlastsäule. Dadurch wurde vorerst die Koronarperfusion und damit die Reperfusion des Herzens sichergestellt. Nach 15 Minuten wurde der Blutfluss umgekehrt, indem die Schlauchklemme umgesetzt wurde auf die Verbindung zwischen Oxygenator und Nachlast. Somit kam es zu einer antegraden Perfusion des Schweineherzens im sogenannten Working-Heart-Modus. Dabei musste der linke Ventrikel Blut gegen eine Nachlast von 55 mmHg pumpen. Der linke

33 Material und Methoden

Vorhof wurde mit einer Vorlast von 11 mmHg gefüllt. Anschließend durchlief das Blut den vorab beschriebenen Kreislauf (siehe 2.5.1. Aufbau). Beim Übergang in den Working-Heart-Modus kam es meist zu einem Kammerflimmern während der Reperfusion. Um einen Sinusrhythmus herzustellen wurde ein Defibrillator (Theracard 361D, Siemens, Deutschland) mit internen Defibrillatorpaddels (internal paddles for children, Lohmeier Medizin Elektronik GmbH & Co., München, Deutschland) verwendet.

Der Versuch wurde nach einer Reperfusionsdauer von 180 min beendet. Somit war eine Zeitspanne gegeben, die als ausreichend gewertet wurde, um mögliche relevante Wirkungseffekte beobachten zu können. Ansonsten galt der Zeitpunkt, an dem das Herz die Nachlast von 55 mmHg nicht mehr bewältigen konnte und somit ein Organversagen anzunehmen war, als Versuchsende.

Bei Versuchsende erfolgte die erneute Entnahme einer Myokardbiopsie aus dem linken Ventrikel.

2.7 Versuchsprotokoll

Messzeitpunkte	APA & α -Gal	FACS	PGE ₂ & 6-keto-PGF _{1α}	KlCh	CC	BGA
Z0 (Blutabnahme Spender)					X	X
Z1 0' Perfusion (aus Perfusionssystem)	X	X	X	X	X	X
Z2 15' Perfusion (10' Langendorff)		X	X	X	X	X
Z3 30' Perfusion (15' Working Heart)		X	X	X	X	X
Z4 60' Perfusion (45' Working Heart)		X	X	X	X	X
Z5 90' Perfusion (75' Working Heart)		X	X	X	X	X
Z6 120' Perfusion (105' Working Heart)		X	X	X	X	X
Z7 150' Perfusion (135' Working Heart)		X	X	X	X	X
Z8 180' Perfusion (165' Working Heart)	X	X	X	X	X	X

Tabelle 2: Versuchsprotokoll (APA = Anti-Pig-Antikörper; α -Gal = Anti-Gal- α 1,3-Gal-Antiörper; FACS = Fluorescence-activated cell sorting = Durchflußzytometrie; PGE₂ & 6-keto-PGF_{1 α} = Prostaglandine; KlCh = klinische Chemie; CC = Coulter Counter = Zellzahlbestimmung; BGA = Blutgasanalyse)

Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, wurde zu acht verschiedenen Zeitpunkten Blut aus dem System entnommen. Die BGA diente vor allem der Kontrolle und Anpassung

der Gase und Elektrolyte. Zum Zeitpunkt Z0 wurde anfänglich das Spenderblut auf Thrombozytenanzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Blutgase hin untersucht um Vergleichswerte für spätere Messungen zu erhalten. Alle Blutproben wurden gleich nach Entnahme bei 4000 U/min für 10 min zentrifugiert. Das abpipettierte Plasma wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –72°C gelagert.

2.8 Messparameter

Um die Wirkungsweise von Defibrotide und die Schäden am Myokard zu untersuchen wurden häodynamische, immunologische und gerinnungswirksame Parameter gemessen und anschließend das Herz histopathologisch untersucht.

Die Ergebnisse der Messungen wurden in Prozenten des Ausgangswertes angegeben, wobei die erste Messung zu Beginn der Perfusion als Ausgangswert galt.

2.8.1 Häodynamik

Ab der Reperfusion im Working-Heart Modus bis zum Versuchsende erfolgten häodynamische Messungen. Dadurch konnte die Pumpleistung des Herzen beurteilt werden. Die Anpassung erfolgte je nach Herzleistung durch Erhöhung der Umdrehungszahl der Rollerpumpe bzw. durch Erhöhung der Nachlastsäule.

- Der aortale Blutfluss (ABF) [ml/min], der koronare Blutfluss (CBF) [ml/min] sowie das gesamte Herzzeitvolumen als Summe der beiden (HZV = ABF + CBF) [ml/min] konnten intermittierend durch volumetrische Messungen über die Pulmonalarterie und die Nachlastsäule (Abb.3, P2 & P4) direkt am Modell bestimmt werden. Es gilt als Maß für die Auswurfleistung des Herzen.
- Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt max) [mmHg/sec] als Index der myokardialen Kontraktilität, der mittlere arterielle Druck (MAP) [mmHg] und die Herzfrequenz (HR) [min^{-1}] wurden über ein PiCCO Katheter System (PULSION Medical System AG, D-München) gemessen (Abb.3, P5).
- Die Messung des linksatrialen Druckes (LAP = Vorlast) [mmHg] (Abb.3, P3) erfolgte über einen Druckabnehmer (Single Transducer Set, Becton Dickinson, Singapur) der kurz vor der Kanüle des linken Vorhofs angeschlossen wurde.

35 Material und Methoden

- Die Berechnung des Schlag-Arbeits-Index (SWI) als Maß der vom Herzen verrichteten Arbeit erfolgte nach der Formel: $SWI = (MAP-LAP) \cdot HZV \cdot 1333 / HR \cdot Herzgewicht$ [erg/g].
- Das Schlagvolumen wurde wie folgt berechnet: $SV = HZV / HR$ [ml/beat]. Zusätzlich wurde der Schlagvolumenindex angegeben: $SVI = SV / Herzgewicht$ [ml/g].
- Die Berechnung des Koronarwiderstandes (CR) erfolgte anhand der Formel: $CR = MAP / CBF$ [mmHg * min/ml].
- Die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz $C(a-v)O_2$ im Perfusat gilt als Maß für die Ausschöpfung des Sauerstoffangebots durch das Myokard und als Anhaltspunkt zur Differenzierung der Stoffwechselleage (aerob vs. anaerob).
- Die Berechnung des koronaren Blutflussindex (CBFI) erfolgte anhand der Formel: $CBFI = CBF / Herzgewicht$ [ml/g]

2.8.2 Blutgase

Zur Kontrolle von pH-Wert, Bicarbonatkonzentration, Basenexzess, Lactatanstieg, Glucoseverbrauch bzw. – bedarf und den Elektrolyten Natrium, Kalium und Calcium wurde ein Blutgasmessgerät (Gas Analyser 348, Chiron Diagnostics, D-Fernwald) verwendet. Zudem wurde mit dem Gerät der Hämoglobingehalt, der Sauerstoff- (PO_2) und der Kohlenstoffdioxidpartialdruck (PCO_2) im arteriellen sowie im venösen Blut gemessen.

Die durch Muskelarbeit bedingten Änderungen der Stoffwechselleage in einem isolierten System konnten somit kontrolliert werden und durch Veränderung der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidzufuhr wieder normalisiert werden. Bei zusätzlichem Mangel an Bicarbonat, zur Abpufferung der anfallenden Protonen, wurde Natriumbicarbonat (NaBic 8,4% B.Braun, Melsungen AG, D-Melsungen) hinzugefügt. Bei Mangel an Glucose, durch einen Mehrverbrauch der Zellen, wurde ein Extrabolus von 2 ml (Glucose 20%, B.Braun, D-Melsungen) hinzugegeben. Eine Hypokalzämie, die eine Bradykardie und Herzinsuffizienz verursachen kann, wurde durch Gabe von Calciumgluconat ausgeglichen (Calciumgluconat 10% MPC Injektionslösung, B.Braun, D-Melsungen). Eine Hypokaliämie, die Herzrhythmusstörungen mit Extrasystolen bis hin zum Kammerflimmern verursachen kann, wurde durch eine Kaliumsubstitution ausgeglichen (1M-Kaliumchlorid-Lösung, Baxter GmbH, D-Unterschleißheim). Eine Hyperkaliämie, die

36 Material und Methoden

Herzrhythmusstörungen und Bradykardien verursachen und auch zum Herzstillstand führen kann, wurde behoben durch vermehrte Gabe von Glucose und Insulin, wodurch Kalium in den Intrazellulärraum transportiert wird.

2.8.4 Herzenzyme

Als Parameter für die Myokardschädigung wurden die Konzentrationen des Isoenzyms der Kreatinkinase (CK-MB) und der Lactatdehydrogenase (LDH), untersucht, da sie als intrazelluläre Enzyme bei Untergang von Muskelzellen freigesetzt werden.

Die Messungen wurden am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München nach Standardverfahren durchgeführt.

2.8.3 Gerinnungsparameter

Die Konzentrationen von Fibrinogen und des Gerinnungsinhibitors Antithrombin III, als Maß für bereits stattgefundene Gerinnungs- und Fibrinolysevorgänge, wurden nach Standardverfahren am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München bestimmt.

2.8.5 Zelloberflächenmarker

Die Durchflußzytometrie erlaubt die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel, wobei sie hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet einzeln untersucht werden. Diese Methode (FACScan, Becton Dickinson GmbH, D-Heidelberg) erlaubt die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen, die Ermittlung der relativen Zellgröße, der Anzahl und der Granularität. Die Zelltypisierung geschieht anhand einer Markierung an den Zellen mit bestimmten monoklonalen Antikörpern gegen die exprimierten Oberflächenmarker der Zellen und durch Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Somit ist eine zelluläre Immunstatusbestimmung möglich. Bestimmt wurden die Oberflächenmarker CD11b, CD62L und CD41. CD11b wird bei der Entzündungsreaktion vermehrt auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert während Vorgängen wie Adhäsion, Bildung des MAC, Chemotaxis und Apoptose. Die CD11b Produktion wird hoch reguliert durch Kontakt mit pro-inflamatorischen Substanzen wie TNF α , IL-8, Leukotrien B4 und PAF (platelet activating factor). Das während einer Entzündungsreaktion beobachtete „Rolling and Homing“ von naiven Lymphozyten und Leukozyten wird

37 Material und Methoden

anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD62I charakterisiert. CD62I wird aber nur anfänglich während der Entzündung exprimiert und nimmt im Verlauf stetig ab. CD41 (GPIIb) ist der Fibrinogen Rezeptor auf Thrombozyten. Bei vermehrter Aktivierung wird ein Komplex mit CD61 (GPIIIa) zur Thrombozytenaggregation gebildet. Mit der FACS Analyse werden die thrombozytären Populationen die im Verlauf von Pathologien im Zusammenhang mit Thrombozytenaggregation und zellulärer Adhäsion das Molekül CD41 exprimieren charakterisiert und gezählt.

Die Messungen wurden in den Laboren des Instituts für Chirurgische Forschung (Walter-Brendel-Zentrum, D-München) nach Standardverfahren durchgeführt.

2.8.6 Zellzahlbestimmung

Ermittelt wurde die Konzentration von Leukozyten (WBC) [$\times 10^3/\mu\text{l}$] über Zellzählung mit einem Coulter Counter (Coulter AcT, Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland). Ursachen einer Leukopenie wären hierbei autoimmunologische Vorgänge vor allem an den Endothelien. Eine Leukozytose wäre Ausdruck einer bakteriellen Infektion oder einer chronischen Entzündung.

Der Hämatokrit als Maß für die Zähigkeit des Blutes und die Thrombozytenzahl [$\times 10^3/\mu\text{l}$] konnten ebenfalls mittels Coulter Counter ermittelt werden.

2.8.7 Komplementsystem

C3 und C4 sind Akute-Phase-Proteine und Marker für die Aktivierung der Komplementkaskade.

Verminderte Werte von C3 und C4 würden für einen Komplementverbrauch bei Entzündungsvorgängen oder Abstoßungsreaktionen sprechen, bei denen eine hohen Anzahl an Antigen-Antikörperkomplexen anfällt.

Die Messung der Komplementfaktoren C3 und C4 wurde am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität (Klinikum Großhadern, D-München) nach Standardverfahren durchgeführt.

2.8.8 PGE₂/ 6-keto-PGF_{1α}

Dieser Test (Cayman's PGE₂ bzw. 6-keto-PGF_{1α} EIA Kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) diente der Quantifizierung der Mengen von PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} [pg/ml] in den abgenommenen Serumproben. Der verwendete ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) beruht auf dem Prinzip der

38 Material und Methoden

Konkurrenz zwischen PGE₂ bzw. 6-keto-PGF_{1 α} und deren Acetylcholinesterase (AChE) Konjugaten um eine limitierte Anzahl an PGE₂- bzw. 6-keto-PGF_{1 α} -spezifischen Kaninchen-Antiserum Bindungsstellen. Der so entstehende PGE₂- bzw. 6-keto-PGF_{1 α} - Kaninchen-Antiserum Komplex bindet an einen von Mäusen stammenden Monoklonalen Anti-Kaninchen IgG Antikörper der zuvor auf die Detektorplatte (96-Well Platte) aufgetragen wurde. Zuletzt wurde ein Reagenz (Ellman's Reagent) zur Entwicklung der Well Platte hinzugegeben. Das Produkt dieser enzymatischen Reaktion bewirkte eine Gelbfärbung der Wells. Diese gelbe Farbe absorbiert Licht einer Wellenlänge von 412 nm. Somit konnte photometrisch (ELISA-Reader) die Menge von PGE₂ bzw. 6-keto-PGF_{1 α} [pg/ml] bestimmt werden, die proportional zu der Intensität der Gelbfärbung in den einzelnen Wells ist.

ELISA Protokoll:

1. Zunächst wurden alle für den Test benötigten Substanzen hergestellt:
 - Eine ELISA Kit Pufferlösung aus 90 ml gereinigtem Wasser und einem ELISA Puffer Konzentrat.
 - Ein Waschpuffer aus 1,25 ml Waschpuffer Konzentrat, 500 ml gereinigtem Wasser und 0,25 ml Polysorbat-20 (Tween 20, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
 - Ein PGE₂ bzw. 6-keto-PGF_{1 α} AChE Tracer gemischt mit 30 ml Pufferlösung.
 - Ein PGE₂ bzw. 6-keto-PGF_{1 α} Antikörper gemischt mit 30 ml Pufferlösung.
2. Anschließend wurde der PGE₂-Standard hergestellt, in einer Verdünnungsreihe verteilt auf 8 Reagenzgläser. Eine Standardlösung wurde mit 1 ml Pufferlösung gemischt, sodass eine Konzentration von 10 ng/ml erzielt wurde. Davon wurden 200 μ l zusammen mit 800 μ l Pufferlösung im ersten Reagenzglas vermischt. Dabei ergab sich eine Konzentration von 2000 pg/ml. Danach wurde die Verdünnungsreihe fortgeführt, indem jeweils 500 μ l aus dem vorangegangenen Reagenzglas mit 500 μ l Pufferlösung in einem neuen Reagenzglas vermischt wurden. Im achten Reagenzglas wurde eine Verdünnung von 15,6 pg/ml erreicht.

39 Material und Methoden

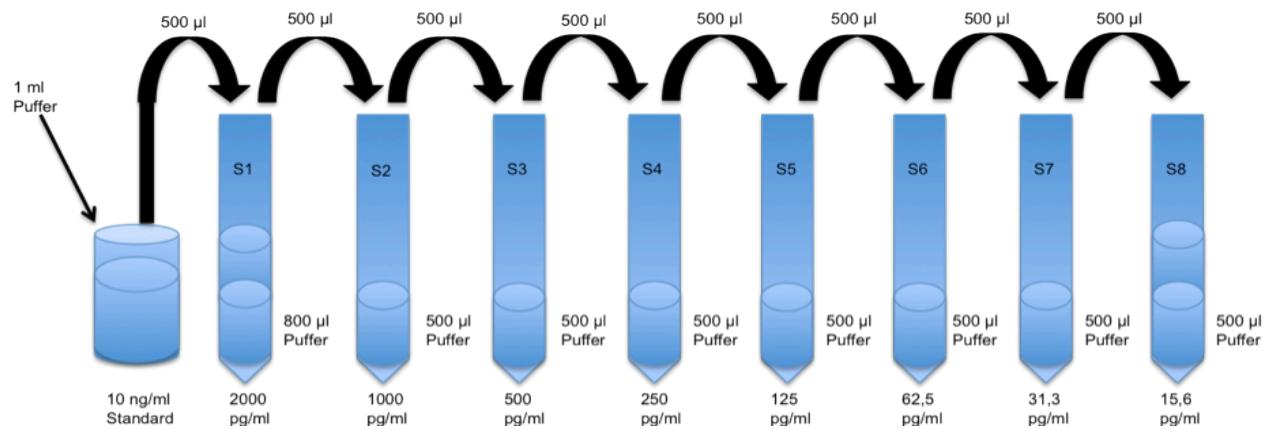


Abbildung 5: PGE₂ Verdünnungsreihe

3. Zeitgleich wurde der 6-keto-PGF_{1 α} -Standard hergestellt, in einer Verdünnungsreihe verteilt auf 8 Reagenzgläser. Eine Standardlösung wurde mit 900 µl gereinigtem Wasser gemischt, sodass eine Konzentration von 10 ng/ml erzielt wurde. Davon wurden 100 µl zusammen mit 900 µl Pufferlösung im ersten Reagenzglas vermischt. Dabei ergab sich eine Konzentration von 1000 pg/ml. Danach wurde die Verdünnungsreihe fortgeführt, indem jeweils 400 µl aus dem vorangegangenen Reagenzglas mit 600 µl Pufferlösung in einem neuen Reagenzglas vermischt wurden. Im achten Reagenzglas wurde eine Verdünnung von 1,6 pg/ml erreicht.

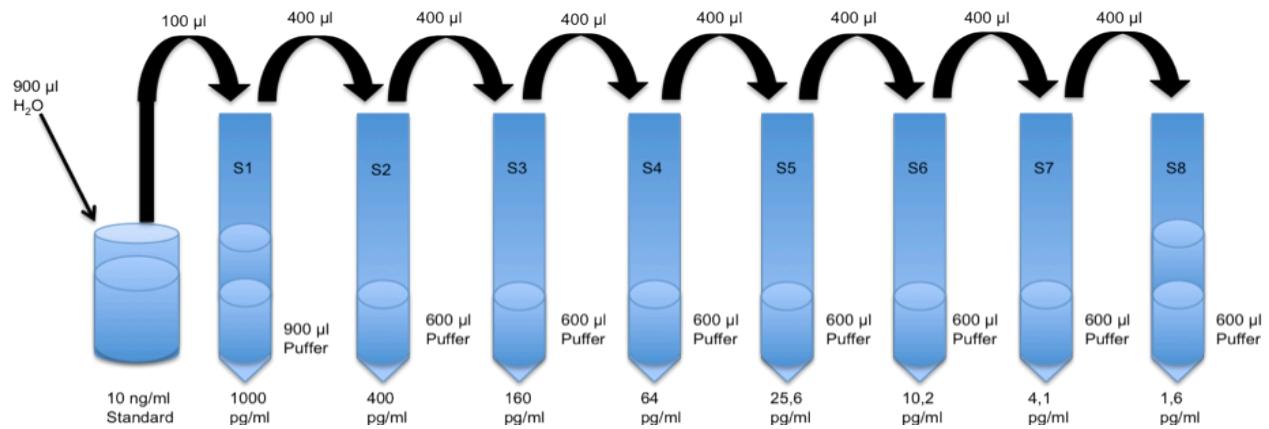


Abbildung 6: 6-keto-PGF_{1 α} Verdünnungsreihe

40 Material und Methoden

4. Im nächsten Schritt wurden die Wells wie abgebildet befüllt:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Abbildung 7: Well Aufteilung

Blk – Blank: Diese Wells blieben leer als Kontrollfelder.

TA – Total Activity: Hier wurde nach Inkubation 5 µl Tracer hinzugegeben.

NSB – Non-Specific Binding: Es wurden jeweils 100 µl Pufferlösung zusammen mit 50 µl Tracer in die Wells gegeben.

B0 – Maximum Binding: In diese Wells wurde 50 µl Pufferlösung zusammen mit 50 µl Tracer und 50 µl Antikörper gegeben.

S1-S8 – Standards 1-8: Aus den jeweiligen Reagenzgläsern der vorbereiteten Standard Verdünnungsreihe wurden je zwei Wells mit 50 µl befüllt. Zudem wurde in jedes Well 50 µl des Antikörpers und 50 µl des Tracers gegeben.

1-24 – Samples: Pro Probe und Zeitpunkt wurden drei Wells mit 50 µl Serum befüllt, zusätzlich wurde in das erste Well 50 µl Pufferlösung für eine Verdünnung von 1 zu 10, in das zweite Well 25 µl für eine Verdünnung von 1 zu 20 und in das dritte Well 10 µl für eine Verdünnung von 1 zu 50 gegeben. Außerdem wurde in jedes Well 50 µl des Antikörpers und 50 µl des Tracers gegeben.

5. Nach der Befüllung wurde die 6-keto-PGF_{1α} Well Platte bei 4°C für 18 h inkubiert und die PGE₂ Well Platte bei Raumtemperatur auf einem Orbital Shaker 60 min lang inkubiert.
6. Das Entwicklungsreagenz war eine Mischung aus Ellman's Reagent mit 20 ml gereinigtem Wasser.
7. Nach der Inkubation wurden die Platten in 5 Durchgängen mit Waschpuffer gewaschen und jedes Well mit 200 µl Ellman's Reagent befüllt.
8. Die Well Platten mussten anschließend 90 min lang im Dunkeln auf einem Orbital Shaker inkubieren.

41 Material und Methoden

9. Nach Inkubation konnten die Well Platten bei einer Wellenlänge von 412 nm mit dem ELISA-Reader gelesen werden. Durch einen mit dem Photometer verbundenen Computer konnten die Ergebnisse tabellarisch dargestellt werden.

2.8.9 Anti-Pig-Antikörper

Die hämolytischen Anti-Schweine-Erythrozyten-Antikörper wurden zur Erfassung der immunologischen Vorbelastung mit Antikörpern beider Gruppen gemessen.

Der APA-ELISA wurde im Institut für Chirurgische Forschung der Universität München speziell für das Xenotransplantationsprojekt entwickelt.

Das Prinzip beruht auf der Messung der Antikörper im humanen Serum, die in Anwesenheit von Komplement (Baby Rabbit Komplement, Serotec, Kidlington, UK), Erythrozyten von Schweinen (pRBC) lysieren.

Als konstante Positivkontrolle wurde Humanserum aus einem Pool (Blutbank, Klinikum Großhadern, D-München) verwendet.

ELISA Protokoll:

1. Proben- (aus dem Perfusionssystem) und Kontroll-Humanserum wurden zunächst bei 56°C für 30 min hitzedeaktiviert.
2. Dann wurden die Seren bei 17000 U/min für 5 min zentrifugiert (Hettich Universal 30RF, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland), um kleinste Partikel zu entfernen.
3. Anschließend konnte der CFD-Puffer/Komplementfixationsverdünnung (Complement Fixation Test Dilutent, ICN, Costa Mesa, USA) mit 200 ml destilliertem Wasser und 50 ml CFD angesetzt werden.
4. 3-5 ml Schweineblut (dem Spenderschwein vorab entnommen) wurden in 4 Zyklen mit je 30 ml CFD-Puffer verdünnt und bei 750 U/min 6 min lang zentrifugiert, dabei wurde der Überstand immer abgegossen bis ein Pellet (Rückstand am Boden des Gefäßes) zurückblieb. Zur Herstellung der pRBC Lösung wurden anschließend 100 µl des Pellets mit 9,9 ml CFD-Puffer vermischt.
5. Im Anschluß wurden 400 µl des Probenserums und 400 µl des Kontroll-Humanserums mit jeweils 600 µl CFD-Puffer vermischt und jeweils zwei Wells der ersten Reihe der Well Platte (Nunc Polysorb 96-well, Nunc, DK) mit 100 µl der Mischung befüllt.

42 Material und Methoden

6. Es wurden 50 µl des CFD-Puffers in Reihe 2-10 und in B11 und B12 gegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Proben Serum	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	Positiv Kontrolle	Positiv Kontrolle
B Proben Serum	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	Komplement Kontrolle	Komplement Kontrolle
C Kontroll-Human Serum	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280		
D Kontroll-Human Serum	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280		

Abbildung 8: APA-ELISA Well Platte: Verdünnungsreihe

7. Es folgte die Verdünnungsreihe bei der jeweils 50 µl aus einer Reihe in die nächste weiter gegeben wurden (50 µl aus 1 in 2, 50 µl aus 2 in 3, usw.). Die aus Reihe 10 entnommenen 50 µl wurden verworfen.
8. Anschließend wurden 50 µl pRBC in jedes Well von Reihe 1-10, sowie in B11 und B12 gegeben. Die Wells A11 und A12 blieben leer.
9. Die Well Platte wurde mit einem Deckel verschlossen und auf einem Orbital Shaker bei 37°C 60 min inkubiert.
10. Nach Inkubation wurden die Wells mit 200 µl CFD-Puffer befüllt und bei 500 U/min 10 min zentrifugiert. Wenn sich dabei Pellets bildeten wurde der Überschuß verworfen.
11. Das Baby Rabbit Komplement wurde mit 1 ml destilliertem Wasser und 9 ml CFD-Puffer angesetzt. Anschließend wurden 150 µl davon in alle Wells außer A11 und A12 gegeben.
12. In die Positiv Kontroll Wells A11 und A12 kam 100 µl destilliertes Wasser und 50 µl pRBC.
13. Die Well Platte wurde erneut mit einem Deckel verschlossen und auf einem Orbital Shaker bei 37°C für 60 min inkubiert.
14. Nach Inkubation wurde die Well Platte bei 500 U/min 10 min lang zentrifugiert und 100 µl des Überstandes auf eine Photometerplatte (Nunc Polysorb 96-well, flat bottom, Nunc, DK) übertragen.
15. Die photometrische Auswertung erfolgte mit einem Multiscan Platten-Ablesegerät (Tecan Spectra Rainbow, Madein, Österreich) bei einer Wellenlänge

43 Material und Methoden

von 420nm. Für jede Probe wurde die mittlere Absorption berechnet und in AUC-Einheiten (area under the curve) ausgedrückt. Die gemessene Absorption der humanen Kontrollseren wurde als Standard mit 1000 AUC-Einheiten bewertet.

2.8.10 Anti-Gal- α 1,3-Gal

Die Anti-Gal- α 1,3-Gal IgG und IgM Antikörper wurden zur Bestimmung präformierter natürlicher Antikörper (PNAK) und damit zur Erfassung der immunologischen Vorbelastung mit Antikörpern beider Gruppen gemessen.

ELISA Protokoll:

1. Zwei Well Platten (Nunc Polysorb 96-well, Nunc, DK) wurden über Nacht jeweils mit Gal- α 1,3-Gal (Dextra Labs, Reading, UK) und mit PBS (ICN, Costa Mesa, USA) bei 4 °C inkubiert.
2. Am nächsten Tag wurden die Platten einmal mit einer Waschlösung (250 ml PBS, 2,5 ml Tween 20 und 2250 ml destilliertes Wasser) gewaschen.
3. Dann wurden die Wells mit einer Blocking Solution (10 ml PBS, 0,5 ml Tween 20 und 90 ml destilliertes Wasser) aufgefüllt und 1 h bei Raumtemperatur belassen.
4. Die bei 56 °C für 30 min hitzeinaktivierten Seren wurden nun in einer Verdünnungsreihe von 1/2,5 bis 1/1280 auf die Platten pipettiert und erneut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

	1 IgG	2 IgG	3 IgG	4 IgG	5 IgM	6 IgM	7 IgM	8 IgM
A 1/2,5	Proben Serum	Proben Serum	Kontroll-Human Serum	Kontroll-Human Serum	Proben Serum	Proben Serum	Kontroll-Human Serum	Kontroll-Human Serum
B 1/5	“	“	“	“	“	“	“	“
C 1/10	“	“	“	“	“	“	“	“
D 1/20	“	“	“	“	“	“	“	“
E 1/40	“	“	“	“	“	“	“	“
F 1/80	“	“	“	“	“	“	“	“
G 1/160	“	“	“	“	“	“	“	“
H 1/320	“	“	“	“	“	“	“	“
I 1/640	“	“	“	“	“	“	“	“
J 1/1280	“	“	“	“	“	“	“	“

Abbildung 9: Gal- α 1,3-Gal ELISA Well Platte: Verdünnungsreihe

44 Material und Methoden

5. Danach wurden die Platten gewaschen, mit Anti-human IgG/ IgM (goat anti-human IgG bzw. IgM, Dextra Labs, Reading, UK) in einer Verdünnung von 1/1000 versetzt und erneut bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert.
6. Nach 7 Waschvorgängen wurde das Substrat Phenylendiamindihydrochlorid (Sigma-Fast-Phenyldiamin-Kit, Sigma, St. Louis, USA) hinzugefügt. Die entstehende Farbreaktion wurde nach 5 min mit 1 M Schwefelsäure gestoppt.
7. Die photometrische Auswertung erfolgte bei 490 nm mit einem ELISA-Reader (Tecem Spectra Rainbow, Madein, Österreich). Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde die Fläche unter den Titrationskurven integriert und zu AUC-Werten berechnet. Die gemessene Absorption der humanen Kontrollseren wurde als Standard mit 1000 AUC-Einheiten bewertet. Um eine nichtspezifische Bindung von Serumantikörpern auszuschließen, wurden die Werte der mit PBS beschichteten Platte von den Messwerten subtrahiert.

2.8.11 Herzgewicht

Das Herzgewicht (HG) wurde zum einen nach der Organexplantation vor dem Einnähen der Kanülen, zum anderen nach dem Perfusionsende und dem Entfernen der Kanülen bestimmt (Mettler Feinwaage PL1200, Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz). Die Gewichtszunahme als Differenz zwischen dem Ausgangsgewicht und dem Gewicht nach Perfusion wurde in Prozenten angegeben: prozentuale Herzgewichtszunahme [%] = ((Herzgewicht nach Perfusion – Herzgewicht vor Perfusion) / Herzgewicht vor Perfusion) * 100.

2.10 Histopathologie

Nach Beendigung des Versuches wurde das gesamte Herz, sowie zwei entnommene Myokardbiopsien aus dem linken Ventrikel (eine vor Perfusion und eine nach Beendigung des Versuchs), in Formalin eingelegt und zur weiteren Auswertung in das Pathologische Institut der Ludwig-Maximilians-Universität versandt. Das Gewebe wurde dort histopathologisch vor allem auf Hinweise für eine hyperakute und eine akut vaskuläre (humorale) Abstoßung untersucht.

Histologisch ähneln sich diese beiden Abstoßungsformen und sind gekennzeichnet durch:

- Interstitiellen Ödemen und Hämorragien

45 Material und Methoden

- Endothelzellrupturen
- Diffuse mikrovaskuläre Thrombosen v.a. in den Venolen
- fokale Ischämien und Nekrosen
- Fibrin-, Immunglobulin- und Komplementablagerung entlang des Endothels
- Infiltration mononukleärer Zellen (Neutrophile)

Zudem wurde das Gewebe immunhistochemisch auf endotheliale Ablagerungen wie IgM und Fibrin untersucht.

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

2.11 Statistische Auswertungsmethoden

In die statistische Auswertung wurden alle physiologischen, immunologischen und biochemischen Parameter, die labortechnisch, über Monitoring oder Berechnungen ermittelt wurden, mit einbezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance), womit der Unterschied der Mittelwerte der beiden Gruppen verglichen wurde (XLSTAT 8.0, Addinsoft). Die obere Grenze des Signifikanzniveaus wurde mit 5 % festgelegt, womit ein F-Wert (Fisher-Verteilung) $\leq 0,05$ als statistisch signifikant galt. Es wurden zwei Gruppen miteinander verglichen (0= kein Treatment, 1= Treatment). Die Ergebnisse der Messungen wurden in Prozenten des Ausgangswertes angegeben, wobei die erste Messung zu Beginn der Perfusion als Ausgangswert galt.

3. Ergebnisse

3.1. Ischämie-Reperfusionszeit

Die kalte Ischämiezeit vom Abklemmen der Aorta bis zum Beginn der Reperfusion des Herzens im Perfusionssystem betrug in der Defibrotidegruppe 83 ± 16 min und in der Kontrollgruppe 81 ± 22 min.

3.2 Messparameter

Nummerierung der Zeitpunkte in den statistischen Analysen nach folgendem Schema:

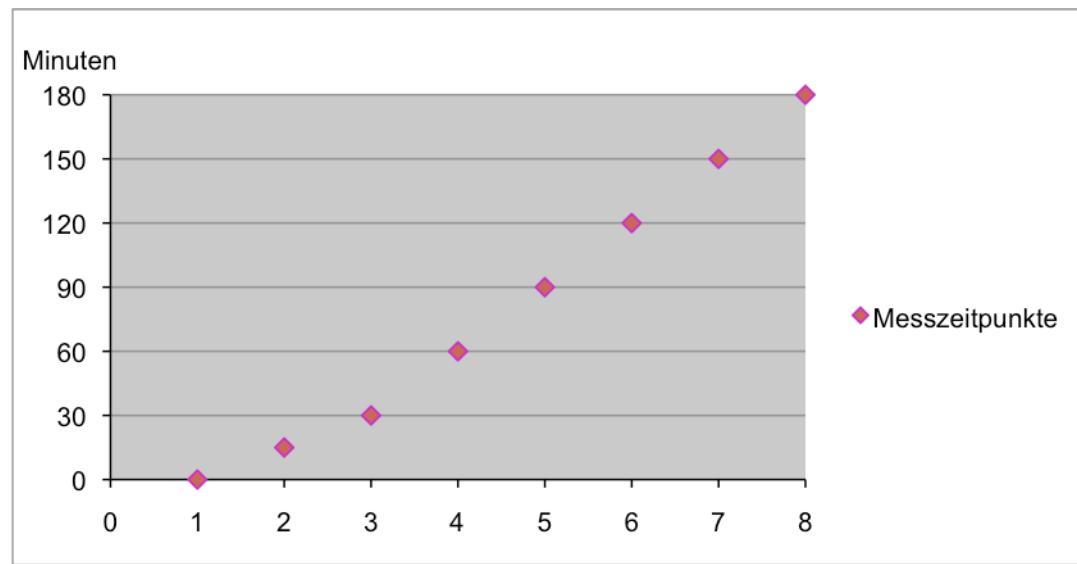


Abbildung 10: Messzeitpunkte nach Perfusionsbeginn

Die kardiale Funktion konnte in der Kontroll- ($n=6$) sowie in der Defibrotidegruppe ($n=6$) während der gesamten Versuchsdauer von 180 min aufrecht erhalten werden.

Variablen	Ausgangswert	signifikanter Effekt	
		Gruppe	Zeit
ABF	K 207 ± 13 ; T 354 ± 17 [ml/min]		x
dP/dt max	K 705 ± 25 ; T 583 ± 30 [mmHg/sec]		x
SV	K $1577,8 \pm 9$; T $1881,6 \pm 7$ [ml/beat]		x
SWI	K $2647,9 \pm 1367,5$; T $4376,7 \pm 741,7$ [erg/g]		x
SVI	K $34,3 \pm 9,7$; T $49,0 \pm 6,6$ [ml/g]		x
C(a-v)O ₂	K $6,7 \pm 1,5$; T $7,4 \pm 1,8$ [%]		x
CR	K $0,9 \pm 0,4$; T $1,1 \pm 0,3$ [mmHg*min/ml]		x
CBFI	K $2,09 \pm 0,3$; T $1,79 \pm 0,2$ [ml/g]		x

47 Ergebnisse

CBF	K 96 +/- 7; T 69 +/- 13 [ml/min]		x
CO	K 303 +/- 26; T 423 +/- 18 [ml/min]		
HR	K 99 +/- 4; T 84 +/- 6 [min ⁻¹]	x	
SaO ₂ arteriell	K 95,6 +/- 7,9; T 98,7 +/- 0,2 [%]		
Hb	K 11,8 +/- 1,8; T 10,5 +/- 0,6 [g/dl]		
Ca ²⁺	K 1,0 +/- 0,2; T 1,0 +/- 0,1 [mmol/l]		
SaO ₂ venös	K 59,2 +/- 14,1; T 44,4 +/- 9,1 [%]		x
K ⁺	K 4,1 +/- 0,2; T 4,4 +/- 0,1 [mmol/l]		x
CK-MB	K 6,2 +/- 3,8; T 0,6 +/- 0,1 [ng/ml]	x	x
LDH	K 149,5 +/- 98,8; T 124,3 +/- 47,7 [U/l]	x(Z 5-8)	x
AT	K 60,8 +/- 9,2; T 57 +/- 10,9 [%]		x(Z 5-8)
Fibrinogen	K 94,3 +/- 3,3; T 114,7 +/- 39,4 [g/l]		
CD11b	K 5922,2 +/- 3101,5; T 8473,3 +/- 307,8 [%]		
CD62L	K 258,3 +/- 157,7; T 69,7 +/- 9,2 [%]		x(Z 1-4)
CD41	K 789,8 +/- 154,9; T 700,7 +/- 212,6 [%]		
WBC	K 4,9 +/- 1,7; T 3,3 +/- 0,9 [x10 ³ /μl]		x(Z 1-4)
Plt	K 154,7 +/- 10,6; T 145,4 +/- 23,1 [x10 ³ /μl]		x(Z 1-4)
Hkt	K 36,4 +/- 6,3; T 32,4 +/- 1,3 [%]		
C3	K 0,54 +/- 0,04; T 0,55 +/- 0,02 [%]		
C4	K 0,11 +/- 0,04; T 0,11 +/- 0,03 [%]		
PGE ₂	K 416,2 +/- 309,7; T 432,5 +/- 425,9 [pg/ml]	x	x
6-keto-PGF _{1α}	K 2852,5 +/- 2255,5; T 1584,7 +/- 1538,4 [pg/ml]	x(Z 5-8)	x
Anti-Pig-Antikörper	K 1477,8 +/- 356,4; T 1138,7 +/- 467,5 [AUC]		x
Anti-Gal-α1,3-Gal-IgM	K 1283,5 +/- 296,6; T 1366,4 +/- 648,6 [AUC]		x
Anti-Gal-α1,3-Gal-IgG	K 808,7 +/- 126,7; T 687,3 +/- 225,8 [AUC]		x
Herzgewicht	K 46,0 +/- 17,5; T 38,4 +/- 30,7 [g]		x

Tabelle 3: Tabellarische Zusammenfassung der angegebenen Parameter mit Ausgangswert und Einheit, sowie dem signifikanten Effekt (K = Kontrolle; T = Treatment = Defibrotidegabe)

3.2.1 Hämodynamik

Aortaler Blutfluss (ABF), Linksventrikulärer Druckanstieg (dP/dt max)
Schlagvolumen (SV), Schlag-Arbeits-Index (SWI), Schlagvolumenindex (SVI),
Arteriovenöse Sauerstoffdifferenz (C(a-v)O₂), Koronarwiderstand (CR)

Die Untersuchungen der Variablen ABF, dP/dt max, SV, SWI, SVI, C(a-v)O₂ und CR zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Variablen sanken in beiden Gruppen über alle gemessenen Zeitpunkte stetig und signifikant

48 Ergebnisse

ab. Somit nahmen die myokardiale Kontraktilität und die Auswurfleistung des Herzens während der Versuchsdauer stetig ab und damit auch die myokardiale Sauerstoffversorgung.

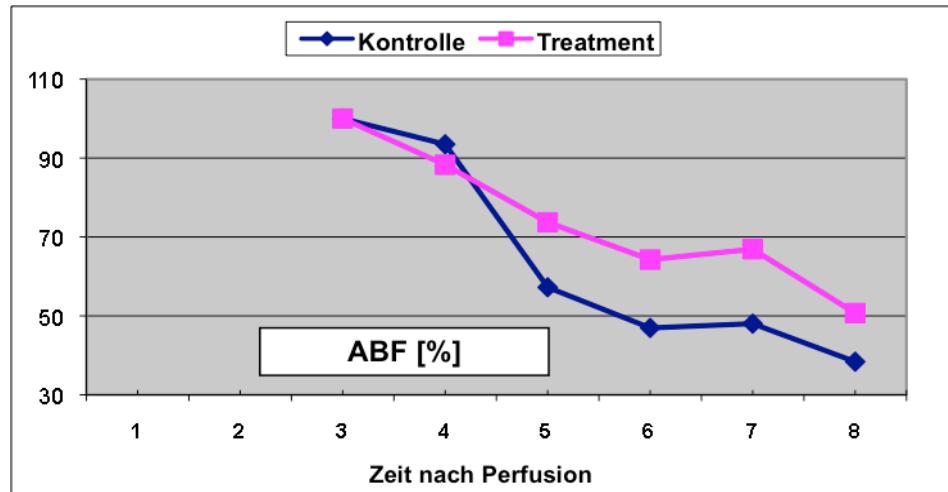


Abbildung 11: Verlaufsdiagramm ABF [%]

Manova 12 cases accepted.					
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
WITHIN CELLS	21788,39	10	2178,84		
TREATMEN	2145,01	1	2145,01	,98	,344

EFFECT .. TREATMEN BY ZEIT					
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)					
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Wilks	,68501	,80471	4,00	7,00	,559

EFFECT .. ZEIT					
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)					
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Wilks	,22969	5,86892	4,00	7,00	,021

Tabelle 4: Varianzanalyse ABF [%]

Bei der Untersuchung der Variablen ABF [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=5.86$, sig of F=0,021] feststellbar.

Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant. Beide Sets wiesen dasselbe Profil auf und wurden für die Prüfung der Zeiteffekte zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden durch polynomiale Kontraste analysiert:

Quelle	Test der polynomialen Kontraste					
	Faktor1	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
ABF	Linear	12168,694	1	12168,694	19,476	,001
	Quadratisch	1155,874	1	1155,874	3,877	,075
	Kubisch	1102,210	1	1102,210	7,688	,018

Tabelle 5: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen ABF [%]

49 Ergebnisse

Die Prüfung der polynomialen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von ABF [%] am besten durch einen linearen Trend approximiert (angepasst) werden konnten (Test of linear trend, $F(1,11)=19.47$, sig of $F=0.001$).

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für ABF [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variablen über alle gemessenen Zeitpunkte stets signifikant absteigen.

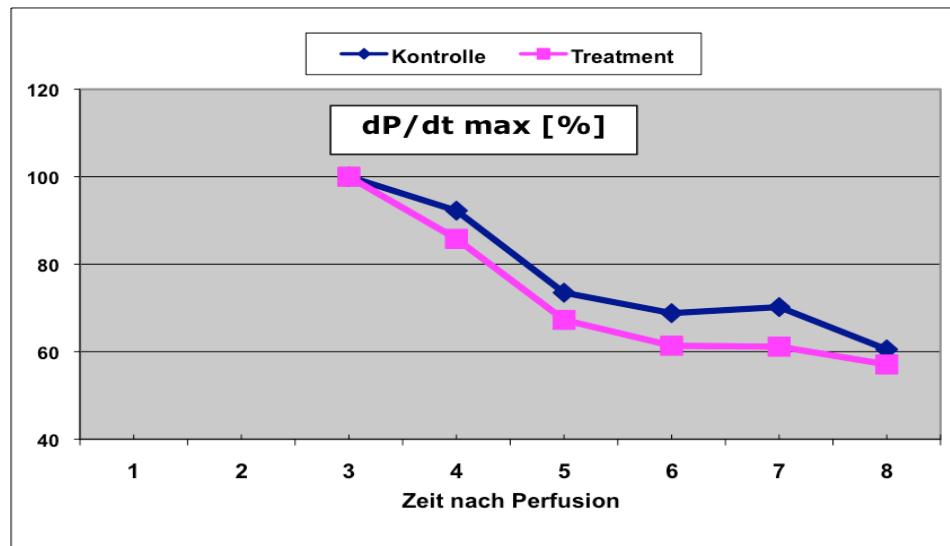


Abbildung 12: Verlaufsdiagramm dP/dt max [%]

Manova 12 cases accepted.						
Tests of Between-Subjects Effects.						
Tests of Significance for T1 using UNIQUE sums of squares						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig. of F	
WITHIN CELLS	15702,03	10	1570,20			
TREATMEN	637,60	1	637,60	,41	,538	

EFFECT .. TREATMEN BY PHASE						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,74653	,59417	4,00	7,00	,678	

EFFECT .. PHASE						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,17221	8,41177	4,00	7,00	,008	

EFFECT .. PHASE (Cont.)						
Univariate F-tests with (1;10) D. F.						
Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
T2	5091,51496	2491,47396	5091,51496	249,14740	20,43575	,001
T3	741,70494	1667,57178	741,70494	166,75718	4,44781	,061
T4	519,34887	1423,22352	519,34887	142,32235	3,64910	,085
T5	5,92605	678,95044	5,92605	67,89504	,08728	,774

Tabelle 6: Varianzanalyse dP/dt max [%]

50 Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Variablen $dP/dt \text{ max } [\%]$ mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=8.41$, sig of $F=0,008$] festzustellen war.

Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant. Beide Sets wiesen dasselbe Profil auf und wurden für die Prüfung der Zeiteffekte zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden durch polynomiale Kontraste analysiert:

Test der polynomialen Kontraste						
Quelle	Faktor1	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
dPmax	Linear	5091,515	1	5091,515	22,452	,001
	Quadratisch	741,705	1	741,705	4,825	,050
	Kubisch	519,349	1	519,349	3,951	,072

Tabelle 7: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen $dP/dt \text{ max } [\%]$

Die Prüfung der polynomialen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von $dP/dt \text{ max } [\%]$ am besten durch einen linearen Trend approximiert werden konnten (Test of linear trend, $F(1,11)=22.45$, sig of $F<0.001$).

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für $dP/dt \text{ max } [\%]$ konnte geschlossen werden, dass diese Variablen über alle gemessenen Zeitpunkte stets signifikant absteigen.

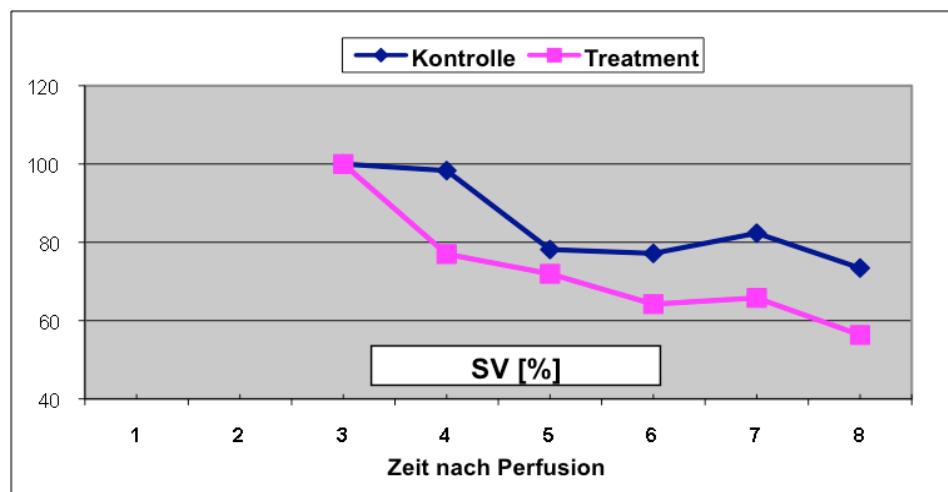


Abbildung 13: Verlaufsdiagramm SV [%]

51 Ergebnisse

Manova	12 cases accepted.
Tests of Between-Subjects Effects.	
Tests of Significance for T1 using UNIQUE sums of squares	
Source of Variation SS DF MS F Sig of F	
WITHIN CELLS	17367,56 10 1736,76
TREATMEN	3296,06 1 3296,06 1,90 ,198

EFFECT .. TREATMEN BY PHASE	
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)	
Test Name	Value Exact F Hypoth. DF Error DF Sig. of F
Wilks	,82511 ,37093 4,00 7,00 ,823

EFFECT .. PHASE	
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)	
Test Name	Value Exact F Hypoth. DF Error DF Sig. of F
Wilks	,20292 6,87403 4,00 7,00 ,014

Tabelle 8: Varianzanalyse SV [%]

Bei der Untersuchung der Variablen SV [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=6.87$, sig of F=0,014] feststellbar.

Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant. Beide Sets wiesen dasselbe Profil auf und wurden für die Prüfung der Zeiteffekte zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden durch polynomiale Kontraste analysiert:

Test der polynomialen Kontraste						
Quelle	Faktor1	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
SV	Linear	2598,738	1	2598,738	7,431	,020
	Quadratisch	181,965	1	181,965	,428	,526
	Kubisch	518,953	1	518,953	1,932	,192

Tabelle 9: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen SV [%]

Die Prüfung der polynomialen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von SV [%] am besten durch einen linearen Trend approximiert werden konnten (Test of linear trend, $F(1,11)=7.431$, sig of F=0.020).

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für SV [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variablen über alle gemessenen Zeitpunkte stets signifikant absteigen.

52 Ergebnisse

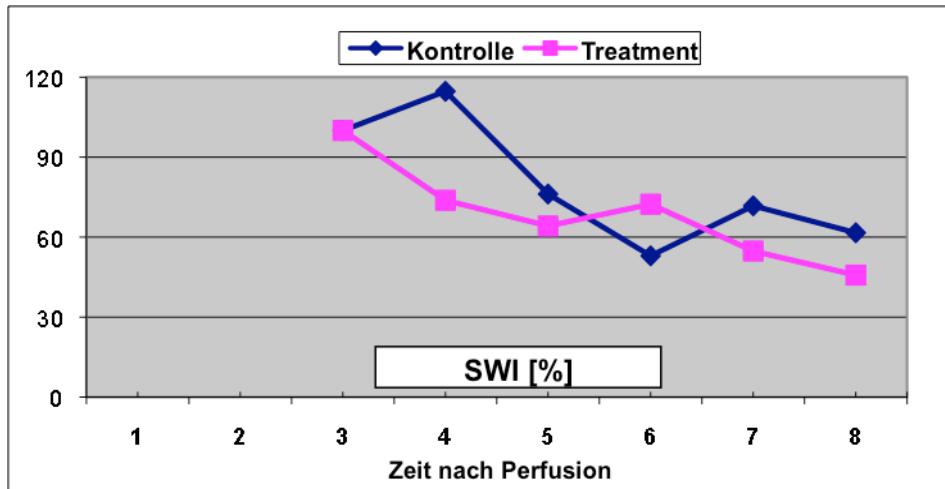


Abbildung 14: Verlaufsdiagramm SWI [%]

Manova 12 cases accepted.						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	33661,92	10	3366,19			
Treatment	6622,41	1	6622,41	1,97	,191	

EFFECT .. Treatment BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,71670	,69175	4,00	7,00	,621	

EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,14050	10,70560	4,00	7,00	,004	

Tabelle 10: Varianzanalyse SWI [%]

Bei der Untersuchung der Variablen SWI [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=10.7$, sig of F=0,004] feststellbar. Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant.

Auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mittels polynomiale Kontraste wurde verzichtet.

Aus den Ergebnissen der Tests und den entsprechenden Abbildungen für SWI [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variablen über die gemessenen Zeitpunkte signifikant absteigen.

53 Ergebnisse

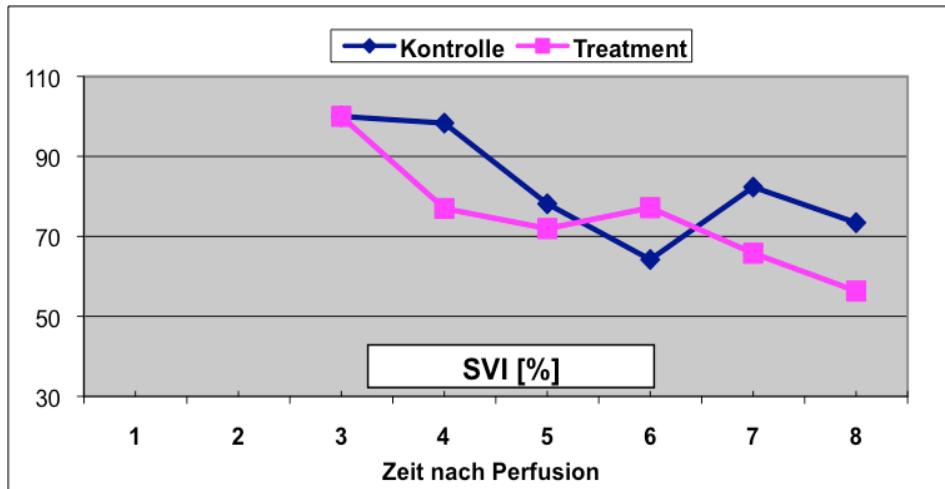


Abbildung 15: Verlaufsdiagramm SVI [%]

Manova 12 cases accepted.								
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F			
WITHIN CELLS	17367,56	10	1736,76					
Treatment	3296,06	1	3296,06	1,90	,198			

EFFECT .. Treatment BY ZEIT								
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)								
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F			
Wilks	,82511	,37093	4,00	7,00	,823			

EFFECT .. ZEIT								
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)								
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F			
Wilks	,20292	6,87403	4,00	7,00	,014			

Tabelle 11: Varianzanalyse SVI [%]

Bei der Untersuchung der Variablen SVI [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=6.87$, sig of $F=0,014$] feststellbar. Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant.

Auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mittels polynomiale Kontraste wurde verzichtet.

Aus den Ergebnissen der Tests und den entsprechenden Abbildungen für SVI [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variablen über die gemessenen Zeitpunkte signifikant absteigen.

54 Ergebnisse

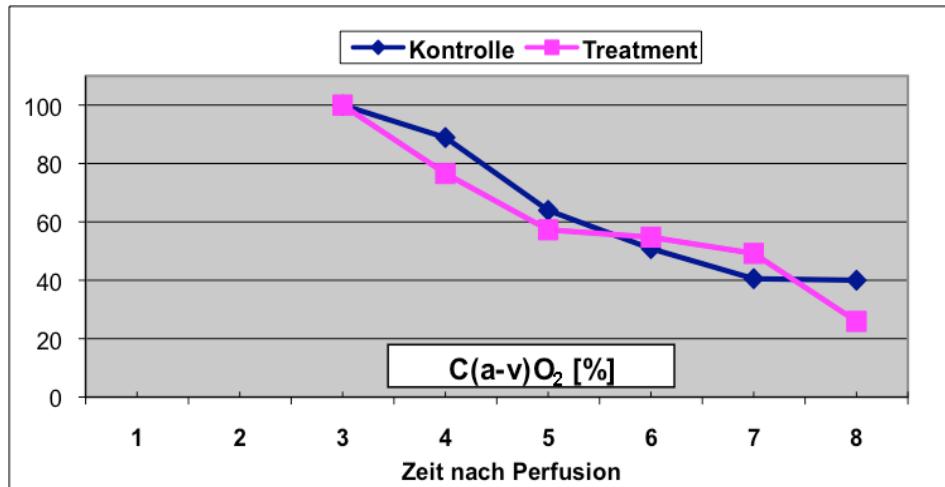


Abbildung 16: Verlaufsdiagramm C(a-v)O₂ [%]

Manova 12 cases accepted.						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	12403,42	10	1240,34			
Treatment	481,25	1	481,25	,39	,547	

EFFECT .. Treatment BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,61175	1,11066	4,00	7,00	,422	

EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,07822	20,62263	4,00	7,00	,001	

Tabelle 12: Varianzanalyse C(a-v)O₂ [%]

Bei der Untersuchung der Variablen C(a-v)O₂ [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=20.62$, sig of $F=0.001$] feststellbar. Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant.

Auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mittels polynomiale Kontraste wurde verzichtet.

Aus den Ergebnissen der Tests und den entsprechenden Abbildungen für C(a-v)O₂ [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variable über alle gemessenen Zeitpunkte signifikant absteigt.

55 Ergebnisse

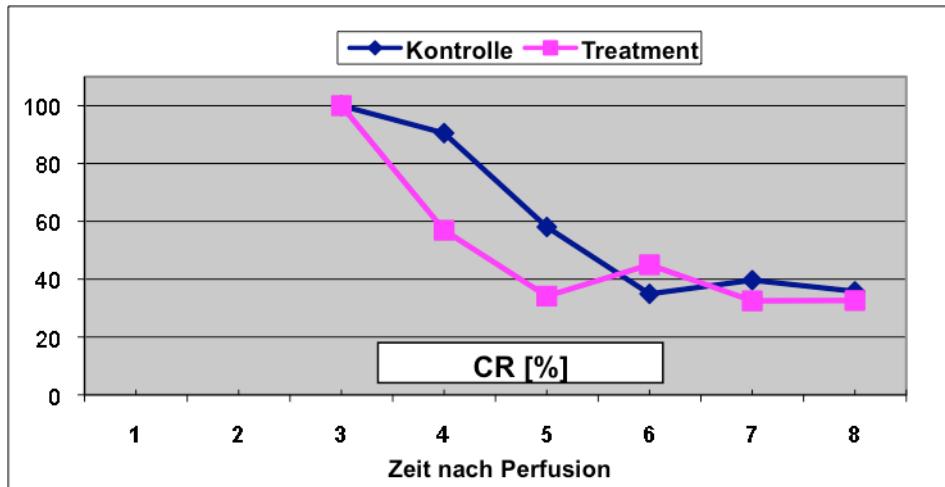


Abbildung 17: Verlaufsdiagramm CR [%]

Manova 12 cases accepted.						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	9899,93	10	989,99			
Treatment	3636,46	1	3636,46	3,67	,084	

EFFECT .. Treatment BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,21085	6,54993	4,00	7,00	,016	

EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,09592	16,49469	4,00	7,00	,001	

Tabelle 13: Varianzanalyse CR [%]

Bei der Untersuchung der Variablen CR [%] mittels Varianzanalyse waren ein signifikanter Zeiteffekt und eine signifikante Interaktion Gruppe x Zeit [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=16.49$, sig of F=0.001; effect of group x time: $F(4,7)=6.54$, sig of F=0.016] feststellbar. Der Gruppeneffekt war nicht signifikant. Die Gruppenunterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten wurden mittels Oneway Anova analysiert:

ONEWAY ANOVA						
		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
CR_5	Zwischen den Gruppen	1716,265	1	1716,265	8,301	,016
CR_6	Zwischen den Gruppen	304,156	1	304,156	1,372	,269
CR_7	Zwischen den Gruppen	152,403	1	152,403	,722	,415
CR_8	Zwischen den Gruppen	30,046	1	30,046	,146	,710

Tabelle 14: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede für die Variablen CR [%]

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für CR [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variablen über alle gemessenen Zeitpunkte signifikant absteigen.

Koronarer Blutfluss (CBF), Koronarer Blutflussindex (CBFI)

Die Variablen CBF und CBFI zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Variablen stiegen in beiden Gruppen an, mit Ausnahme des Abfalls der Variable am Zeitpunkt 6 der Treatmentgruppe bei CBFI, was vermutlich durch eine Fehlmessung erklärbar sein könnte. Somit hatte das Absinken des Koronarwiderstandes einen Anstieg des koronaren Blutflusses zur Folge.

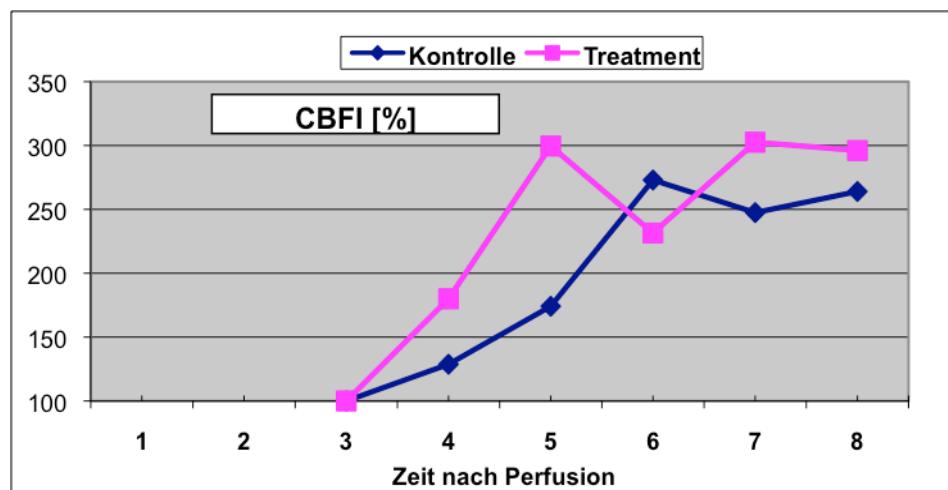


Abbildung 18: Verlaufsdigramm CBFI [%]

Manova 12 cases accepted.					
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
WITHIN CELLS	352319,46	10	35231,95		
Treatment	55959,57	1	55959,57	1,59	,236

EFFECT .. Treatment BY ZEIT					
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)					
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Wilks	,46070	2,04860	4,00	7,00	,192

EFFECT .. ZEIT					
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)					
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Wilks	,23210	5,78975	4,00	7,00	,022

Tabelle 15: Varianzanalyse CBFI [%]

Bei der Untersuchung der Variablen CBFI [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=5.79$, sig of F=0,022] feststellbar. Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant.

Auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mittels polynomiale Kontraste wurde verzichtet.

57 Ergebnisse

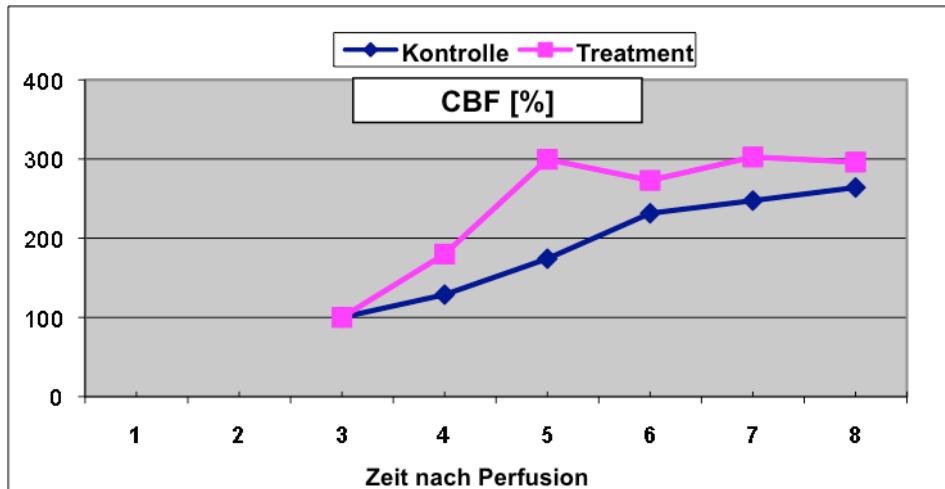


Abbildung 19: Verlaufsdiagramm CBF [%]

Manova								
12 cases accepted.								
Tests of Significance for T1 using UNIQUE sums of squares								
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig. of F			
WITHIN CELLS	352319,46	10	35231,95					
TREATMEN	55959,57	1	55959,57	1,59	,236			

EFFECT .. TREATMEN BY PHASE								
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)								
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F			
Wilks	,46070	2,04860	4,00	7,00	,192			

EFFECT .. PHASE								
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)								
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F			
Wilks	,23210	5,78975	4,00	7,00	,022			

Tabelle 16: Varianzanalyse CBF [%]

Bei der Untersuchung der Variablen CBF [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(4,7)=5.87$, sig of F=0,022] feststellbar.

Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant. Beide Sets wiesen dasselbe Profil auf und wurden für die Prüfung der Zeiteffekte zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden durch polynomiale Kontraste analysiert:

Test der polynomialen Kontraste						
Quelle	Faktor1	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
CBF	Linear	100584,865	1	100584,865	26,831	,000
	Quadratisch	18642,654	1	18642,654	10,863	,007
	Kubisch	2923,177	1	2923,177	2,316	,156

Tabelle 17: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen CBF [%]

58 Ergebnisse

Die Prüfung der polynomialen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von CBF [%] am besten durch einen linearen Trend approximiert werden konnten (Test of linear trend, $F(1,11)=26.83$, sig of $F<0.001$).

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für CBF [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variablen über die gemessenen Zeitpunkte signifikant ansteigen.

Herzzeitvolumen (CO = ABF+CBF)

Die Untersuchung der Variablen CO ergab keinen signifikanten Effekt. Das Herzzeitvolumen blieb über alle gemessenen Zeitpunkte relativ konstant, da der CBF Anstieg durch ein Absinken des ABF in etwa kompensiert wurde.

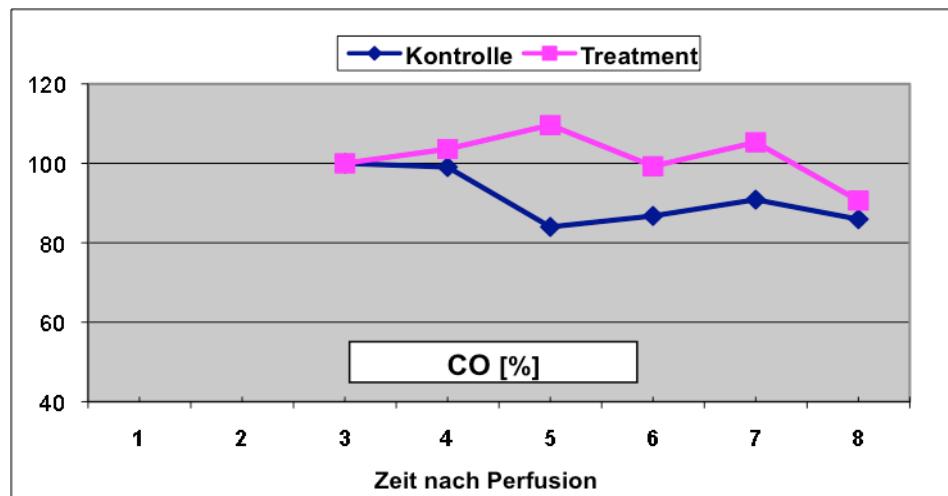


Abbildung 20: Verlaufsdiagramm CO [%]

Manova					
12 cases accepted.					
Tests of Between-Subjects Effects.					
Tests of Significance for T1 using UNIQUE sums of squares					
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig. of F
WITHIN CELLS	29991,19	10	2999,12		
TREATMEN	2295,89	1	2295,89	,77	,402

EFFECT .. TREATMEN BY PHASE					
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)					
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Wilks	,55636	1,39543	4,00	7,00	,328

EFFECT .. PHASE					
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)					
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Wilks	,38068	2,84699	4,00	7,00	,108

Tabelle 18: Varianzanalyse CO [%]

Die Untersuchung der Variablen CO [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

Herzfrequenz (HR)

Bei der Untersuchung der Variablen HR mittels Varianzanalyse war ein signifikanter Gruppenunterschied [effect of group: $F(1,10)=37.49$, sig of $F<0,001$] feststellbar. Die HR der Defibrotidegruppe stieg über alle gemessenen Zeitpunkte stets signifikant stärker an als in der Kontrollgruppe.

Die messbar höhere Herzfrequenz in der Defibrotidegruppe könnte die Parameter Schlagvolumen und Herzzeitvolumen beeinflusst haben. Es ergaben sich zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen bei beiden Parametern, trotzdem nahm das Schlagvolumen in der Defibrotidegruppe etwas mehr ab als in der Kontrollgruppe und das Herzzeitvolumen etwas mehr zu.

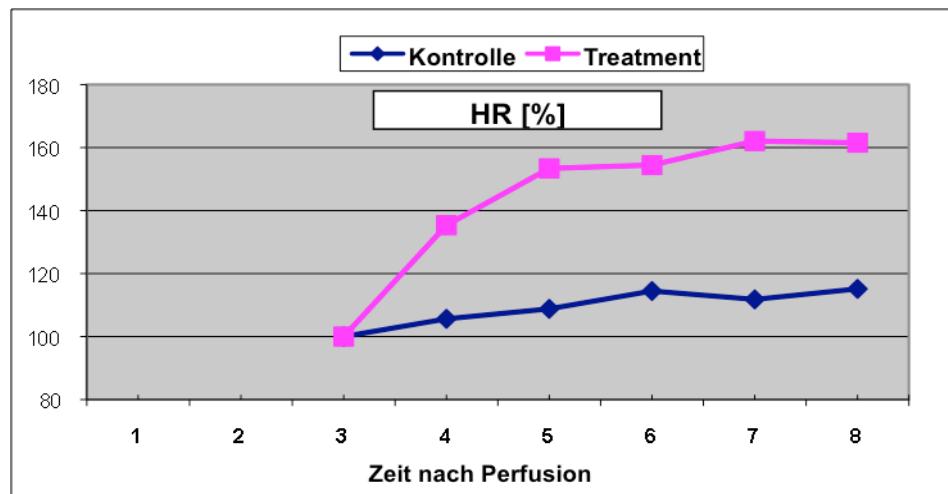


Abbildung 21: Verlaufsdiagramm HR [%]

Manova	12 cases accepted.
Tests of Between-Subjects Effects.	
Tests of Significance for T1 using UNIQUE sums of squares	
Source of Variation	SS DF MS F Sig of F
WITHIN CELLS	7124,94 10 712,49
TREATMEN	26709,45 1 26709,45 37,49 ,000

EFFECT .. TREATMEN BY PHASE	
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)	
Test Name	Value Exact F Hypoth. DF Error DF Sig. of F
Wilks	,67530 ,84144 4,00 7,00 ,541

EFFECT .. PHASE	
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 , N = 2 1/2)	
Test Name	Value Exact F Hypoth. DF Error DF Sig. of F
Wilks	,48584 1,85200 4,00 7,00 ,224

Tabelle 19: Varianzanalyse HR [%]

Der Zeiteffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant. Die Gruppenunterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten wurden mittels Oneway Anova analysiert:

60 Ergebnisse

ONEWAY ANOVA						
		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
HR_4	Zwischen den Gruppen	2648,448	1	2648,448	11,077	,008
HR_5	Zwischen den Gruppen	5966,442	1	5966,442	27,029	,000
HR_6	Zwischen den Gruppen	4797,072	1	4797,072	21,323	,001
HR_7	Zwischen den Gruppen	7585,738	1	7585,738	24,117	,001
HR_8	Zwischen den Gruppen	6460,674	1	6460,674	13,609	,004

Tabelle 20: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede für die Variablen HR [%]

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für HR [%] konnte geschlossen werden, dass die Variablen der Treatmentgruppe über alle gemessenen Zeitpunkte stets signifikant stärker ansteigen als die Variablen der Kontrollgruppe.

3.2.2 Blutgase

Sauerstoffsättigung (SaO₂) arteriell, Hämoglobin (Hb), und Calcium (Ca²⁺)

Die Untersuchungen der Variablen SaO₂, Hb und Ca²⁺ zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Sie blieben über alle gemessenen Zeitpunkte relativ konstant.

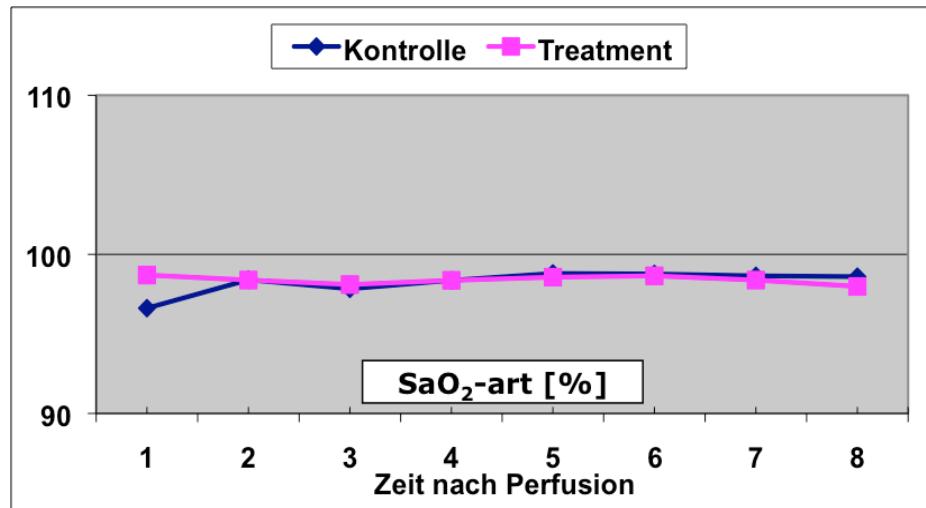


Abbildung 22: Verlaufsdiagramm SaO₂-art [%]

Die Untersuchung der Variablen SaO₂ arteriell [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

61 Ergebnisse

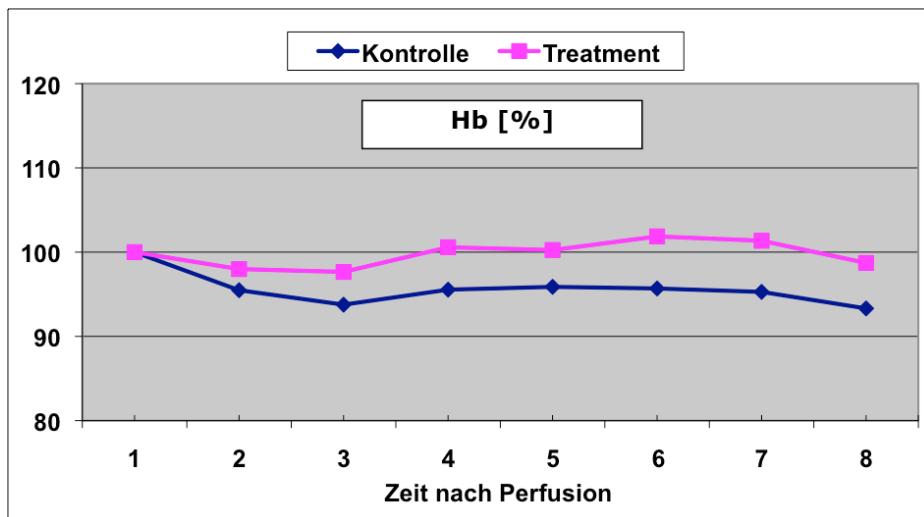


Abbildung 23: Verlaufsdiagramm Hb [%]

Die Untersuchung der Variablen Hb [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

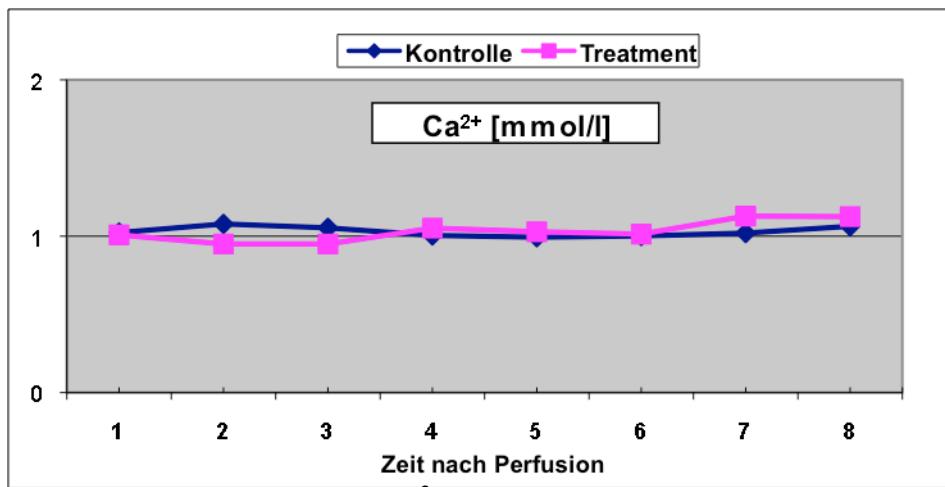


Abbildung 24: Verlaufsdiagramm Ca²⁺ [mmol/l]

Die Untersuchung der Variablen Ca²⁺ [mmol/l] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

Sauerstoffsättigung (SaO₂) venös

Die Untersuchung der Variablen SaO₂ venös zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Variablen stiegen in beiden Gruppen über alle gemessenen Zeitpunkte signifikant an. Daraus kann geschlossen werden, dass die Sauerstoffausschöpfung durch das Gewebe im Laufe des Versuches abnahm.

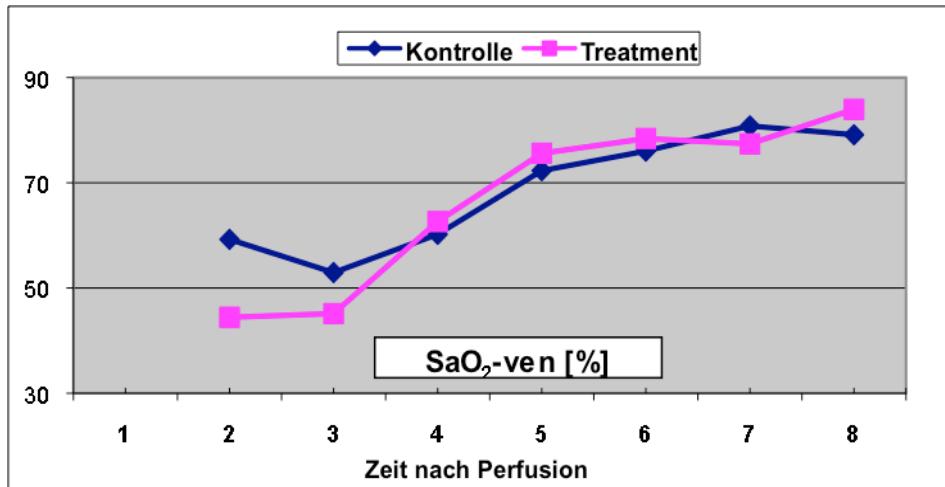


Abbildung 25: Verlaufsdiagramm SaO_2 venös [%]

Bei der Untersuchung der Variablen SaO_2 venös [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Z 1-4: $F(2,8)=8.08$, sig of $F=0,012$, Z 5-8: Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(3,8)=5.10$, sig of $F=0,029$] feststellbar. Die Prüfung der polynomialen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von SaO_2 venös [%] am besten durch einen linearen Trend approximiert werden konnten (Test of linear trend, $F(1,10)= 95,39$, sig of $F<0.001$). Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant.

Kalium (K^+)

Die Untersuchung der Variablen K^+ zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Der Kaliumwert, ein Indikator für den Zellzerfall, stieg in beiden Gruppen über alle gemessenen Zeitpunkte an.

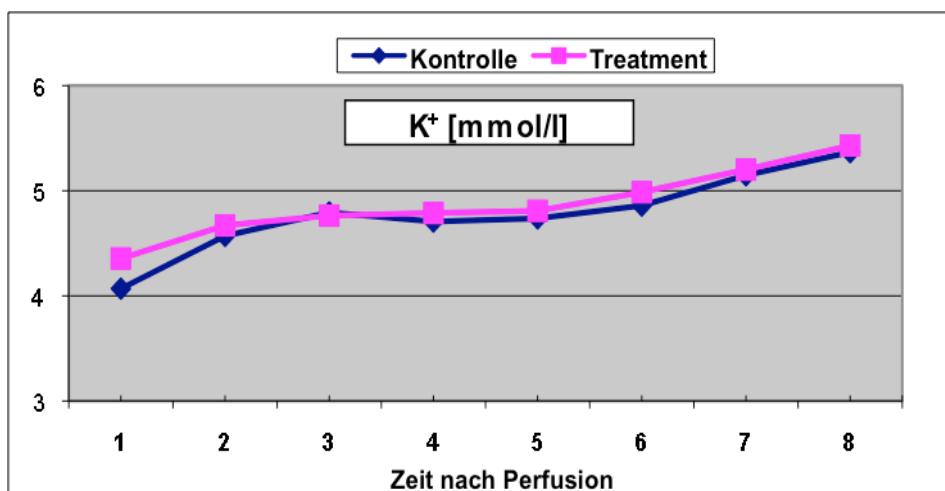


Abbildung 26: Verlaufsdiagramm K^+ [mmol/l]

Bei der Untersuchung der Variablen K^+ [mmol/l] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: Z 1-4: $F(3,30)=9.50$, sig of $F=0.0005$, Z 5-8: $F(3,8)=32.01$, sig of $F<0,0001$] feststellbar. Die

63 Ergebnisse

Prüfung der polynomialen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von K^+ [mmol/l] am besten durch einen linearen Trend approximiert werden konnten (Test of linear trend, $F(1,11)= 45.33$, sig of $F=0.001$). Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant.

3.2.3 Herzenzyme

Creatinkinase (CK-MB), Laktatdehydrogenase (LDH)

Die Variablen der Defibrotidegruppe stiegen signifikant stärker an als die Variablen der Kontrollgruppe. Somit kam es im Laufe des Versuchs vermutlich zu mehr Myokardläsionen in der Defibrotidegruppe als in der Kontrollgruppe.

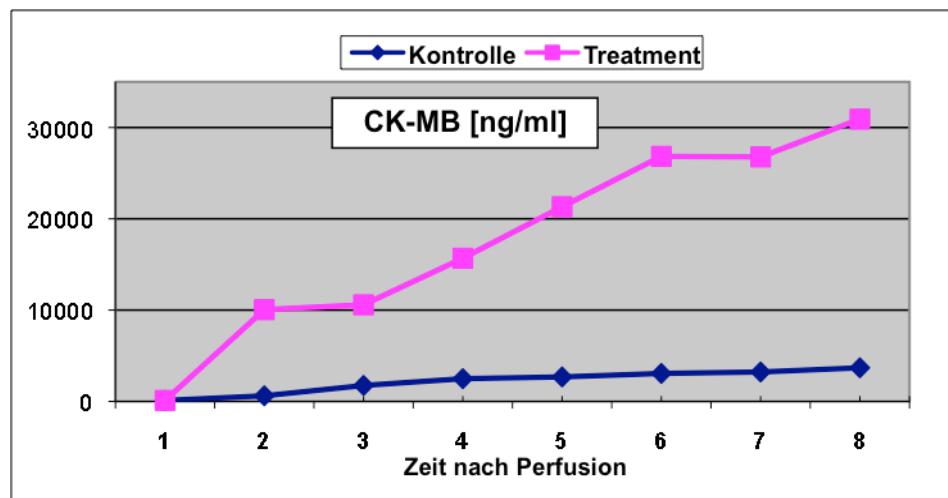


Abbildung 27: Verlaufsdiagramm CK-MB [ng/ml]

Bei der Untersuchung der Variablen CK-MB [ng/ml] mittels Varianzanalyse waren der Zeiteffekt, der Gruppeneffekt und die Interaktion Gruppe x Zeit signifikant [Wilks multivariate test of significance: effect of group: Z 1-4: $F(1,7)=60.68$, sig of $F<0.001$, Z 5-8: $F(1,7)=57.15$, sig of $F<0.001$; effect of time: Z 1-4: $F(3,5)=24.97$, sig of $F=0.002$, Z 5-8: $F(3,5)=5.36$, sig of $F=0.051$; effect of group x time: Z 1-4: $F(3,5)=14.64$, sig of $F=0.007$, Z 5-8: $F(3,5)=3.92$, sig of $F=0.088$]. Die Gruppenunterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten wurden mittels Oneway Anova analysiert:

64 Ergebnisse

ONEWAY ANOVA						
		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
CK_2	Zwischen den Gruppen	1,781E8	1	1,781E8	31,438	,001
CK_3	Zwischen den Gruppen	1,561E8	1	1,561E8	50,565	,000
CK_4	Zwischen den Gruppen	3,480E8	1	3,480E8	49,289	,000
CK_5	Zwischen den Gruppen	6,947E8	1	6,947E8	63,922	,000
CK_6	Zwischen den Gruppen	1,131E9	1	1,131E9	57,772	,000
CK_7	Zwischen den Gruppen	1,110E9	1	1,110E9	52,931	,000
CK_8	Zwischen den Gruppen	1,484E9	1	1,484E9	42,347	,000

Tabelle 21: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede für die Variablen CK-MB [ng/ml]

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für CK-MB [ng/ml] konnte geschlossen werden, dass die Variablen der Treatmentgruppe über alle gemessenen Zeitpunkte stets signifikant stärker ansteigen als die Variablen der Kontrollgruppe.

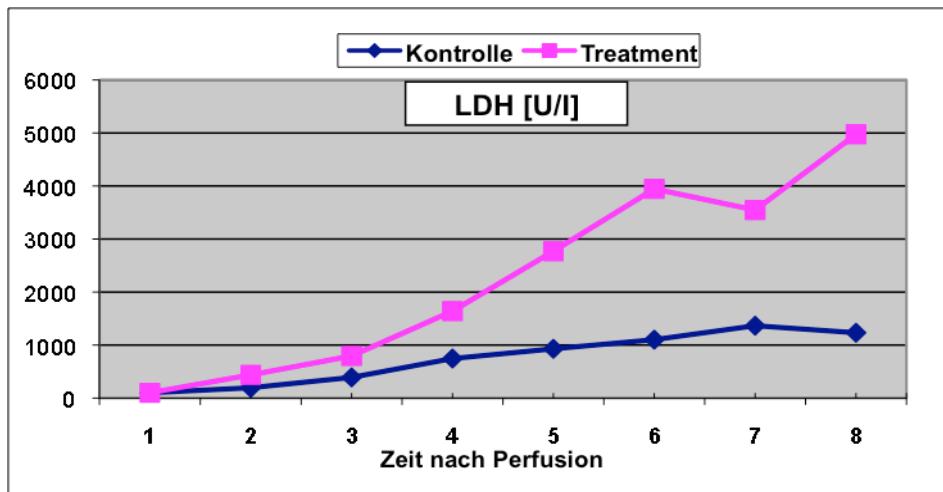


Abbildung 28: Verlaufsdiagramm LDH [U/I]

Bei der Untersuchung der Variablen LDH [U/I] mittels Varianzanalyse war ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: Z 1-4: $F(3,5)=9.87$, sig of $F=0,015$; Z 5-8: $F(3,4)=9.04$, sig of $F=0,03$] feststellbar. Zudem wiesen die Zeitpunkte 5-8 einen signifikanten Gruppeneffekt auf [Wilks multivariate test of significance: effect of group: Z 5-8: $F(1,6)=23.82$, sig of $F=0,003$]. Die Interaktion Gruppe x Zeit war nicht signifikant.

Beide Sets wiesen dasselbe Profil auf und wurden für die Prüfung der Zeiteffekte zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden durch polynomiale Kontraste analysiert:

65 Ergebnisse

Test der polynomiaen Kontraste						
Quelle	Faktor1	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
LDH	Linear	5,077E7	1	5,077E7	14,208	,007
	Quadratisch	5513,928	1	5513,928	,006	,940
	Kubisch	705186,645	1	705186,645	,788	,404

Tabelle 22: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen LDH [U/I]

Die Prüfung der polynomiaen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von LDH [U/I] am besten durch einen linearen Trend approximiert werden konnten (Test of linear trend, $F(1,7)= 14.21$, sig of $F=0.007$).

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für LDH [U/I] konnte geschlossen werden, dass die Variablen der Treatmentgruppe über alle gemessenen Zeitpunkte stets signifikant stärker ansteigen als die Variablen der Kontrollgruppe.

3.2.4 Gerinnungparameter

Antithrombin (AT)

Die Untersuchung der Variablen AT zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Variablen sanken in beiden Gruppen über alle gemessenen Zeitpunkte ab. Somit kam es in beiden Gruppen zu einer Verbrauchskoagulopathie im Zuge der Abstoßungseffekte.

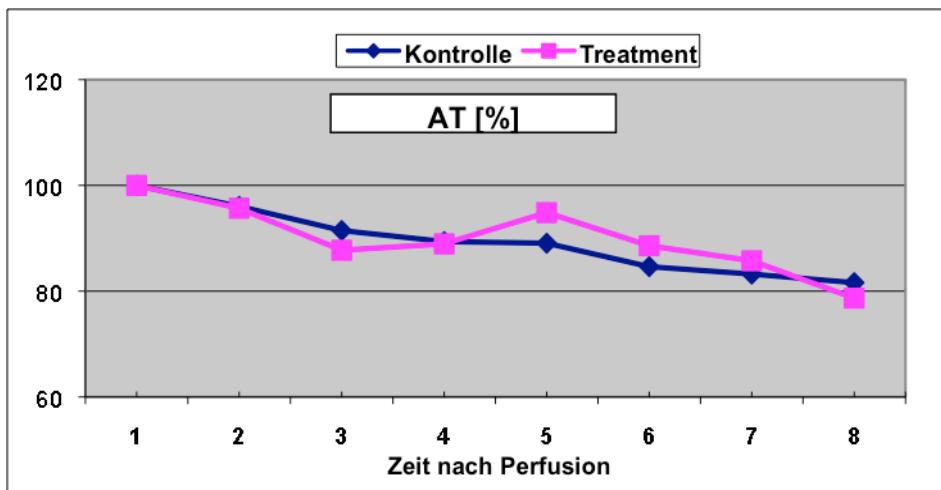


Abbildung 29: Verlaufdiagramm AT [%]

Bei der Untersuchung der Variablen AT [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(3,5)=5.67$, sig of $F=0.046$] in den Zeitpunkten 5-8 feststellbar. Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant. Auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mittels polynomiale Kontraste wurde

66 Ergebnisse

verzichtet. Die Untersuchung der Zeitpunkte 1-4 ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

Fibrinogen

Die Untersuchung der Variablen Fibrinogen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Fibrinogenkonzentration blieb in der Defibrotidegruppe konstant, wohingegen sie in der Kontrollgruppe in den ersten 15 Minuten anstieg um dann konstant zu verlaufen. Dieser Verlauf könnte in der Defibrotidegruppe, in der kein Anstieg zu beobachten war, auf den antiinflammatorischen und pro-fibrinolytischen Effekt von Defibrotide zurück zu führen sein (siehe Kapitel 1.5.).

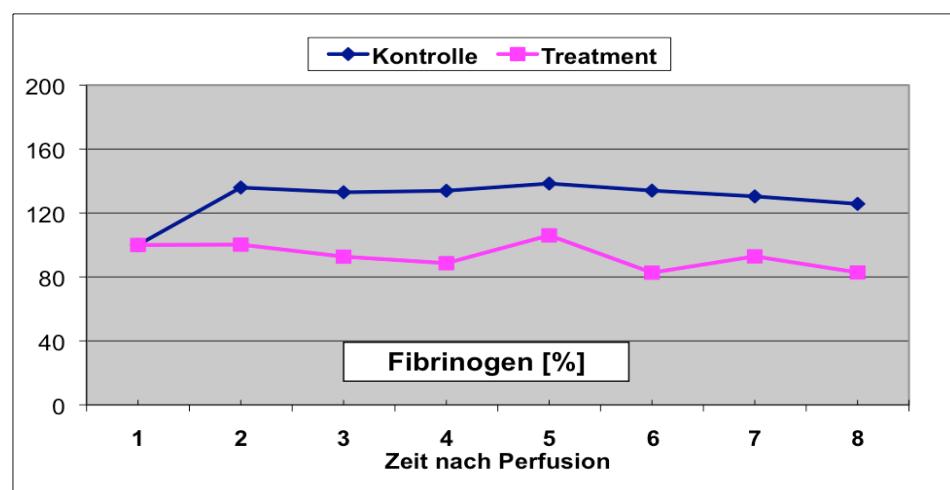


Abbildung 30: Verlaufsdiagramm Fibrinogen [%]

67 Ergebnisse

Variable Fibrinogen, Zeitpunkte 1-4						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	80673,26	7	11524,75			
Treatment	7353,35	1	7353,35	,64	,451	
----- EFFECT .. Treatment BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,83657	,32560	3,00	5,00	,808	

----- EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,44535	2,07570	3,00	5,00	,222	
Variable Fibrinogen, Zeitpunkte 5-8						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	205200,13	7	29314,30			
Treatment	21666,34	1	21666,34	,74	,418	
----- EFFECT .. Treatment BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,53018	1,47689	3,00	5,00	,327	
----- EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,60336	1,09564	3,00	5,00	,432	

Tabelle 23: Varianzanalyse Fibrinogen [%]

Die Untersuchung der Variablen Fibrinogen [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

3.2.5 Zelloberflächenmarker

CD11b

Die Oberflächenexpression von CD11b gilt als Aktivierungsindex von Leukozyten bei Entzündungsreaktionen. In den ersten 30 Minuten der Perfusion stieg CD11b in der Kontrollgruppe stärker an als in der Defibrotidegruppe. Dieser Effekt wurde vermutlich durch den antiinflammatorischen Wirkmechanismus von Defibrotide bedingt, jedoch war dieser nicht von Dauer da die Entzündungsreaktion während der Abstoßungsprozesse zu stark war und nicht durch Defibrotide allein unterdrückt werden konnte (siehe Kapitel 1.5.). Die messbare CD11b Konzentration nahm in der Kontrollgruppe im Verlauf durch Leukozytenmigration und –infiltration in das Myokard wieder ab.

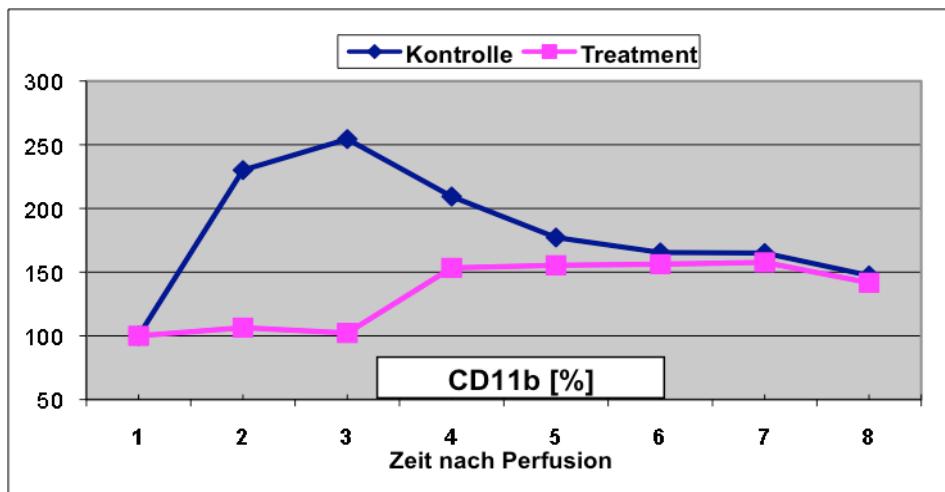


Abbildung 31: Verlaufsdiagramm CD11b [%]

Die Untersuchung der Variablen CD11b [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

Aus den Ergebnissen der Tests und den entsprechenden Abbildungen für CD11b [%] war erkennbar, dass die Variablen in der Kontrollgruppe in den Zeitpunkten 1-3 stark ansteigen, anschließend in den Zeitpunkten 4-8 wieder absteigen und sich damit wieder den Variablen der Treatmentgruppe annähern. Die Variablen der Treatmentgruppe verliefen relativ konstant, außer einem Anstieg in den Zeitpunkten 3-4.

CD62L

Die Untersuchung der Variablen CD62L zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. CD62L wurde nach 90 Minuten Perfusion verstärkt exprimiert, nahm aber im Verlauf des Versuches wieder ab (180 min.).

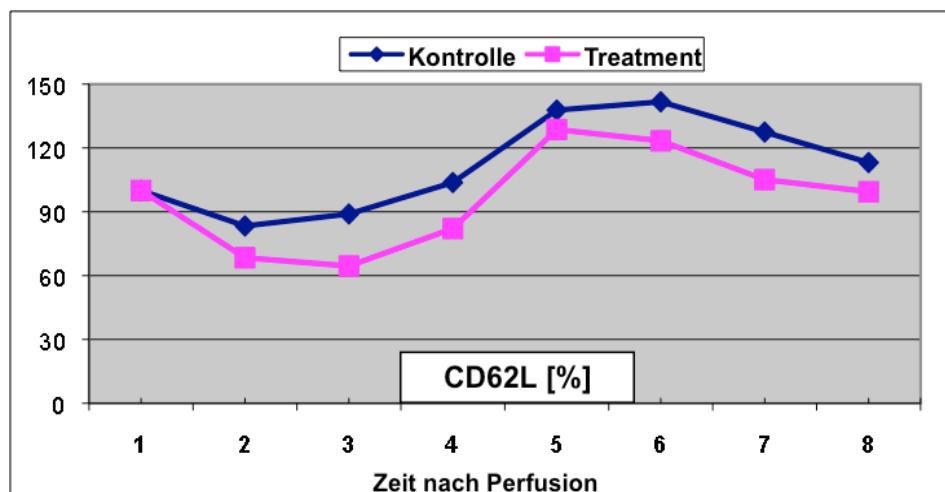


Abbildung 32: Verlaufsdiagramm CD62L [%]

Bei der Untersuchung der Variablen CD62L [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time:

69 Ergebnisse

$F(3,6)=5.4$, sig of $F=0,039$] in den Zeitpunkten 1-4 feststellbar. Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant. Auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mittels polynomiale Kontraste wurde verzichtet. Die Untersuchung der Zeitpunkte 5-8 ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

Aus den Ergebnissen der Tests und den entsprechenden Abbildungen für CD62L [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variable in den Zeitpunkten 1-2 absteigt, dann in den Zeitpunkten 3-5 ansteigt und anschließend in den Zeitpunkten 6-8 wieder absteigt.

CD41

Die Untersuchung der Variablen CD41 (Fibrinogen-Rezeptor auf Thrombozyten) zeigte einen konstanten Verlauf, ebenso wie der von Fibrinogen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

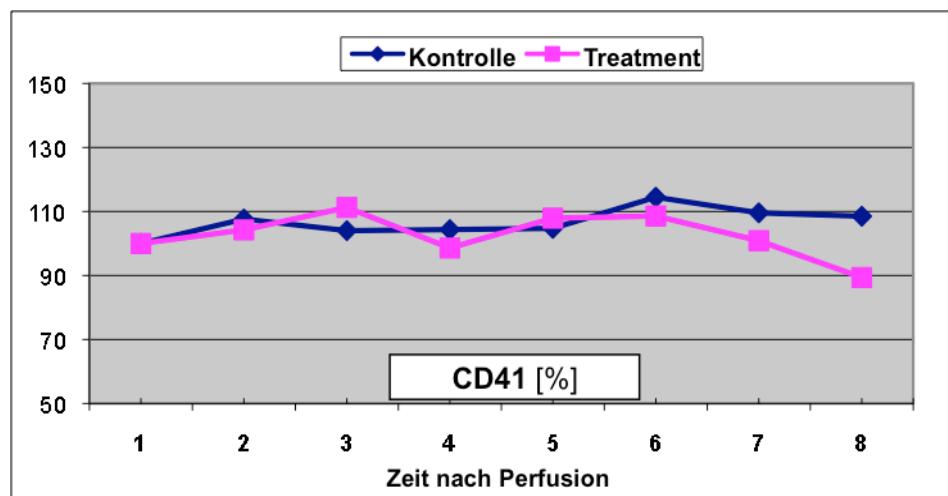


Abbildung 33: Verlaufsdiagramm CD41 [%]

Die Untersuchung der Variable CD41 [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

Aus den Ergebnissen der Tests und den entsprechenden Abbildungen für CD41 [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variable über alle gemessenen Zeitpunkte relativ konstant verläuft.

3.2.6 Zellzahlbestimmung

Leukozyten (WBC)

Die Variablen WBC verliefen relativ konstant und zeigten keinen signifikanten Effekt zwischen den Gruppen.

70 Ergebnisse

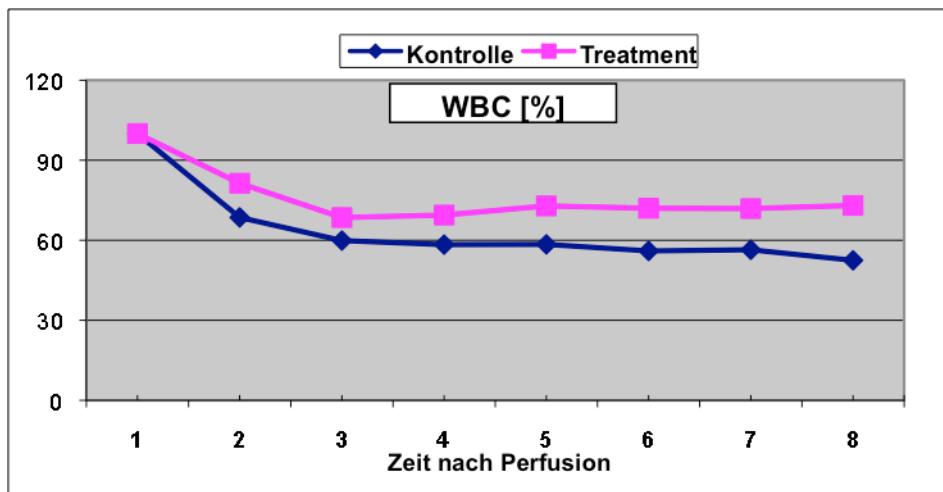


Abbildung 34: Verlaufsdiagramm WBC [%]

Bei der Untersuchung der Variablen WBC [%] mittels Varianzanalyse war ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(3,7)=39.37$, sig of $F<0.000$] in den Zeitpunkten 1-4 feststellbar. Die Interaktion Gruppe x Zeit war nicht signifikant. Die Untersuchung der Zeitpunkte 5-8 ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden durch polynomiale Kontraste analysiert:

Test der polynomialen Kontraste						
Quelle	Faktor1	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
WBC	Linear	6779,437	1	6779,437	36,676	,000
	Quadratisch	4003,776	1	4003,776	59,960	,000
	Kubisch	1902,214	1	1902,214	19,890	,001

Tabelle 24: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen WBC [%]

Die Prüfung der polynomialen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von WBC [%] Zeitpunkt 1-4 am besten durch einen linearen Trend approximiert werden konnten (Test of linear trend, $F(1,10)= 59,96$ sig of $F<0.001$).

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für WBC [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variablen in den Zeitpunkten 1-4 absteigen und dann relativ konstant bleiben.

Thrombozyten (Plt)

Wie auch bei Antithrombin zu sehen war sinkt die Thrombozytenanzahl im Laufe des Versuchs ab im Sinne einer Verbrauchskoagulopathie, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

71 Ergebnisse

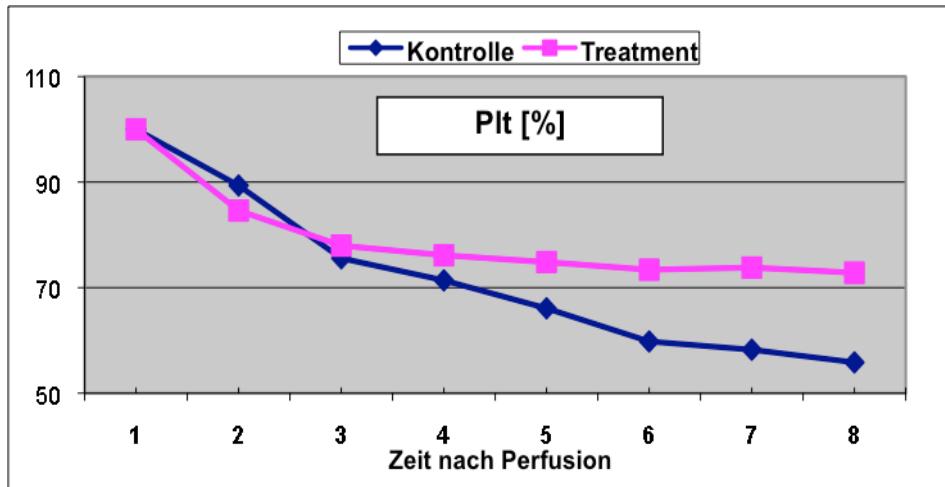


Abbildung 35: Verlaufsdiagramm Plt [%]

Bei der Untersuchung der Variablen Plt [%] mittels Varianzanalyse war lediglich ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: $F(3,7)=18.22$, sig of $F=0.001$] in den Zeitpunkten 1-4 feststellbar. Der Gruppeneffekt sowie die Interaktion Gruppe x Zeit waren nicht signifikant. Auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mittels polynomiale Kontraste wurde verzichtet. Die Untersuchung der Zeitpunkte 5-8 ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

Aus den Ergebnissen der Tests und den entsprechenden Abbildungen für Plt [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variablen über die Zeitpunkte 1-4 signifikant absteigen.

Hämatokrit (Hkt)

Die Untersuchung der Variablen Hkt mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt zwischen den Gruppen. Die Variablen verliefen über die gemessenen Zeitpunkte annähernd konstant.

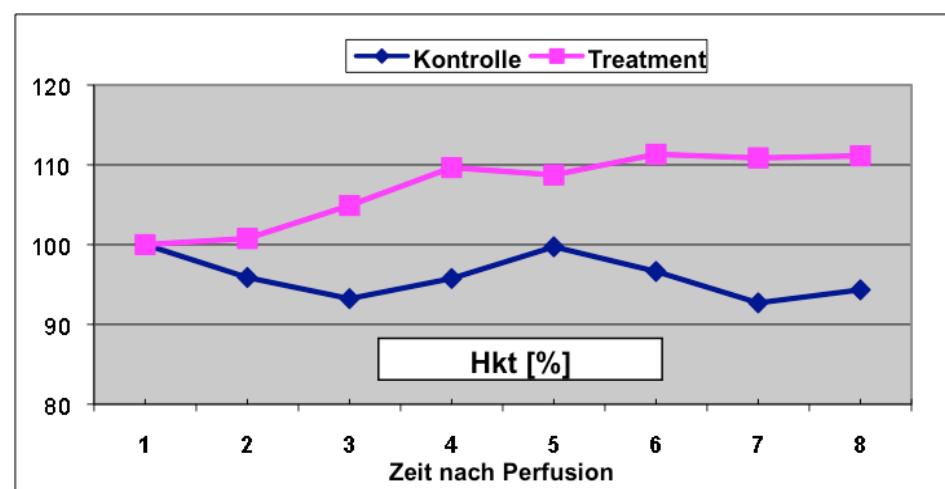


Abbildung 36: Verlaufsdiagramm Hkt [%]

72 Ergebnisse

Variable Hkt, Zeitpunkte 1-4								
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig. of F			
WITHIN CELLS	2334,37	9	259,37					
Treatment	633,01	1	633,01	2,44	,153			
----- EFFECT .. Treatment BY ZEIT								
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 2 1/2)								
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F			
Wilks	,76353	,72264	3,00	7,00	,570			
----- EFFECT .. ZEIT								
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 2 1/2)								
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F			
Wilks	,74581	,79526	3,00	7,00	,534			
Variable Hkt, Zeitpunkte 5-8								
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig. of F			
WITHIN CELLS	8038,23	9	893,14					
Treatment	2345,84	1	2345,84	2,63	,140			
----- EFFECT .. Treatment BY ZEIT								
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 2 1/2)								
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F			
Wilks	,69199	1,03859	3,00	7,00	,433			
----- EFFECT .. ZEIT								
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 2 1/2)								
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F			
Wilks	,77485	,67800	3,00	7,00	,593			

Tabelle 25: Varianzanalyse Hkt [%]

Die Untersuchung der Variablen Hkt [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

3.2.7 Komplementsystem

C3, C4

Die Untersuchungen der Variablen C3 und C4 mittels Varianzanalyse ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen, jedoch sanken die Variablen C3 und C4 nach 60 Minuten Perfusion in der Kontrollgruppe ab während sie in der Defibrotidegruppe relativ konstant blieben. Dies könnte auf den antiinflammatorischen Effekt von Defibrotide zurück zu führen sein (siehe Kapitel 1.5.).

73 Ergebnisse

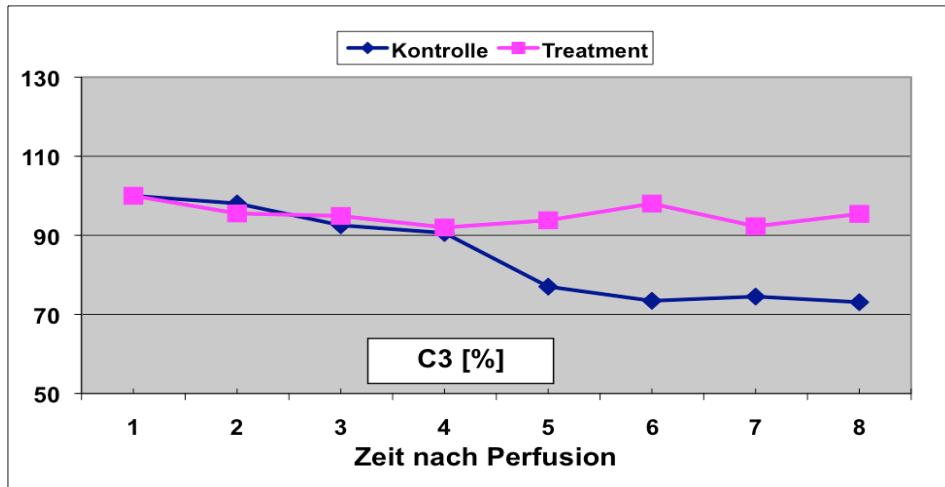


Abbildung 37: Verlaufsdiagramm C3 [%]

Variable C3, Zeitpunkte 1-4						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	2780,03	7	397,15			
Treatment	,76	1	,76	,00	,966	
----- EFFECT .. Treatment BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,93717	,11173	3,00	5,00	,950	
----- EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,49371	1,70915	3,00	5,00	,280	
Variable C3, Zeitpunkte 5-8						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	18344,86	7	2620,69			
Treatment	1709,51	1	1709,51	,65	,446	
----- EFFECT .. Treatment BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,45961	1,95960	3,00	5,00	,238	
----- EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,68016	,78373	3,00	5,00	,552	

Tabelle 26: Varianzanalyse C3 [%]

Die Untersuchung der Variablen C3 [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

74 Ergebnisse

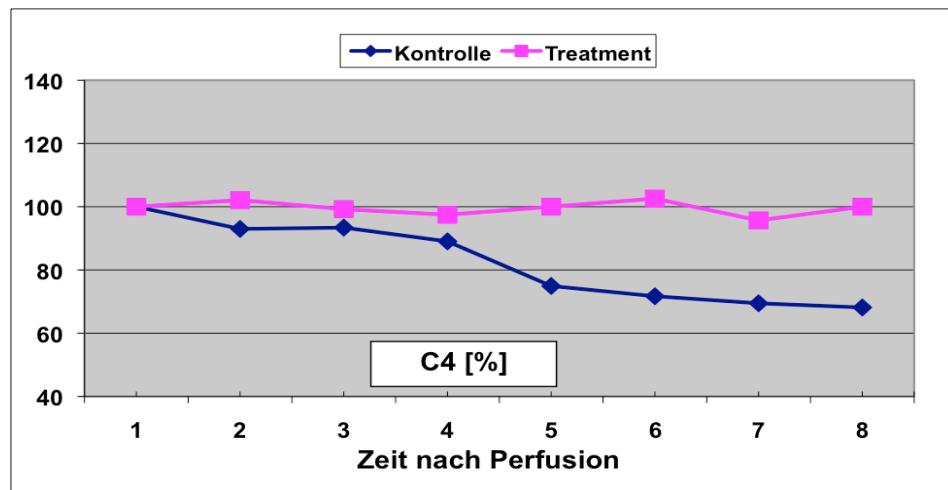


Abbildung 38: Verlaufsdiagramm C4 [%]

Variable C4, Zeitpunkte 1-4						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	2262,20	7	323,17			
Treatment	273,10	1	273,10	,85	,389	EFFECT .. Treatment BY ZEIT
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,52660	1,49827	3,00	5,00	,323	
EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,66855	,82628	3,00	5,00	,533	
Variable C4, Zeitpunkte 5-8						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	16906,42	7	2415,20			
Treatment	4142,28	1	4142,28	1,72	,232	EFFECT .. Treatment BY ZEIT
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,57407	1,23658	3,00	5,00	,389	
EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 1 1/2)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,34504	3,16365	3,00	5,00	,124	

Tabelle 27: Varianzanalyse C4 [%]

Die Untersuchung der Variablen C4 [%] mittels Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Effekt bezüglich Zeit, Gruppe bzw. der Interaktion Zeit x Gruppe.

Aus den Ergebnissen der Tests und den entsprechenden Abbildungen für C4 [%] konnte geschlossen werden, dass diese Variable sich ähnlich der Variable C3 [%] verhält.

3.2.8 PGE₂/ 6-keto-PGF_{1α}

Bei den Untersuchungen der Variablen PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} war ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar. Sie stiegen in der Defibrotidegruppe signifikant stärker an als in der Kontrollgruppe was auf den Wirkmechanismus von Defibrotide zurück zu führen sein sollte (siehe Kapitel 1.5.).

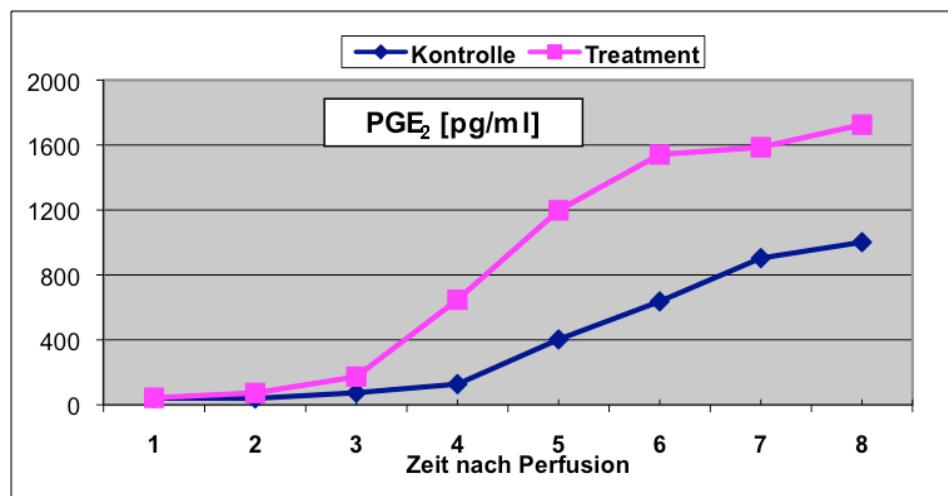


Abbildung 39: Verlaufsdiagramm PGE₂ [pg/ml]

```

Manova imm_1 imm_2 imm_3 imm_4 BY Treatment (0,1)
/WSFACTORS = Zeit (4)/MEASURE =Immunologie
/print = SIGNIF (univ multiv AVERF)/DESIGN .
12 cases accepted.
Source of Variation      SS      DF      MS      F Sig of F
WITHIN CELLS      117368,24      10  11736,82
TREATMEN      320170,00      1  320170,00   27,28  ,000
-----
EFFECT .. TREATMEN BY ZEIT
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 3 )
Test Name      Value      Exact F Hypoth. DF  Error DF Sig. of F
Wilks      ,08904  27,28266      3,00      8,00  ,000
-----
EFFECT .. ZEIT
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 3 )
Test Name      Value      Exact F Hypoth. DF  Error DF Sig. of F
Wilks      ,06140  40,76273      3,00      8,00  ,000
-----
Manova      12 cases accepted.
Source of Variation      SS      DF      MS      F Sig of F
WITHIN CELLS      3289853,50      10  328985,35
TREATMEN      7238998,21      1  7238998,2   22,00  ,001
-----
EFFECT .. TREATMEN BY ZEIT
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 3 )
Test Name      Value      Exact F Hypoth. DF  Error DF Sig. of F
Wilks      ,37526  4,43947      3,00      8,00  ,041
-----
EFFECT .. ZEIT
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 3 )
Test Name      Value      Exact F Hypoth. DF  Error DF Sig. of F
Wilks      ,10718  22,21388      3,00      8,00  ,000

```

Tabelle 28: Varianzanalyse PGE₂ [%]

76 Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Variablen PGE₂ [pg/ml] mittels Varianzanalyse waren der Zeiteffekt, der Gruppeneffekt und die Interaktion Gruppe x Zeit signifikant [Wilks multivariate test of significance: effect of group: Z 1-4: F(1,10)=27.28, sig of F<0,001, Z 5-8: F(1,10)=22.00, sig of F=0,001; effect of time: Z 1-4: F(3,8)=40.76, sig of F<0,001, Z 5-8: F(3,8)=22,21, sig of F<0,001] (Kontrasttests in MANOVA, p < 0.05). Die Gruppenunterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten wurden mittels Oneway Anova analysiert und die Gruppen-Zeitunterschiede mittels Kontrasttest in Manova:

TREATMENT: 0					
Manova 6 cases accepted.					
EFFECT .. CONSTANT (Cont.)					
Univariate F-tests with (1;5) D. F.					
Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F
T2-T1	23,66710	1550,98283	23,66710	310,19657	,07630
T3-T1	6464,40583	4914,26932	6464,40583	982,85386	6,57718
T4-T1	44239,6571	9917,93697	44239,6571	1983,58739	22,30285
T3-T2	7270,36118	3484,77803	7270,36118	696,95561	10,43160
T4-T2	46309,8083	6093,21854	46309,8083	1218,64371	38,00111
T4-T3	16881,9934	9162,43856	16881,9934	1832,48771	9,21261
Sig. of F					
					,793
					,050
					,005
					,023
					,002
					,029
TREATMENT: 1					
Manova 6 cases accepted.					
EFFECT .. CONSTANT (Cont.)					
Univariate F-tests with (1;5) D. F.					
Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F
T2-T1	5315,31334	23595,3403	5315,31334	4719,06805	1,12635
T3-T1	101495,533	56678,6548	101495,533	11335,7310	8,95359
T4-T1	2187055,59	230063,679	2187055,59	46012,7357	47,53153
T3-T2	60357,4051	39763,8125	60357,4051	7952,76250	7,58949
T4-T2	1976733,38	368809,654	1976733,38	73761,9308	26,79883
T4-T3	1346263,75	308652,906	1346263,75	61730,5812	21,80870
Sig. of F					
					,337
					,030
					,001
					,040
					,004
					,005
TREATMENT: 0					
Manova 6 cases accepted.					
EFFECT .. CONSTANT (Cont.)					
Univariate F-tests with (1;5) D. F.					
Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F
T6-T5	329143,772	103949,821	329143,772	20789,9642	15,83186
T7-T5	1505980,33	110838,453	1505980,33	22167,6905	67,93582
T8-T5	2152195,27	334377,584	2152195,27	66875,5168	32,18211
T7-T6	427027,450	50281,6670	427027,450	10056,3334	42,46353
T8-T6	798030,785	108035,351	798030,785	21607,0702	36,93378
T8-T7	57529,1327	95840,0166	57529,1327	19168,0033	3,00131
Sig. of F					
					,144
TREATMENT: 1					
Manova 6 cases accepted.					
EFFECT .. CONSTANT (Cont.)					
Univariate F-tests with (1;5) D. F.					
Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F
T6-T5	709220,552	45745,2896	709220,552	9149,05792	77,51842
T7-T5	905511,541	328587,372	905511,541	65717,4744	13,77885
T8-T5	1672704,45	138447,804	1672704,45	27689,5609	60,40921
T7-T6	11975,2244	240750,170	11975,2244	48150,0341	,24871
T8-T6	203561,970	55566,4322	203561,970	11113,2864	18,31699
T8-T7	116791,050	161957,785	116791,050	32391,5569	3,60560
Sig. of F					
					,116

Tabelle 29: Kontrasttest in Manova für die Variablen PGE₂ [pg/ml]

77 Ergebnisse

ONEWAY ANOVA						
		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
PGE2_1	Zwischen den Gruppen	7,934	1	7,934	,006	,941
PGE2_2	Zwischen den Gruppen	3341,912	1	3341,912	2,766	,127
PGE2_3	Zwischen den Gruppen	29322,109	1	29322,109	4,643	,057
PGE2_4	Zwischen den Gruppen	809654,877	1	809654,877	27,545	,000

Tabelle 30: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede in Zeitpunkt 1-4 für die Variablen PGE₂ [pg/ml]

ONEWAY ANOVA						
		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
PGE2_5	Zwischen den Gruppen	1896795,084	1	1896795,084	28,573	,000
PGE2_6	Zwischen den Gruppen	2455673,465	1	2455673,465	34,173	,000
PGE2_7	Zwischen den Gruppen	1397982,423	1	1397982,423	11,346	,007
PGE2_8	Zwischen den Gruppen	1573553,303	1	1573553,303	14,064	,004

Tabelle 31: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede in Zeitpunkt 5-8 für die Variablen PGE₂ [pg/ml]

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für PGE₂ [pg/ml] konnte geschlossen werden, dass die Variable der Treatmentgruppe stets stärker signifikant ansteigt als die Variable der Kontrollgruppe.

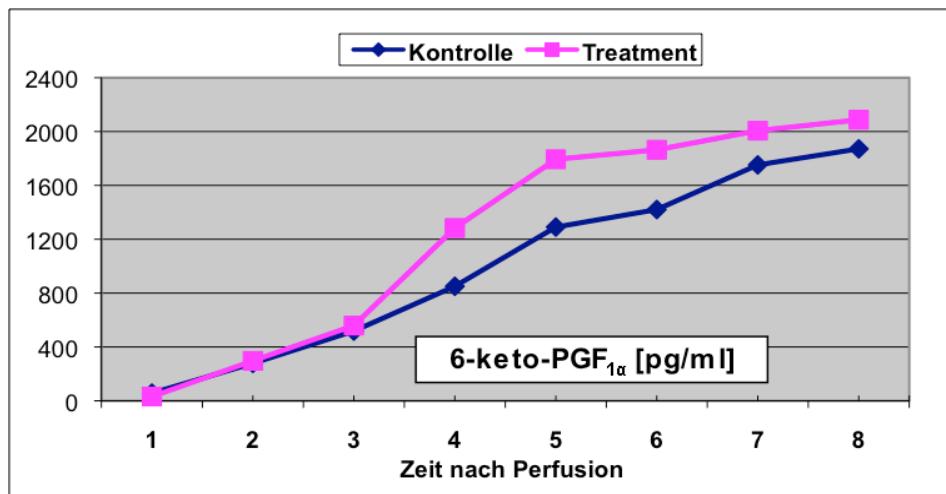


Abbildung 40: Verlaufsdiagramm 6-keto-PGF_{1α} [pg/ml]

78 Ergebnisse

Manova imm_a_1 imm_a_2 imm_a_3 imm_a_4 BY Treatment (0,1)						
<i>/WSFACTORS = Zeit (4)/MEASURE =Immunologie</i>						
<i>/print = SIGNIF (univ multiv AVERF)/DESIGN .</i>						
12 cases accepted.						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	677763,54	10	67776,35			
TREATMEN	163212,35	1	163212,35	2,41	,152	

EFFECT .. TREATMEN BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 3)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,43430	3,47352	3,00	8,00	,071	

EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 3)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,04284	59,57470	3,00	8,00	,000	

Manova imm_a_5 imm_a_6 imm_a_7 imm_a_8 BY Treatment (0,1)						
<i>/WSFACTORS = Zeit (4)/MEASURE =Immunologie</i>						
<i>/print = SIGNIF (univ multiv AVERF)/DESIGN .</i>						
12 cases accepted.						
0 cases rejected because of out-of-range factor values.						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN CELLS	1518396,06	10	151839,61			
TREATMEN	1506888,36	1	1506888,4	9,92	,010	

EFFECT .. TREATMEN BY ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 3)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,64786	1,44947	3,00	8,00	,299	

EFFECT .. ZEIT						
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 3)						
Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F	
Wilks	,17302	12,74618	3,00	8,00	,002	

Tabelle 32: Varianzanalyse 6-keto-PGF_{1 α} [pg/ml]

Bei der Untersuchung der Variablen 6-keto-PGF_{1 α} [pg/ml] mittels Varianzanalyse war ein signifikanter Zeiteffekt [Wilks multivariate test of significance: effect of time: Z 1-4: F(3,8)=59.57, sig of F<0.0001; Z 5-8: F(3,8)=12.74, sig of F=0.002] feststellbar. Zudem wiesen die Zeitpunkte 5-8 einen signifikanten Gruppeneffekt auf [Wilks multivariate test of significance: effect of group: F(1,10)=9.92, sig of F=0.010]. Die Interaktion Gruppe x Zeit war nicht signifikant. Beide Sets wiesen dasselbe Profil auf und wurden für die Prüfung der Zeiteffekte zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden durch polynomiale Kontraste analysiert:

Test der polynomialen Kontraste						
Quelle	Faktor1	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
6-keto-PGF	Linear	4,569E7	1	4,569E7	600,751	,000
	Quadratisch	757135,718	1	757135,718	9,607	,010
	Kubisch	578487,417	1	578487,417	14,012	,003

Tabelle 33: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen 6-keto-PGF_{1 α} [pg/ml]

Die Prüfung der polynomialen Kontraste ergab, dass die Mittelwerte von 6-keto-PGF_{1 α} [pg/ml] am besten durch einen linearen Trend approximiert werden konnten (Test of linear trend, F(1,11)=600.75, sig of F<0.0001).

79 Ergebnisse

Aus den Ergebnissen der Tests, den entsprechenden Abbildungen und Tabellen für 6-keto-PGF_{1 α} [pg/ml] konnte geschlossen werden, dass diese Variable stets signifikant ansteigt.

3.2.9 Anti-Pig-Antikörper

Die anfänglichen Antikörperkonzentrationen waren annähernd auf dem gleichen Niveau, sodass in beiden Gruppen eine vergleichbare immunologische Vorbelastung vorlag. Die freien Antikörper im Serum wurden durch die Endothelzellbindung abgefangen wodurch sich die messbare Antikörperkonzentration im Serum reduzierte.

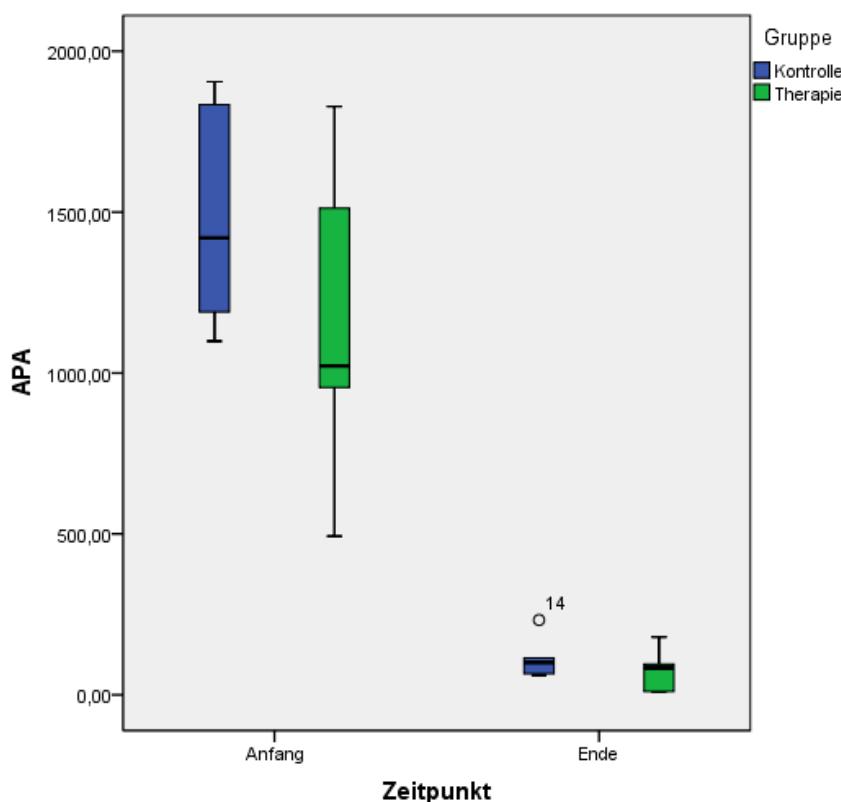


Abbildung 41: Mittelwerte mit Standardabweichung der Anti-Pig-Antikörper Titer [AUC] im Serum der Kontroll- und Defibrotidegruppe am Anfang und Ende der Versuchsreihen

3.2.10 Anti-Gal- α 1,3-Gal

Die anfänglichen Antikörperkonzentrationen waren annähernd auf dem gleichen Niveau, sodass in beiden Gruppen eine vergleichbare immunologische Vorbelastung vorlag. Die freien Antikörper im Serum wurden durch die Endothelzellbindung abgefangen wodurch sich die messbare Antikörperkonzentration im Serum reduzierte.

80 Ergebnisse

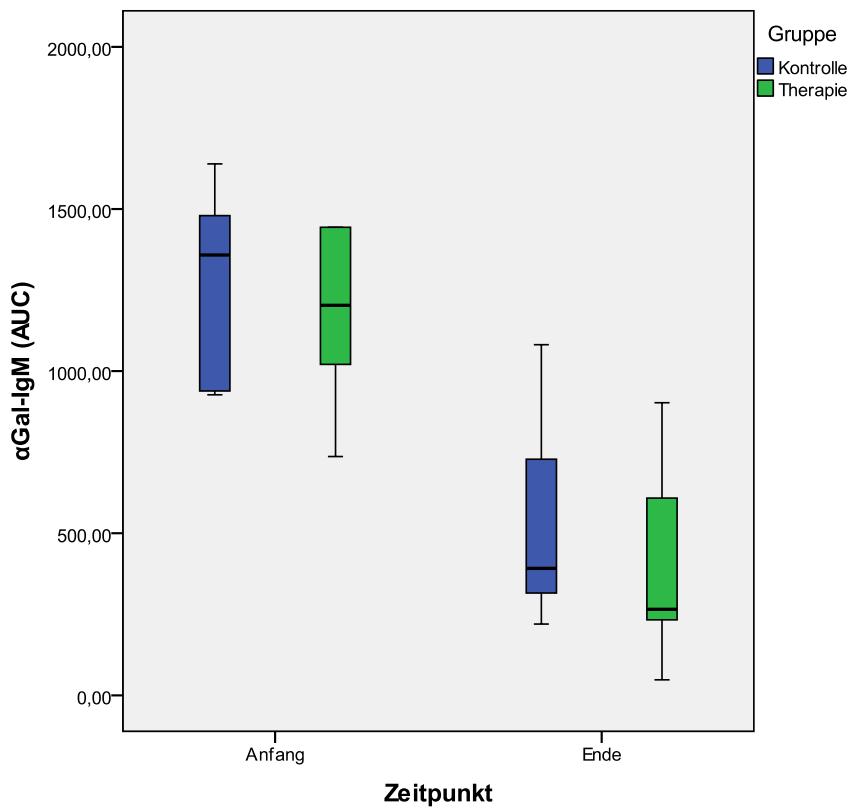


Abbildung 42: Mittelwerte mit Standardabweichung der Anti-Gal- α 1,3-Gal IgM Titer [AUC] im Serum der Kontroll- und Defibrotidegruppe am Anfang und Ende der Versuchsreihen

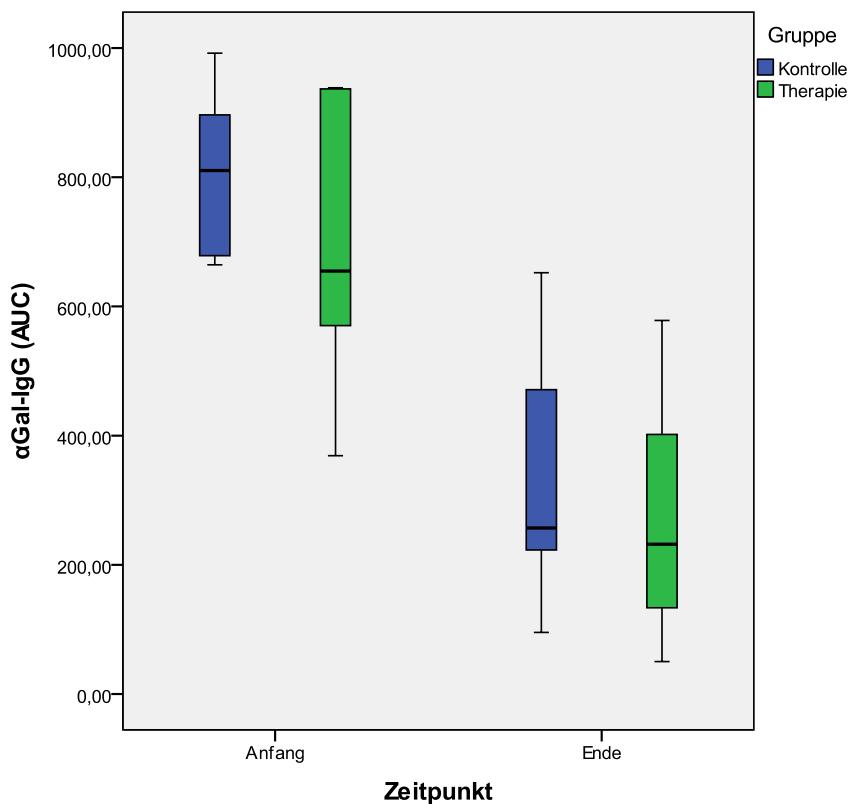


Abbildung 43: Mittelwerte mit Standardabweichung der Anti-Gal- α 1,3-Gal IgG Titer [AUC] im Serum der Kontroll- und Defibrotidegruppe am Anfang und Ende der Versuchsreihe

3.2.11 Herzgewicht

Um eine Gewichtszunahme durch ödematöse Veränderungen am Herzen zu erfassen wurden die Herzen am Anfang sowie am Ende der Perfusion gewogen.

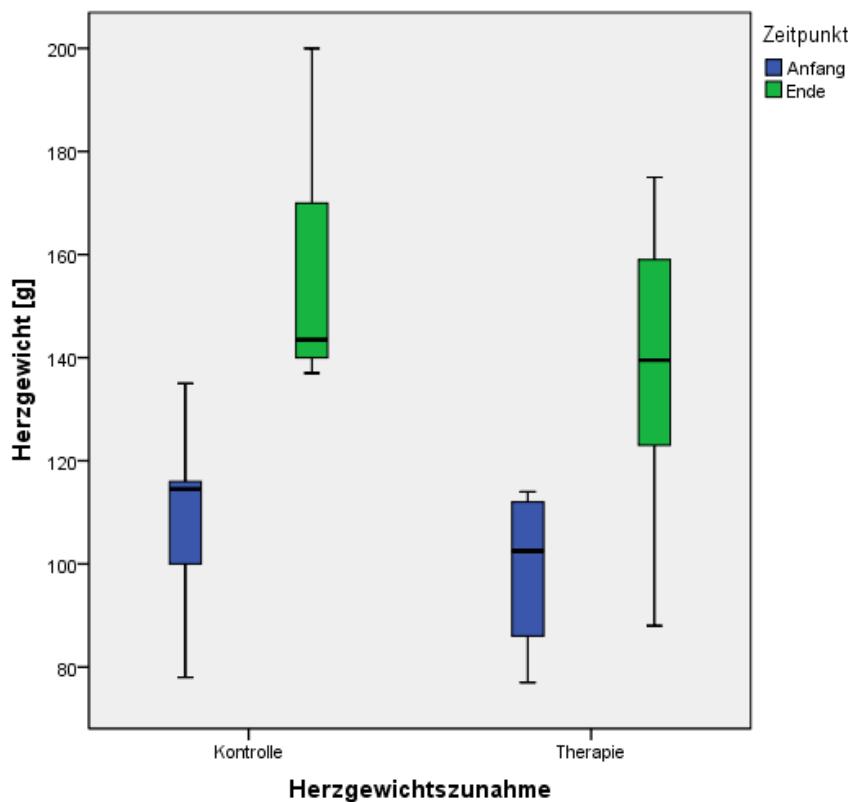


Abbildung 44: Herzgewichtszunahme in der Kontroll- und Defibrotidegruppe

Der Mittelwert der Herzgewichtszunahme in der Defibrotidegruppe betrug 38,4 g (43,5 %) mit einer Standardabweichung von 30,7 g. Der Mittelwert der Herzgewichtszunahme in der Kontrollgruppe betrug 46 g (40,2 %) mit einer Standardabweichung von 17,5 g. Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

3.3 Histopathologie

Die histologische Auswertung ergab mäßige bis hohe Abstoßungszeichen in beiden Gruppen. Ausgewertet wurden die Biopsien vor Perfusion als Ausgangswert gegenüber Veränderungen im Myokard nach Perfusion. Ödeme sowie Hämorrhagie wurden als Ausdruck einer hyperakuten bzw. humoralen Abstoßung interpretiert, wobei hierbei keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestanden. Mikroskopisch waren die Abstoßungszeichen in der Defibrotidegruppe teilweise pregnanter als in der Kontrollgruppe. Die Herzen der Defibrotidegruppe

82 Ergebnisse

zeigten in ausgeprägterem Maße Hämorrhagien, Endothelzellrupturen, myokardiale Ödeme und intravasale Thromben (siehe Abbildung 47). Ansonsten waren an den Präparaten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf Vermehrung von Neutrophilen, Nekrosen, Transplantatvaskulopathien oder zellulärer Abstoßung erkennbar. Immunhistochemisch waren bei beiden Gruppen in gleichem Maße Fibrin und IgM Ablagerungen auffindbar.

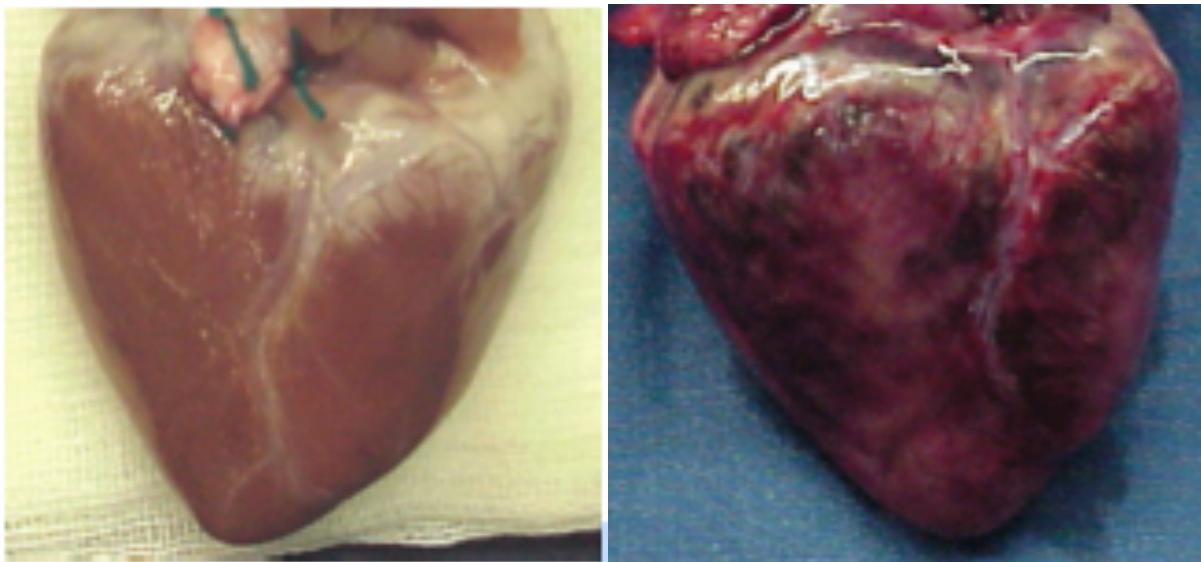


Abbildung 45: Herz von Pig13 (Beispiel eines Herzens mit den höchsten Abstoßungszeichen in der Defibrotidegruppe) vor und nach Perfusion

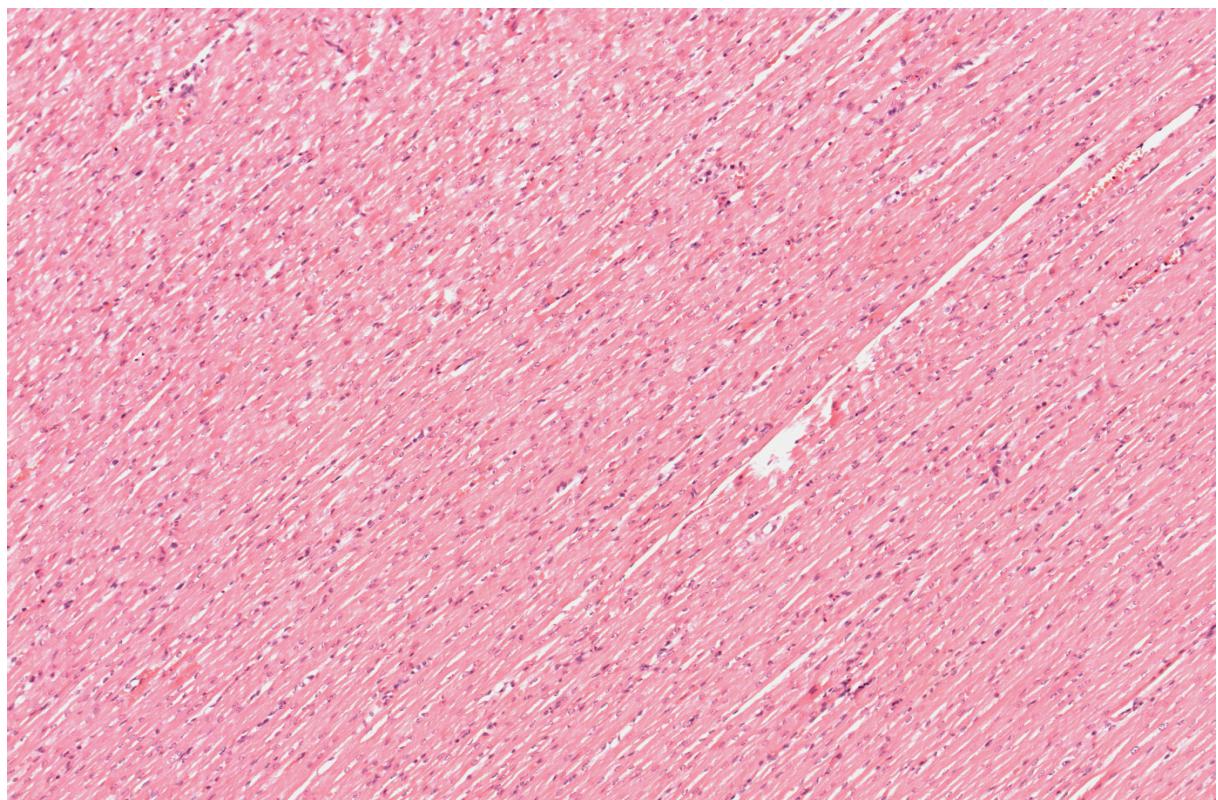


Abbildung 46: Mikroskopisches Bild des Herzgewebes von Pig20 (Beispiel eines Herzens mit den geringsten Abstoßungszeichen in der Kontrollgruppe) nach Perfusion

83 Ergebnisse

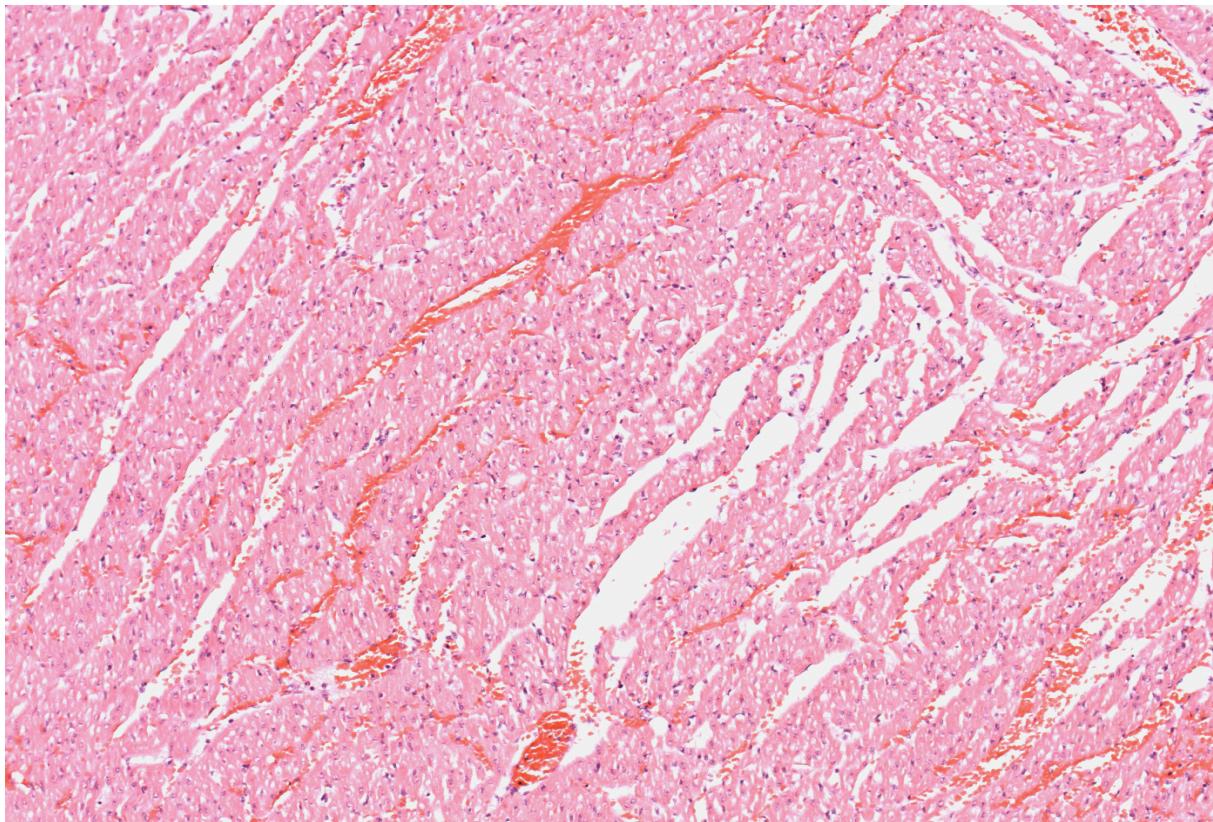


Abbildung 47: Mikroskopisches Bild des Herzgewebes von Pig25 (Beispiel eines Herzens mit den höchsten Abstoßungszeichen in der Defibrotidegruppe) nach Perfusion

4. Diskussion

4.1 Vor-und Nachteile des Perfusionssystems

Das verwendete Perfusionssystem erlaubt uns unter nahezu physiologischen Herzarbeitsbedingungen u.a. unter Vorlast- und Nachlastbedingungen verschiedene Parameter zu messen und die Versuche sind jederzeit reproduzierbar. Somit können neben Gewichtsveränderung, arteriovenöser Sauerstoffdifferenz, Komplementfaktoren (C3, C4) und myokardialen Schädigungsparametern wie CK-MB und LDH auch Hämodynamikparameter wie Herzzeitvolumen, Koronarfluß und Herzfrequenz bestimmt werden. Zudem ermöglicht es die Beeinflussung des Perfusionssystems zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Milieus.

Ein Nachteil ist dass keine anderen Organe in das System integriert sind. Somit muss die fehlende Nierenfunktion durch engmaschige Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts-Kontrollen ausgeglichen werden. Die fehlende Lungenfunktion muss durch Beeinflussung der O₂- und CO₂-Zufuhr reguliert werden. Die fehlende Entgiftungsfunktion der Leber ist jedoch schwer zu ersetzen, da die mechanische Filterung von Schadstoffen nicht dieselbe Effizienz hat.

Die integrierte Rollerpumpe kann in geringem Maße zur Zerstörung korpuskulärer Blutbestandteile führen (Otte, Steinbruchel et al. 1992).

Bei Befüllung des Schlauchsystems mit Perfusionssystem sollte prinzipiell auf die Entlüftung geachtet werden damit sich keine Gasbläschen in der Strombahn befinden, da diese wie bei einer Fremdkörperreaktion das Komplementsystem aktivieren und die Thrombozytenanlagerung fördern. Jedoch wird durch die zuvor vorgenommene Vollheparinisierung des Blutes dem entgegengesteuert. Ebenso vernachlässigbar ist die vermutete Komplementaktivierung und Thrombozytenaggregation durch den Kontakt von Blut mit der Oberfläche des Schlauchsystems, da das gesamte Schlauchsystem mit einer speziellen antithrombotischen Beschichtung überzogen ist. Diese verbessert die Blutkompatibilität der Vorrichtung und reduziert damit die Plättchenadhäsion auf den beschichteten Flächen. Zum Nachweis wurden im Rahmen der Vorversuche Leerperfusionen mit heparinisiertem Humanblut durchgeführt. Dabei konnte keine wesentlich messbare Aktivierung von CD41 per FACS Analyse festgestellt werden.

4.2 Kriterien für Blutspender

Die Kriterien für eine Spende waren männliches Geschlecht, Alter zwischen 20 und 30 Jahren, keine aktuelle oder kürzlich erfolgte Infektion oder Medikamenteneinnahme, keine chronischen Erkrankungen und keine Allergien. Ausschlaggebend für die Wahl der Kriterien waren v.a. die Studie von Buonomano 1999, der bei 100 weiblichen und 100 männlichen Probanden zeigen konnte, dass anti-Gal IgM Konzentration im Serum bei Frauen tendenziell höher waren als bei Männern und die Studie von Xu 1995, die zeigte dass nur Neugeborene bis zum ersten Lebensmonat keine anti-Pig IgM im Serum aufzeigten, diese jedoch ab dem zweiten Lebensmonat auf einem vergleichbaren Spiegel wie bei erwachsenen Personen sind.

Somit wurden die Kriterien für eine Blutspende korrekt gewählt um interindividuelle Unterschiede der Serumspiegel präformierter anti-Gal- α 1,3-Gal-Antikörper, bedingt durch Geschlecht oder fortgeschrittenes Alter, auszuschließen (Xu, Edwards et al. 1995; Buonomano, Tinguely et al. 1999).

4.3 Unterschiede in der Gerinnung bei allogener und xenogener Transplantation

Die Erforschung der Unterschiede der Gerinnungssysteme in der Xenotransplantation vor allem im Bezug auf deren Wirkung bei der hyperakuten und akut vaskulären Abstoßungsreaktion hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen (Platt 1996).

Bei der xenogenen Abstoßungsreaktion kann eine Gerinnungsaktivierung im Transplantat sowie im System beobachtet werden. Dabei wird die Endothelzellaktivierung durch Antikörper (AK) und das Komplementsystem initiiert und damit eine starke Koagulation im Gewebe bewirkt. Die physiologische Koagulation geht in ein prokoagulatorisches Milieu über mit Verlust der vaskulären Integrität sowie der Infiltration von Immunzellen.

Es gibt aber auch Beweise durch in-vitro und in-vivo Studien, dass Unterschiede zwischen den Gerinnungssystemen zweier Spezies wie Mensch und Schwein auch ohne Anwesenheit von AK zu einer thrombotischen Mikroangiopathie führen können, alleine durch den Kontakt von Schweineendothel mit humanen Thrombozyten und Monozyten (Schulte am Esch, Rogiers et al. 2001). Das porcine Endothel katalysiert die Umwandlung von humanen Prothrombin zu Thrombin, zudem reagieren humane

86 Diskussion

Thrombozyten direkt mit dem porcinen von-Willebrandt-Faktor (pvWF) ohne die vorherige Aktivierung des Glykoproteinrezeptor Ib (GPIb) (Robson, Cooper et al. 2000). GPIb ist in der humanen physiologischen Gerinnung der Adhäsionsrezeptor für den vWF, der wiederum das Bindeglied zwischen den Thrombozyten und dem subendothelialen Kollagen ist.

Der Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) ist der Inhibitor des gewebsspezifischen Plasminogenaktivators (t-PA), der das inaktive Plasminogen zu aktivem Plasmin umwandelt. Aktives Plasmin bindet an Fibrin und spaltet die vernetzten Fibrinpolymere in lösliche Fibrinabbauprodukte (Fibrinolyse, siehe Abbildung 48). Porciner PAI auf dem Endothel konnte im xenogenen Modell in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden (Fay, Murphy et al. 1996; Kalady, Lawson et al. 1998). Dadurch wird die Fibrinolyse gehemmt und das Aufkommen von thrombotischen Mikroangiopathien gefördert.

Es wird vermutet, dass porciner *tissue factor pathway inhibitor* (pTFPI) im xenogenen Modell nicht effizient die Aktivierung des humanen Faktor X durch Hemmung des Faktor VIIa/Tissue Factor Komplex vermindern kann (Kopp, Siegel et al. 1997; Cowan, Roussel et al. 2009). Porcines Thrombomodulin kann nicht effizient humanes Thrombin inhibieren weil es nicht effektiv an humanes Protein C binden kann (Roussel, Moran et al. 2008). Somit können wohl porcine Regulationsmoleküle des Gerinnungssystems das porcine Endothel nicht vor der Aktivierung des humanen Gerinnungssystems und ihren Folgen schützen (siehe Abbildung 49). Folglich kommt es zu einer Überreaktion im Xenotransplantat mit verstärkter Thrombosierung. Diese Vorschädigungen im Gewebe fördern immunogene Abstoßungsprozesse.

Strategien zur Reduktion dieser starken intravaskulären Koagulation z.B. durch Genom/DNA Modifizierung (Niemann and Kues 2000; Lai, Kolber-Simonds et al. 2002; Ramsoondar, Machaty et al. 2003) wären ein guter Ansatzpunkt um das Xenotransplantat vor einem prokoagulatorischen Milieu und thromboembolischer Mikroangiopathien zu schützen (Pierson, Dorling et al. 2009).

87 Diskussion

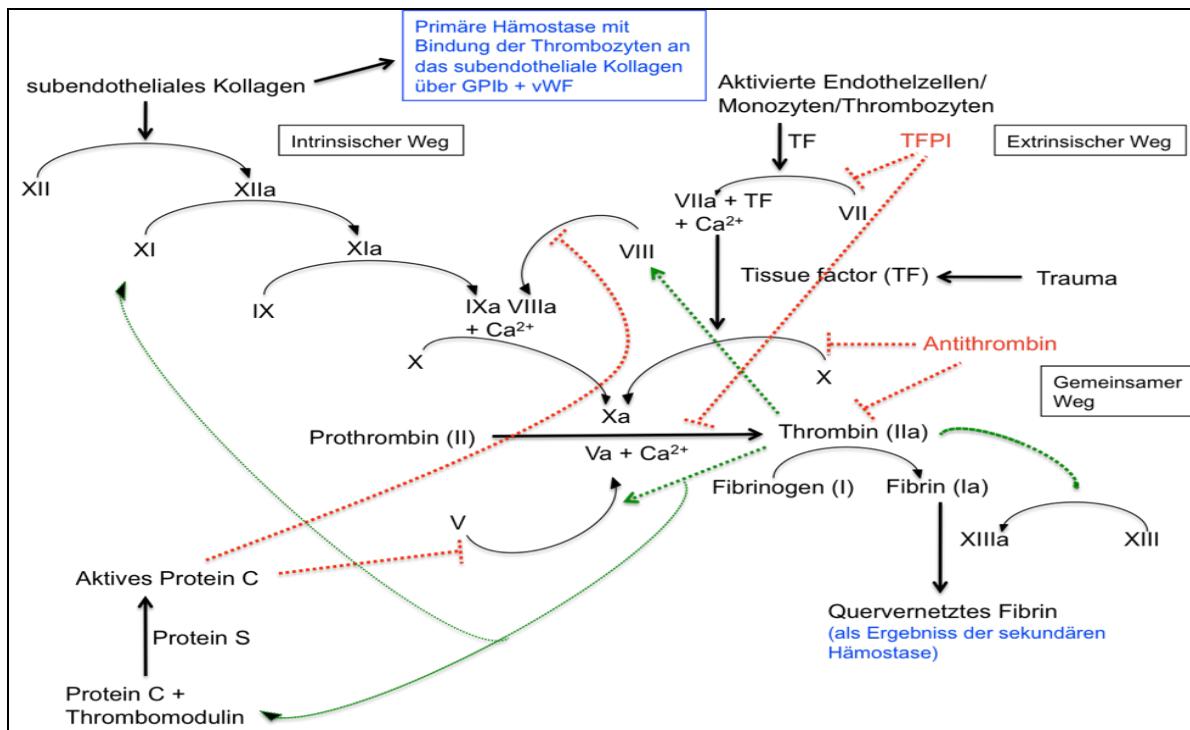


Abbildung 48: humanes physiologisches Gerinnungsmodell.

Thrombomodulin ist ein Oberflächenprotein der Endothelzellen. Es bringt zum einen Thrombin in einen antithrombotischen Zustand und aktiviert zum anderen Protein C das zusammen mit seinem Kofaktor Protein S den Gerinnungsfaktor Va proteolytisch spaltet und damit inaktiviert.

TFPI auf der Endothelzelloberfläche bindet und inaktiviert Faktor Xa. Des Weiteren bindet und inaktiviert der Komplex TFPI/Xa den Komplex TF/VIIa in der Initialphase der extrinsischen Gerinnungsaktivierung.

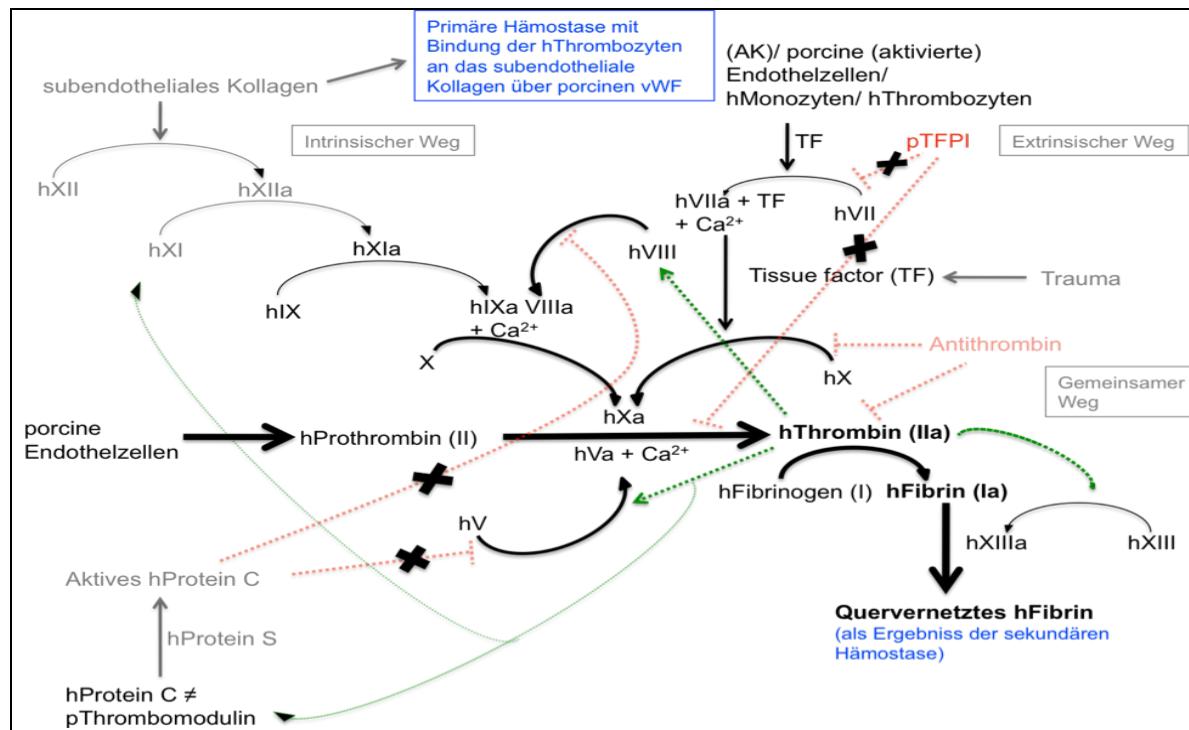


Abbildung 49: Xenogenes Gerinnungsmodell: porcines Endothel in Kontakt mit humanem Blut.

Porcines Thrombomodulin kann nicht in ausreichendem Masse humanes Protein C aktivieren (Lee, Salvaris et al. 2008) und bringt Thrombin nicht in einen antithrombotischen Zustand. (Lawson, Daniels et al. 1997; Siegel, Grey et al. 1997; Kopp, Grey et al. 1998; Roussel, Moran et al. 2008)

Porciner TFPI kann die Aktivierung von humanen Faktor X und VII nicht in ausreichendem Masse hemmen. (Kopp, Siegel et al. 1997; Robson, Cooper et al. 2000)

Porcine Endothelzellen können humanes Prothrombin direkt aktivieren. So entsteht Thrombin ohne Beteiligung weiterer plasmatischer Gerinnungsfaktoren. (Siegel, Grey et al. 1997; Morabito, Gentile et al. 2009)

Porciner vWF zeigt ein erhöhtes Potential humane Thrombozyten an das subendothiale Kollagen zu binden und damit spontan die Plättchenaggregation zu fördern ohne die vorherige Aktivierung des GPIb-Rezeptors. (Schulte am Esch, Cruz et al. 1997; Schulte am Esch, Rogiers et al. 2001; Schulte Am Esch, Robson et al. 2005)

Diesem Mechanismus kommt besondere Bedeutung zu, da der subendothelial gelegene vWF bei abstoßungsbedingter Endothelzellretraktion an die Oberfläche gerät und zu massiver Aggregation zirkulierender Thrombozyten noch vor Aktivierung des Gerinnungssystems führt.

Defibrotide stimuliert die Expression von humanem Thrombomodulin in den Endothelzellen der Gefäße und damit seine antithrombotische Wirkung (Guglielmelli, Bringhen et al.; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009). Es bleibt jedoch unklar ob Defibrotide porcines Thrombomodulin ebenso effektiv wie humanes stimulieren kann. Zudem kann porcines Thrombomodulin humanes Protein C nicht aktivieren (Lee, Salvaris et al. 2008), womit seine antithrombotische Wirkung wieder aufgehoben wird. Folglich ist der im humanen Modell getestete antithrombotische Effekt von Defibrotide nicht zwingend übertragbar auf das xenogene Modell. Das Ergebnis ähnelt einem Mangel an Thrombomodulin, der zu einer Thrombophilie mit Infarktneigung führt.

4.4 Bewertung der Ergebnisse

4.4.1 Gerinnung

In unseren Versuchen sank die Thrombozytenanzahl und Antithrombin III im Sinne einer Verbrauchskoagulopathie mit Nekrose und Hämolyse im Rahmen der Abstoßungsprozesse. Die Parameter verhielten sich in beiden Gruppen gleich, sodass geschlossen werden kann, dass Defibrotide hier keinen Einfluß nahm.

Zusätzlich war die Fibrinogenkonzentration in der Defibrotidegruppe niedriger als in der Kontrollgruppe, was auf den antiinflammatorischen und fibrinolyischen Effekt von Defibrotide zurück zu führen sein könnte (siehe Kapitel 1.5. & 3.2.4). Jedoch kann die Wirkung von Defibrotide in diesem Modell nicht voll ausgeschöpft werden da die PAI Level im porcinen Modell vermutlich zu hoch sind. Es konnte keine vermehrte Expression des Fibrinogenrezeptors CD41 beobachtet werden.

Die Wirkung von Defibrotide auf das Gerinnungssystem hat in unserem Modell jedoch nur eine eingeschränkte Aussagekraft, da zum einen eine Vollheparinisierung erfolgte und zum anderen das xenogene Modell eine maximale Aktivierung der Gerinnungsvorgänge hervorruft.

4.4.2 Endothelzellaktivierung, Gewebsschädigung und Hämodynamik

Es konnte ein signifikanter Anstieg von Prostazyklin und PGE₂ in der Defibrotidegruppe festgestellt werden. Die folglich vermehrte Vasodilatation, teilweise zu erkennen am sinkenden Koronarwiderstand (CR v.a. zum Zeitpunkt 4 und 5, siehe Abbildung 17), hatte eine gesteigerte Durchblutung der Koronargefäße und des Herzmuskels (CBFI und CBF) zur Folge.

Parallel zur beobachteten Freisetzung von Prostaglandinen stiegen in der Defibrotidegruppe sowohl CK-MB als auch LDH bereits kurze Zeit nach Beginn der Perfusion signifikanter an als in der Kontrollgruppe. Die, vermutlich durch die Vasodilatation mitbedingte, erhöhte Permeabilität des Endothels führte am ehesten zur Entstehung von interstitiellen Ödemen (siehe Kapitel 3.3. Histopathologie), Thrombosen und der Extravasation von zellulären Bestandteilen sowie Makromolekülen (Saadi, Holzknecht et al. 1995; Saadi and Platt 1995). Dies ermöglichte wahrscheinlich die Bindung präformierter AK an die Zellmembran der Kardiomyozyten mit folgender kardiomyozytärer Schädigung. Eine weitere Hypothese wäre, dass die vermehrte Vasodilatation in der Defibrotidegruppe und die dadurch erhöhte Perfusion im Gewebe auch vermehrt freie Radikale einschwemmt,

die eine vermehrte myozytäre Schädigung mitbedingen könnten. Die Pumpfunktion der Schweineherzen ließ im Verlauf der Versuche in beiden Gruppen nach. Dies ist am tendenziellen Abfall des Schlag-Arbeits-Index (SWI) in beiden Gruppen zu erkennen. Zur gleichen Zeit sanken die Werte für das systemische Herzzeitvolumen (ABF), der Cardiac Output (CO) als Maß für die Auswurfleistung des Herzen, die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ($dP/dt \max$) als Index der myokardialen Kontraktilität, das Schlagvolumen (SV) als Maß einer adäquaten Kammerfüllung und der Schlagvolumenindex (SVI). Der Kalium-Wert (K^+) stieg in beiden Gruppen, trotz suffizienter Insulin- und Glucosegabe, als Zeichen des Zelluntergangs an.

Die Sauerstoffsättigungen (SaO_2) im arteriellen und venösen Blut näherten sich am Ende der Perfusion an. Ebenso nahm in beiden Gruppen die arterio-venöse Sauerstoffdifferenz ($C(a-v)O_2$) stetig ab. Die Abnahme ist auf eine Änderung der Stoffwechsellage im Myokard von aerob zu anaerob und der damit verbundenen geringeren Ausschöpfung des Sauerstoffangebots zurückzuführen. Bei vermehrter Ischämie wird das Myokard durch die anaerobe Stoffwechsellage zunehmend azidotisch.

Es wäre denkbar, dass der signifikante Herzfrequenzanstieg (HR) in der Defibotidegruppe aufgrund einer erhöhten Perfusion des Herzmuskels nach Vasodilatation und dadurch bedingt eine erhöhte Kontraktilität zustande kam.

4.4.3 Immunologie

Die CD11b Werte waren anfangs in der Kontrollgruppe höher als in der Defibotidegruppe. Ein möglicher Grund könnte die dem Defibotide zugesagte Wirkung die Leukotrien B4-Spiegel zu reduzieren sein. Dies würde die Anlockung von Leukozyten vermindern. Jedoch kann diese Theorie nicht belegt werden da die Leukotrien B4 Level in unsere Arbeit nicht bestimmt wurden. Die Kurven näherten sich gegen Ende der Versuchsreihe wieder an, weswegen sich die Entzündungsreaktion in beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Die Abnahme der Anzahl an weißen Blutkörperchen (WBC) konnte in beiden Gruppen in gleichem Maße beobachtet werden. Das während einer Entzündungsreaktion beobachtete „Rolling and Homing“ von naiven Lymphozyten und Leukozyten wurde anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD62L charakterisiert. CD62L wird aber nur am

Anfang einer Entzündung exprimiert was den Anstieg der Werte nach ca. 60 Minuten und den darauf folgenden Abstieg erklären könnte.

Die C3- und C4-Werte blieben in der Defibrotidegruppe auf einem stabilen Niveau. In der Kontrollgruppe befanden sie sich anfangs auf dem gleichen Niveau, nahmen aber nach ca. 60 Minuten Perfusionszeit geringfügig ab. Dies lässt einen geringgradigeren Komplementverbrauch in der Defibrotidegruppe durch den antiinflammatorischen Effekt von Defibrotide vermuten, kann jedoch in diesem Modell nicht signifikant vorgezeigt werden.

4.4.4 Herzgewicht

Die mittlere Gewichtszunahme der Schweineherzen in der Defibrotidegruppe war mit 43,5 % geringgradig höher als in der Kontrollgruppe mit 40,2 %, jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Diese Beobachtung sind vereinbar mit den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchungen.

4.4.5 Histopathologie

Zur Demonstration wurden in dieser Arbeit zwei Bilder verwendet die beispielhaft zeigten, dass es in der Kontrollgruppe Schweineherzen mit geringen Abstoßungszeichen (Pig20) und in der Defibrotidegruppe Herzen mit starken Abstoßungszeichen (Pig25) gab. Die histopathologische Beurteilung ergab eine geringe Tendenz zu mehr ödematösen Einlagerungen, Hämorrhagien, intravasalen Thromben und Endothelzellrupturen in der Defibrotidegruppe. In der Gesamtschau war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Defibrotidegruppe feststellbar, da es histologische Schnitte von Schweineherzen mit mäßigen sowie auch starken Abstoßungszeichen in beiden Gruppen gab.

Es könnte höchstens die Vermutung gestellt werden, dass unter Defibrotidetherapie ödematöse Einlagerungen und Hämorrhagien bevorzugt auftreten.

4.5 Bewertung der Wirkung von Defibrotide

Das Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass Defibrotide den Ischämie-Reperfusionsschaden vermindert indem es durch seine zugesagte antiischämische, pro-fibrinolytische und antithrombotische Wirkung das Entstehen von Mikrothromben reduziert und durch Vasodilatation die im Gewebe entstehende Minderdurchblutung verbessert.

92 Diskussion

Jedoch kann porcines Thrombomodulin humanes Protein C nicht in ausreichendem Maße aktivieren und bringt somit Thrombin nicht in einen antithrombotischen Zustand (Lawson, Daniels et al. 1997; Siegel, Grey et al. 1997; Kopp, Grey et al. 1998). Damit kann behauptet werden, dass Defibrotide mit der Stimulation der Expression von Thrombomodulin in der Allotransplantation einen Unterschied bewirkt, jedoch nicht in der Xenotransplantation. Ob Defibrotide die Fibrinolyse durch Erhöhung der t-PA Aktivität und Reduktion der PAI Level stimulieren kann steht nicht sicher fest. Porciner PAI konnte in mehreren Arbeiten auf dem Endothel in höheren Konzentrationen als in allogenen Modellen nachgewiesen werden (Fay, Murphy et al. 1996; Kalady, Lawson et al. 1998), sodass es fraglich bleibt ob Defibrotide die PAI Level in ausreichendem Maße reduzieren kann.

Die Prostaglandinspiegelerhöhung als Hauptwirkmechanismus von Defibrotide verbessert zwar die hämodynamischen Parameter CBF und CBFI durch Vasodilatation und senkt den CR, jedoch erhöhen Prostaglandine auch die Gefäßpermeabilität und damit eine Ödembildung im Gewebe. Diese konnte an den Herzen der Defibrotidegruppe zumindest histologisch tendenziell vermehrt beobachtet werden. Durch die Ödeme im Gewebe kann es vermehrt zu Ischämien im Transplantat kommen. Gleichzeitig kann es durch die vermehrte Durchblutung bei Vasodilatation in Kombination mit der erhöhten Gefäßpermeabilität zu Hämorrhagien im Gewebe kommen. Somit ergibt sich nach anfänglich verbesserter Durchblutung des Transplantats das Bild einer starken Abstoßungsreaktion mit ischämischen und hämorrhagischen Infarktgebieten.

Defibrotide wurde bisher erfolgreich in der Allotransplantation eingesetzt z.B. zur Prävention des hepatischen Venenokklusionssyndroms nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (Zhang, Wang et al.), jedoch gibt es bisher keine Daten für eine erfolgreiche Anwendung in der Xenotransplantation.

5. Zusammenfassung

Die Xenotransplantation würde eine gute Alternative zur Allotransplantation und zum künstlichen Organersatz bieten, sie wirft jedoch immer noch zahlreiche medizinische Probleme auf, wie unter anderem eine starke immunologische Abstoßungsreaktion und damit verbunden einen hohen, nicht tolerablen Bedarf an immunsuppressiven Substanzen um die Abstoßungreaktion zu unterdrücken. Es ist somit noch nicht absehbar, wann sie letztendlich klinisch anwendbar sein wird.

Unsere Versuche hatten zum Ziel den Ischämie-Reperfusionschaden zu minimieren, um damit eine primäre Transplantatdysfunktion zu vermindern. Dies sollte erreicht werden durch die Anwendung von Defibrotide, einem Medikament dem eine antiischämische, antithrombotische und pro-fibrinolytische Wirkung zugesagt wird.

Um die Wirkung von Defibrotide zu erforschen wurden 12 native, nicht genetisch veränderte Schweineherzen verwendet. Diese wurden in einem Perfusionsmodell mit humanem Blut perfundiert, jeweils mit und ohne Zugabe von Defibrotide und ohne die Zugabe von immunsuppressiven Substanzen.

Durch den Versuchsaufbau wurde die gleiche Ausgangssituation für beide Gruppen geschaffen. Die immunologische Bürde gemessen an APA und Anti-Gal-Anitörper war ebenso in beiden Gruppen gleichwertig und damit die Wahrscheinlichkeit für eine xenogene hyperakute Abstoßung.

Die Ergebnisse zeigten, dass die kardiale Funktion in der Kontroll- (n=6) sowie in der Defibrotidegruppe (n=6) während der gesamten Versuchsdauer von 180 min aufrecht erhalten werden konnte. Trotzdem kam es zu signifikant höheren Myokardläsionsparametern in der Defibrotidegruppe bei vergleichbaren Herzfunktionsparametern und die histopathologische Auswertung ergab mikroskopisch tendenziell mehr Abstoßungszeichen in der Defibrotidegruppe als in der Kontrollgruppe mit Hämorrhagien, Endothelzellrupturen, myokardialen Ödemen und intravasalen Thromben.

Die Prostaglandinspiegelerhöhung (Prostazyklin [Z 5-8]: F=0,01 und PGE₂: F=0,001; p<0,05) ist einer der Wirkmechanismen von Defibrotide und konnte in unseren Versuchen signifikant nachgewiesen werden. Durch diesen Effekt kam es in der Defibrotidegruppe vermutlich zu einer vermehrten Durchblutung der Koronargefäße und damit des Herzmuskels (CBF und CBFI) und teilweise zu einem geringeren Widerstand in den Koronargefäßen (CR), jedoch ohne signifikanten Unterschied zur

94 Zusammenfassung

Kontrollgruppe. Hohe Prostaglandinlevel können jedoch auch die Gefäßpermeabilität in einigen Teilen des Koronargefäßbettes erhöhen und damit eine Ödembildung fördern, die an den Herzen der Defibrotidegruppe histopathologisch tendenziell vermehrt beobachtet werden konnte. Die Ödembildung im Gewebe könnte vermehrt zu Ischämiegebieten im Transplantat geführt haben. Außerdem wurde in der Defibrotidegruppe ein signifikanter Anstieg von CK-MB ($F<0,001$) und LDH ($F=0,003$) und damit eine starke kardiomyozytäre Schädigung festgestellt. Jedoch konnte in unseren Versuchen kein signifikanter Einfluß auf die Pumpfunktion in diesem Zusammenhang gemessen werden, da der Schlag-Arbeits-Index (SWI) in beiden Gruppen tendenziell in gleichem Maße abfiel.

Die Reduktion der Leukotrien B₄-Spiegel ist theoretisch ein Bestandteil der zugesagten antiinflammatorischen Wirkungen von Defibrotide. Die durch Defibrotide bewirkte Erhöhung der Prostaglandinspiegel könnte eine Hemmung des Lipooxygenaseabbauwegs der Arachidonsäure in Richtung Leukotrien B₄ bewirken (Guglielmelli, Bringhen et al. 2012; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009; Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME 2013). Defibrotide soll durch die Stimulation der Thrombomodulinexpression in den Endothelzellen der Gefäße antithrombotisch wirken (Guglielmelli, Bringhen et al.; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009). Jedoch kann porcines Thrombomodulin nicht effizient humanes Thrombin inhibieren weil es nicht effektiv humanes Protein C binden kann (Roussel, Moran et al. 2008; Lee, Salvaris et al. 2008). Somit können porcine Regulationsmoleküle des Gerinnungssystems das porcine Endothel nicht vor der Aktivierung des humanen Gerinnungssystems und ihren Folgen schützen. Folglich dürfte es zu einer Überreaktion im Xenotransplantat mit verstärkter Thrombosierung gekommen sein. Solch eine Vorschädigung im Gewebe könnte immunologische Abstoßungsprozesse fördern. Folglich ist der im humanen Modell getestete antithrombotische Effekt von Defibrotide nicht zwingend übertragbar auf das xenogene Modell. Das Ergebnis ähnelte einem Mangel an Thrombomodulin, der zu einer Thrombophilie mit Infarktneigung führt.

Defibrotide soll beim Menschen pro-fibrinolytisch durch die Erhöhung der t-PA und TFPI Aktivität und Reduktion der PAI-Spiegel wirken (Guglielmelli, Bringhen et al.; Larocca, Cavallo et al. 2008; Morabito, Gentile et al. 2009). Unter physiologischen Bedingungen laufen Gerinnung und Fibrinolyse gleichzeitig ab. Der Abbau des Fibrinnetzwerkes erfolgt durch Plasmin. Der Vorläufer des Plasmins ist Plasminogen,

95 Zusammenfassung

das durch t-PA (tissue-Plasminogenaktivator) in die aktive Form umgewandelt wird. Der Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) ist der Inhibitor des gewebsspezifischen Plasminogenaktivators (t-PA). Dadurch wird die Fibrinolyse gehemmt und das Aufkommen von thrombotischen Mikroangiopathien gefördert. Porciner PAI konnte in Studien mit xenogenen Modellen in höheren Konzentrationen auf dem Endothel nachgewiesen werden (Fay, Murphy et al. 1996; Kalady, Lawson et al. 1998), wodurch der pro-fibrinolytische Effekt von Defibrotide im porcinen Modell beeinträchtigt sein könnte.

TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) reguliert die Produktion von Thrombin (Faktor IIa) indem es reversibel die Aktivierung von Faktor VII durch Tissue factor und damit die Aktivierung von Faktor X hemmt. Es wird vermutet, dass porciner *tissue factor pathway inhibitor* (pTFPI) im xenogenen Modell nicht effizient die Aktivierung des humanen Faktor X durch Hemmung des Faktor VIIa/Tissue Factor-Komplex vermindern kann (Kopp, Siegel et al. 1997; Cowan, Roussel et al. 2009).

Somit ergab sich vermutlich nach anfänglich besserer Durchblutung des Transplantats bei Defibrotidgabe, mit regelrechten häodynamischen Parametern, das Bild einer starken Abstoßungsreaktion mit ischämischen und hämorrhagisch-thrombotischen Infarktgebieten, was histopathologisch an den Herzen der Defibrotidegruppe tendenziell vermehrt beobachtet werden konnte.

Die vorliegenden Daten lassen somit den Schluss zu, dass Defibrotide trotz seiner zugesagten antithrombotischen, pro-fibrinolytischen und antiischämischen Wirkung keinen positiven Effekt auf Myokardläsionen und Abstoßungsreaktion im Schweineherzen bei Perfusion mit humanem Blut vorzeigen kann und damit nicht protektiv auf das Xenotransplantat wirkt.

Es muss jedoch bedacht werden, dass das xenogen Modell mit seiner starken inflammatorischen Reaktion und der mechanischen Beanspruchung ohne Hinzugabe von Immunsuppressiva oder Verwendung transgener Schweineherzen ein zu extremes Modell darstellt. Dadurch konnten möglicherweise die erhofften positiven Effekte von Defibrotide nicht aufgezeigt werden.

Die Wirkung von Defibrotide als Adjuvans sollte noch in weiteren Studien eventuell in Kombination mit immunsupprimierenden Substanzen und transgenen Schweineherzen erforscht werden.

6. Literaturverzeichnis

Albrecht-Kupper, B. E., K. Leineweber, et al. (2011) "Partial adenosine A1 receptor agonists for cardiovascular therapies." Purinergic Signal **8** (Suppl 1): 91-9.

Allan, J. S. (1996). "Xenotransplantation and Possible Emerging Infectious Diseases." Mol Diagn **1**(3): 209-217.

Allan, J. S. (1996). "Xenotransplantation at a crossroads: prevention versus progress." Nat Med **2**(1): 18-21.

Asaoka, H. and H. Matsuda (1994). "Detection of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoproteins from various animal erythrocytes by chicken monoclonal antibody against Hanganutziu-Deicher antigens." J Vet Med Sci **56**(2): 375-7.

Bailey, L. L., S. L. Nehlsen-Cannarella, et al. (1985). "Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate." JAMA **254**(23): 3321-9.

Barnard, C. N. (1967). "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.

Barnard, C. N., A. Wolpowitz, et al. (1977). "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.

Blakely, M. L., W. J. Van der Werf, et al. (1994). "Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection." Transplantation **58**(10): 1059-66.

Blakely, M. L., W. J. Van der Werf, et al. (1994). "Anti-B cell agents: suppression of natural antibodies and prolongation of survival in discordant xenografts." Transplant Proc **26**(3): 1374-5.

97 Literaturverzeichnis

Bolli, R. and E. Marban (1999). "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning." Physiol Rev **79**(2): 609-34.

Brass, C. A., J. Narciso, et al. (1991). "Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver. Regulation and pathophysiologic significance." J Clin Invest **87**(2): 424-31.

Braunwald, E. and R. A. Kloner (1982). "The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction." Circulation **66**(6): 1146-9.

Brenner, P., M. Hinz, et al. (1999). "Effects of prolonged cold storage time in xenotransplantation." J Heart Lung Transplant **18**(12): 1211-7.

Brenner, P., M. Hinz, et al. (1999). "The influence of antibody and complement removal with a Ig-Therasorb column in a xenogeneic working heart model." Eur J Cardiothorac Surg **15**(5): 672-9.

Brenner, P., M. Hinz, et al. (2000). "Influence of ischemic time on hyperacute xenograft rejection of pig hearts in a working heart perfusion model with human blood." Transpl Int **13 Suppl 1**: S494-503.

Buonomano, R., C. Tinguely, et al. (1999). "Quantitation and characterization of anti-Galalpha1-3Gal antibodies in sera of 200 healthy persons." Xenotransplantation **6**(3): 173-80.

Calne, R. Y. (1970). "Organ transplantation between widely disparate species." Transplant Proc **2**(4): 550-6.

Carrel (1907). "The surgery of blood vessels." Bull John Hopkins Hosp.

Chandrasekera, P. C., V. J. McIntosh, et al. (2010) "Differential effects of adenosine A2a and A2b receptors on cardiac contractility." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(6): H2082-9.

Chapman, L. E. (2009). "Xenotransplantation, xenogeneic infections, biotechnology, and public health." Mt Sinai J Med **76**(5): 435-41.

Chapman, L. E., T. M. Folks, et al. (1995). "Xenotransplantation and xenogeneic infections." N Engl J Med **333**(22): 1498-501.

Chapman, L. E., W. Heneine, et al. (1999). "Xenotransplantation: the potential for xenogeneic infections." Transplant Proc **31**(1-2): 909-10.

Cooper, D. K., E. Koren, et al. (1994). "Oligosaccharides and discordant xenotransplantation." Immunol Rev **141**: 31-58.

Corbacioglu, S., N. Kernan, et al. (2012) "Defibrotide for the treatment of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation." Expert Rev Hematol **5**(3): 291-302.

Cowan, P. J., J. C. Roussel, et al. (2009). "The vascular and coagulation issues in xenotransplantation." Curr Opin Organ Transplant **14**(2): 161-7.

Cozzi, E. and E. Ancona (2003). "Xenotransplantation, where do we stand?" J Nephrol **16 Suppl 7**: S16-21.

Cozzi, E., C. Vial, et al. (2003). "Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts." Xenotransplantation **10**(4): 300-10.

Cozzi, E. and D. J. White (1995). "The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans." Nat Med **1**(9): 964-6.

Czaplicki, J., B. Blonska, et al. (1992). "The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human." J Heart Lung Transplant **11**(2 Pt 1): 393-7.

Dalmasso, A. P. (1992). "The complement system in xenotransplantation." Immunopharmacology **24**(2): 149-60.

Dalmasso, A. P., G. M. Vercellotti, et al. (1992). "Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients." Am J Pathol **140**(5): 1157-66.

Dausset, J. and J. Colombani (1959). "The serology and the prognosis of 128 cases of autoimmune hemolytic anemia." Blood **14**: 1280-301.

Dausset, J., R. L. Walford, et al. (1969). "The HL-A system sub-loci and their importance in transplantation." Transplant Proc **1**(1): 331-8.

Day, J. D., B. K. Rayburn, et al. (1995). "Cardiac allograft vasculopathy: the central pathogenetic role of ischemia-induced endothelial cell injury." J Heart Lung Transplant **14**(6 Pt 2): S142-9.

Denner, J., H. J. Schuurman, et al. (2009). "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.

Deschamps, J. Y., F. A. Roux, et al. (2005). "History of xenotransplantation." Xenotransplantation **12**(2): 91-109.

Dorling, A., R. Binns, et al. (1996). "Direct human T-cell anti-pig xenoresponses are vigorous but significantly weaker than direct alloresponses." Transplant Proc **28**(2): 653.

Dorling, A., R. Binns, et al. (1996). "Significant primary indirect human T-cell anti-pig xenoresponses observed using immature porcine dendritic cells and SLA-class II-negative endothelial cells." Transplant Proc **28**(2): 654.

100 Literaturverzeichnis

Dorling, A., G. Lombardi, et al. (1996). "Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population." Eur J Immunol **26**(6): 1378-87.

Duran, W. N. (2008). "The double-edge sword of TNF-alpha in ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(6): H2221-2.

Ekser, B., B. Gridelli, et al. (2009). "Pig liver xenotransplantation as a bridge to allotransplantation: which patients might benefit?" Transplantation **88**(9): 1041-9.

Ekser, B., P. Rigotti, et al. (2009). "Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model." Transpl Immunol **21**(2): 87-92.

Entstehungsweg der Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene aus Arachidonsäure (Biochmie und Pathobiochemie; Löffler G., 7. Auflage, Springer-Verlag, 2002)

Erland Ermann, Klinische Kardiologie, 6. Auflage, Springer Verlag, 2005

Eurotransplant Statistics (www.dso.de, www.organspende-info.de)

Fay, W. P., J. G. Murphy, et al. (1996). "High concentrations of active plasminogen activator inhibitor-1 in porcine coronary artery thrombi." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(10): 1277-84.

Ferdinandy, P., R. Schulz, et al. (2007). "Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning." Pharmacol Rev **59**(4): 418-58.

First WHO Global Consultation on Regulatory Requirements for Xenotransplantation Clinical Trials. Changsha, China 19-21 Nov 2008

Fischer, S., D. Renz, et al. (1999). "Hypothermia abolishes hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells." Brain Res Mol Brain Res **74**(1-2): 135-44.

Forty, J., D. G. White, et al. (1993). "A technique for perfusion of an isolated working heart to investigate hyperacute discordant xenograft rejection." J Thorac Cardiovasc Surg **106**(2): 308-16.

Galili, U. (2001). "The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation." Biochimie **83**(7): 557-63.

Galili, U. (2006). "Xenotransplantation and ABO incompatible transplantation: the similarities they share." Transfus Apher Sci **35**(1): 45-58.

Galili, U., R. E. Mandrell, et al. (1988). "Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora." Infect Immun **56**(7): 1730-7.

Galili, U., S. B. Shohet, et al. (1988). "Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells." J Biol Chem **263**(33): 17755-62.

Goddard, M. J., J. J. Dunning, et al. (2001). "Histopathology of rejection in the pig-to-primate cardiac xenograft model." J Heart Lung Transplant **20**(2): 216.

Good, A. H., D. K. Cooper, et al. (1992). "Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans." Transplant Proc **24**(2): 559-62.

Goodman, D. J., M. von Albertini, et al. (1996). "Human natural killer cells induce expression of E-selectin and interleukin-8 mRNA in porcine endothelial cells." Transplant Proc **28**(2): 609.

Goodman, D. J., M. Von Albertini, et al. (1996). "Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells." Transplantation **61**(5): 763-71.

Groetzner, J., I. Kaczmarek, et al. (2004). "Renal recovery after conversion to a calcineurin inhibitor-free immunosuppression in late cardiac transplant recipients." Eur J Cardiothorac Surg **25**(3): 333-41.

Gryglewski, R. J., E. Marcinkiewicz, et al. (1989). "Prostacyclin and the mechanism of action of defibrotide." Eicosanoids **2**(3): 163-7.

Guglielmelli, T., S. Bringhen, et al. (2012). "Update on the use of defibrotide." Expert Opin Biol Ther **12**(3): 353-61.

Haddix, T. L., T. H. Pohlman, et al. (1996). "Hypothermia inhibits human E-selectin transcription." J Surg Res **64**(2): 176-83.

Halestrap, A. P., S. J. Clarke, et al. (2004). "Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection." Cardiovasc Res **61**(3): 372-85.

Hammer, C., R. Linke, et al. (1998). "Organs from animals for man." Int Arch Allergy Immunol **116**(1): 5-21.

Hardy, J. D., S. Eraslan, et al. (1963). "Re-implantation and homotransplantation of the lung: laboratory studies and clinical potential." Ann Surg **157**: 707-18.

Hardy, J. D., F. D. Kurrus, et al. (1964). "Heart Transplantation in Man. Developmental Studies and Report of a Case." JAMA **188**: 1132-40.

Hardy, J. D., W. R. Webb, et al. (1963). "Lung Homotransplantation in Man." JAMA **186**: 1065-74.

Hausenloy, D. J. and D. M. Yellon (2004). "New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway." Cardiovasc Res **61**(3): 448-60.

Hernandez, L. A., M. B. Grisham, et al. (1987). "Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury." Am J Physiol **253**(3 Pt 2): H699-703.

Hohlfeld, T., H. Strobach, et al. (1993). "Stimulation of endogenous prostacyclin protects the reperfused pig myocardium from ischemic injury." J Pharmacol Exp Ther **264**(1): 397-405.

Hoppe JD, Sewing KF: Stellungnahme des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer zur Xenotransplantation; Dtsch Arztbl 1999, 28 – 29: A-1920 – A-1926

Ibrahim, Z., J. Busch, et al. (2006). "Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems." Xenotransplantation **13**(6): 488-99.

Itescu, S., P. Kwiatkowski, et al. (2000). "Transendothelial migration and infiltration of porcine xenografts by primate monocytes requires natural killer cell-dependent activation." Transplant Proc **32**(5): 1083.

Itescu, S., P. Kwiatkowski, et al. (1998). "Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period." Hum Immunol **59**(5): 275-86.

Itescu, S., T. C. Tung, et al. (1998). "Preformed IgG antibodies against major histocompatibility complex class II antigens are major risk factors for high-grade cellular rejection in recipients of heart transplantation." Circulation **98**(8): 786-93.

Itescu, S., T. C. Tung, et al. (1998). "An immunological algorithm to predict risk of high-grade rejection in cardiac transplant recipients." Lancet **352**(9124): 263-70.

Ito, H. (2006). "No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3**(9): 499-506.

Iverson, W. O. and T. Talbot (1998). "Definition of a production specification for xenotransplantation. A European perspective." Ann N Y Acad Sci **862**: 121-4.

Jahania, M. S., J. A. Sanchez, et al. (1999). "Heart preservation for transplantation: principles and strategies." Ann Thorac Surg **68**(5): 1983-7.

Johnson, M., T. Haddix, et al. (1995). "Hypothermia reversibly inhibits endothelial cell expression of E-selectin and tissue factor." J Card Surg **10**(4 Suppl): 428-35.

Jones, T. (2001). "The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on chronic allograft rejection." Expert Opin Emerg Drugs **6**(1): 95-109.

Kalady, M. F., J. H. Lawson, et al. (1998). "Decreased fibrinolytic activity in porcine-to-primate cardiac xenotransplantation." Mol Med **4**(9): 629-37.

Kopp, C. W., S. T. Grey, et al. (1998). "Expression of human thrombomodulin cofactor activity in porcine endothelial cells." Transplantation **66**(2): 244-51.

Kopp, C. W., J. B. Siegel, et al. (1997). "Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors." Transplantation **63**(5): 749-58.

Kornblum, N., K. Ayyanar, et al. (2006). "Defibrotide, a polydisperse mixture of single-stranded phosphodiester oligonucleotides with lifesaving activity in severe hepatic veno-occlusive disease: clinical outcomes and potential mechanisms of action." Oligonucleotides **16**(1): 105-14.

Lai, L., D. Kolber-Simonds, et al. (2002). "Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning." Science **295**(5557): 1089-92.

Land W, Meemer K. The impact of ischemia/reperfusion injury on specific and non-specific early and late chronic events after organ transplantation. Transplant Rev **10** (1996), 108-127

105 Literaturverzeichnis

Larocca, A., F. Cavallo, et al. (2008). "Defibrotide: a review on clinical use and future development." Expert Opin Biol Ther **8**(8): 1201-12.

Lawson, J. H., L. J. Daniels, et al. (1997). "The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation." Transplant Proc **29**(1-2): 884-5.

Lawson, J. H. and J. L. Platt (1996). "Molecular barriers to xenotransplantation." Transplantation **62**(3): 303-10.

Lee, K. F., E. J. Salvaris, et al. (2008). "Recombinant pig TFPI efficiently regulates human tissue factor pathways." Xenotransplantation **15**(3): 191-7.

Lillehei, R. C. and W. G. Manax (1966). "Organ transplantation: a review of past accomplishments, present problems, and future hopes." Anesth Analg **45**(6): 707-32.

Lillehei, R. C., W. G. Manax, et al. (1966). "Transplantation of gastrointestinal organs, including small intestine and stomach." Gastroenterology **51**(5): 936-48.

Malyguine, A. M., S. Saadi, et al. (1996). "Human natural killer cells induce morphologic changes in porcine endothelial cell monolayers." Transplantation **61**(1): 161-4.

Matsumoto, T., M. Kihira, et al. (1984). "Effects of prostacyclin on fetal platelet function." Biol Res Pregnancy Perinatol **5**(1): 11-5.

Mauer D, Gabel D, Eisenreich S, Smit H. Organspende un Deutschland. Darmstadt: Steinkopff Verlag 2003

Medawar, P. B. (1945). "A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits: A Report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council." J Anat **79**(Pt 4): 157-176 4.

Meiser, B. M., W. von Scheidt, et al. (1997). "[Heart transplantation--state of the art today]." Herz **22**(5): 237-52.

Michie, C. (2001). "Xenotransplantation, endogenous pig retroviruses and the precautionary principle." Trends Mol Med **7**(2): 62-3.

Millan, M. T., C. Geczy, et al. (1997). "Human monocytes activate porcine endothelial cells, resulting in increased E-selectin, interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1, and plasminogen activator inhibitor-type-1 expression." Transplantation **63**(3): 421-9.

Morabito, F., M. Gentile, et al. (2009). "Insights into defibrotide: an updated review." Expert Opin Biol Ther **9**(6): 763-72.

Murray, J. E., J. P. Merrill, et al. (2001). "Renal homotransplantation in identical twins. 1955." J Am Soc Nephrol **12**(1): 201-4.

Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Friedman EA, Dealy JB, Jr, Dammin CJ. Successful homotransplantation of the kidney between non-identical twins. N Engl J Med. (1960) ;262:1251–1260

Nagayasu, T., S. Saadi, et al. (2000). "Expression of tissue factor mRNA in cardiac xenografts: clues to the pathogenesis of acute vascular rejection." Transplantation **69**(4): 475-82.

Niada, R., R. Porta, et al. (1985). "Cardioprotective effects of defibrotide in acute myocardial ischemia in the cat." Thromb Res **38**(1): 71-81.

Niada, R., R. Porta, et al. (1986). "Protective activity of defibrotide against lethal acute myocardial ischemia in the cat." Thromb Res **42**(3): 363-74.

Niemann, H. and W. A. Kues (2000). "Transgenic livestock: premises and promises." Anim Reprod Sci **60-61**: 277-93.

Nottle, M. B., L. F. Beebe, et al. (2007). "Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer." Xenotransplantation **14**(4): 339-44.

Ogata, K. and J. L. Platt (2004). "Cardiac xenotransplantation: future and limitations." Cardiology **101**(1-3): 144-55.

Oriol, R., Y. Ye, et al. (1993). "Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation." Transplantation **56**(6): 1433-42.

Otte, K. E., D. Steinbruchel, et al. (1992). "Xenoperfusion experiments are suitable for xenotransplantation research." Transplant Proc **24**(2): 449-50.

Palmetshofer, A., U. Galili, et al. (1998). "Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type I activation." Transplantation **65**(6): 844-53.

Palmetshofer, A., S. C. Robson, et al. (1998). "Tyrosine phosphorylation following lectin mediated endothelial cell stimulation." Xenotransplantation **5**(1): 61-6.

Parker, W., D. Bruno, et al. (1994). "Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies." J Immunol **153**(8): 3791-803.

Perico, N., A. Benigni, et al. (2002). "Xenotransplantation in the 21st century." Blood Purif **20**(1): 45-54.

Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME (2013). "Defibrotide: properties and clinical use of an old/new drug." Vascul Pharmacol. 2013 Jul-Aug; 59(1-2):1-10. doi: 10.1016/j.vph.2013.05.001. Epub 2013 May 14.

Pielsticker, K., A. Schilling, et al. (1971). "[Studies on the mechanism of hyperacute rejection of renal xenografts (author's transl)]." Verh Dtsch Ges Pathol **55**: 645-51.

Pierson, R. N., 3rd (2009). "Current status of xenotransplantation." JAMA **301**(9): 967-9.

Pierson, R. N., 3rd, A. Dorling, et al. (2009). "Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application." Xenotransplantation **16**(5): 263-80.

Platt, J. L. (1996). "The immunological barriers to xenotransplantation." Crit Rev Immunol **16**(4): 331-58.

Platt, J. L. (2000). "Physiologic barriers to xenotransplantation." Transplant Proc **32**(7): 1547-8.

Platt, J. L. (2000). "Xenotransplantation. New risks, new gains." Nature **407**(6800): 27, 29-30.

Ramsoondar, J. J., Z. Machaty, et al. (2003). "Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase." Biol Reprod **69**(2): 437-45.

Reemtsma, K. (1969). "Renal heterotransplantation from nonhuman primates to man." Ann N Y Acad Sci **162**(1): 412-8.

Richardson, P. G., R. J. Soiffer, et al. (2010) "Defibrotide for the Treatment of Severe Hepatic Veno-Occlusive Disease and Multiorgan Failure after Stem Cell Transplantation: A Multicenter, Randomized, Dose-Finding Trial." Biol Blood Marrow Transplant **16**(7): 1005-1017.

Robson, S. C., D. Candinas, et al. (1995). "Role of endothelial cells in transplantation." Int Arch Allergy Immunol **106**(4): 305-22.

Robson, S. C., D. K. Cooper, et al. (2000). "Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation." Xenotransplantation **7**(3): 166-76.

Roos, A. and M. R. Daha (2002). "Antibody-mediated activation of the classical complement pathway in xenograft rejection." Transpl Immunol **9**(2-4): 257-70.

Rossoni, G., G. Pompilio, et al. (1999). "Protectant activity of defibrotide in cardioplegia followed by ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart." J Card Surg **14**(5): 334-41.

Roussel, J. C., C. J. Moran, et al. (2008). "Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI." Am J Transplant **8**(6): 1101-12.

Saadi, S., R. A. Holzknecht, et al. (1995). "Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium." J Exp Med **182**(6): 1807-14.

Saadi, S. and J. L. Platt (1995). "Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement." J Exp Med **181**(1): 21-31.

Sachs, D. H., K. Yamada, et al. (2007). "GALT-KO pigs: is the cup half empty or half full?" Transplantation **84**(1): 12-4.

Samstein, B. and J. L. Platt (2001). "Physiologic and immunologic hurdles to xenotransplantation." J Am Soc Nephrol **12**(1): 182-93.

Sandrin, M. S., H. A. Vaughan, et al. (1993). "Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11391-5.

Schulte am Esch, J., 2nd, M. A. Cruz, et al. (1997). "Activation of human platelets by the membrane-expressed A1 domain of von Willebrand factor." Blood **90**(11): 4425-37.

Schulte Am Esch, J., 2nd, S. C. Robson, et al. (2005). "O-linked glycosylation and functional incompatibility of porcine von Willebrand factor for human platelet GPIb receptors." Xenotransplantation **12**(1): 30-7.

Schulte am Esch, J., 2nd, X. Rogiers, et al. (2001). "Molecular incompatibilities in hemostasis between swine and men--impact on xenografting." Ann Transplant **6**(3): 12-6.

Sebille, F., K. Gagne, et al. (2001). "Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution." J Immunol **167**(6): 3082-8.

Sebille, F., M. Guillet, et al. (2001). "T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response." Am J Transplant **1**(1): 21-8.

Shah, M. S., N. K. Jeevangi, et al. (2009). "Late-onset hepatic veno-occlusive disease post autologous peripheral stem cell transplantation successfully treated with oral defibrotide." J Cancer Res Ther **5**(4): 312-4.

Siegel, J. B., S. T. Grey, et al. (1997). "Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin." Transplantation **64**(6): 888-96.

Sprangers, B., M. Waer, et al. (2008). "Xenotransplantation: where are we in 2008?" Kidney Int **74**(1): 14-21.

Starzl, T. E., L. Brettschneider, et al. (1967). "Liver transplantation." Bull Soc Int Chir **26**(5): 474-88.

Suckfull, M. M., O. Pieske, et al. (1994). "The contribution of endothelial cells to hyperacute rejection in xenogeneic perfused working hearts." Transplantation **57**(2): 262-7.

Tanemura, M., A. S. Chong, et al. (2002). "Direct killing of xenograft cells by CD8+ T cells of discordant xenograft recipients." Transplantation **74**(11): 1587-95.

Taniguchi, S. and D. K. Cooper (1997). "Clinical xenotransplantation: past, present and future." Ann R Coll Surg Engl **79**(1): 13-9.

Tendera, M., E. Gaszewska-Zurek, et al. (2012) "The new oral adenosine A1 receptor agonist capadenoson in male patients with stable angina." Clin Res Cardiol.

Thiemermann, C., G. R. Thomas, et al. (1989). "Defibrotide reduces infarct size in a rabbit model of experimental myocardial ischaemia and reperfusion." Br J Pharmacol **97**(2): 401-8.

Tucker, A., C. Belcher, et al. (2002). "The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: baseline clinical pathology and organ size studies." Xenotransplantation **9**(3): 203-8.

Vial, C. M., D. J. Ostlie, et al. (2000). "Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon." J Heart Lung Transplant **19**(2): 224-9.

Vinten-Johansen, J. (2004). "Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury." Cardiovasc Res **61**(3): 481-97.

Vollmar, A. M. and A. L. Gerbes (2005). "[The history and status of transplantation medicine]." Pharm Unserer Zeit **34**(4): 262-7.

Weis, M. and W. von Scheidt (2000). "Coronary artery disease in the transplanted heart." Annu Rev Med **51**: 81-100.

Wenke, K., B. Meiser, et al. (2003). "Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience." Circulation **107**(1): 93-7.

Xu, H., N. Edwards, et al. (1995). "Age-related development of human anti-pig xenoantibody." J Thorac Cardiovasc Surg **110**(4 Pt 1): 1023-9.

Yang, Q. and G. W. He (2005). "Effect of cardioplegic and organ preservation solutions and their components on coronary endothelium-derived relaxing factors." Ann Thorac Surg **80**(2): 757-67.

Yellon, D. M. and G. F. Baxter (1999). "Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury?" Trends Cardiovasc Med **9**(8): 245-9.

Zhang, C., X. Xu, et al. (2006). "TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(3): 475-80.

Zhang, L., Y. Wang, et al. (2012) "Defibrotide for the prevention of hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review." Clin Transplant.

Zhu, A. (2000). "Introduction to porcine red blood cells: implications for xenotransfusion." Semin Hematol **37**(2): 143-9.

Zhu, A. and R. Hurst (2002). "Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum." Xenotransplantation **9**(6): 376-81.

Zweier, J. L. and M. A. Talukder (2006). "The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury." Cardiovasc Res **70**(2): 181-90.

7. Abkürzungsverzeichnis

α-Gal	Anti-Gal-α1,3-Gal-Antikörper
ABF	aortaler Blutfluss
AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
APA	Anti-Pig-Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zellen
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
B0	Maximum Binding
BGA	Blutgasanalyse
Blk	Blank
Ca ²⁺	Calcium
C(a-v)O ₂	arteriovenöse Sauerstoffdifferenz
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBF	koronarer Blutfluss
CBFI	koronarer Blutflussindex
CC	Coulter Counter
CFD	Complement Fixation Test Dilutent/ Komplementfixationsverdünnung
CK-MB	Kreatinkinase
CO	Herzzeitvolumen/ Cardiac Output
CR	Koronarwiderstand
DAG	Diacylglycerol
dP/dt max	linksventrikulärer Druckanstiegs geschwindigkeit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting/ Durchflußzytometrie
Gal-α1,3-Gal	Galaktosyl-alpha-1,3-Galaktosyl
GPIb	Glykoproteinrezeptor Ib
Hb	Hämoglobin
HG	Herzgewicht
Hkt	Hämatokrit
HLA-System	humanes Leukozytenantigen-System

114 Abkürzungsverzeichnis

HR	Herzfrequenz
HSCT	Transplantation hämatopoetischer Stammzellen/ Hematopoietic stem cell transplantation
HZV	Herzzeitvolumen
IL-8	Interleukin 8
IP-Rezeptor	Prostacyclin-Rezeptor
K ⁺	Kalium
KiCh	klinische Chemie
LAP	linksatrialer Druck/ Vorlast
LDH	Lactatdehydrogenase
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MAC	Membran-Angriffs-Komplex
MAP	mittlerer arterieller Druck
MHC	major histocompatibility complex
Na ⁺	Natrium
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSB	Non-Specific Binding
PAF	Plättchen-Aktivierungs-Faktor
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PBS	phosphate buffered saline
PCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PERV	porciner endogener Retrovirus
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostacyclin
pH	potentia Hydrogenii
PiCCO	Pulse Contour Cardiac Output/ Pulskontur-Herzzeitvolumen
Plt	Platelets/ Thrombozyten
PNAK	präformierte natürliche Antikörper
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pRBC	Packed Red Blood Cells/ Erythrozyten von Schweinen
pTFPI	porciner tissue factor pathway inhibitor
pvWF	porcinen von-Willebrandt-Faktor
SaO ₂	Sauerstoffsättigung

115 Abkürzungsverzeichnis

SMC	smooth-muscle-cells/ glatte Muskulatur
SV	Schlagvolumen
SVI	Schlagvolumenindex
SWI	stroke work index/ Schlag-Arbeits-Index
TA	Total Activity
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
t-PA	tissue-Plasminogenaktivator
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VOD	hepatic veno-occlusive disease
vWF	von-Willebrandt-Faktor
WBC	Leukozyten/ weiße Blutkörperchen
WHO	World Health Organisation
6-keto-PGF _{1α}	6-keto Prostaglandin F _{1α} / inaktives, nicht-enzymatisches Hydrolyseprodukt von PGI ₂

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Komplementsystem
- Abbildung 2: Entstehungsweg der Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene aus Arachidonsäure
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des Working-Heart Perfusionsmodells mit Blutflußrichtungen
- Abbildung 4: Working-Heart Perfusionsmodell
- Abbildung 5: PGE₂ Verdünnungsreihe
- Abbildung 6: 6-keto-PGF_{1 α} Verdünnungsreihe
- Abbildung 7: Well Aufteilung
- Abbildung 8: APA-ELISA Well Platte: Verdünnungsreihe
- Abbildung 9: Gal- α 1,3-Gal ELISA Well Platte: Verdünnungsreihe
- Abbildung 10: Messzeitpunkte nach Perfusionsbeginn
- Abbildung 11: Verlaufsdiagramm ABF [%]
- Abbildung 12: Verlaufsdiagramm dP/dt max [%]
- Abbildung 13: Verlaufsdiagramm SV [%]
- Abbildung 14: Verlaufsdiagramm SWI [%]
- Abbildung 15: Verlaufsdiagramm SVI [%]
- Abbildung 16: Verlaufsdiagramm C(a-v)O₂ [%]
- Abbildung 17: Verlaufsdiagramm CR [%]
- Abbildung 18: Verlaufsdiagramm CBFI [%]
- Abbildung 19: Verlaufsdiagramm CBF [%]
- Abbildung 20: Verlaufsdiagramm CO [%]
- Abbildung 21: Verlaufsdiagramm HR [%]
- Abbildung 22: Verlaufsdiagramm SaO₂-art [%]
- Abbildung 23: Verlaufsdiagramm Hb [%]

117 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 24: Verlaufsdiagramm Ca^{2+} [mmol/l]
- Abbildung 25: Verlaufsdiagramm SaO_2 venös [%]
- Abbildung 26: Verlaufsdiagramm K^+ [mmol/l]
- Abbildung 27: Verlaufsdiagramm CK-MB [ng/ml]
- Abbildung 28: Verlaufsdiagramm LDH [U/l]
- Abbildung 29: Verlaufdiagramm AT [%]
- Abbildung 30: Verlaufsdiagramm Fibrinogen [%]
- Abbildung 31: Verlaufsdiagramm CD11b [%]
- Abbildung 32: Verlaufsdiagramm CD62L [%]
- Abbildung 33: Verlaufsdiagramm CD41 [%]
- Abbildung 34: Verlaufsdiagramm WBC [%]
- Abbildung 35: Verlaufsdiagramm Plt [%]
- Abbildung 36: Verlaufsdiagramm Hkt [%]
- Abbildung 37: Verlaufsdiagramm C3 [%]
- Abbildung 38: Verlaufsdiagramm C4 [%]
- Abbildung 39: Verlaufsdiagramm PGE_2 [pg/ml]
- Abbildung 40: Verlaufsdiagramm 6-keto-PGF_{1a} [pg/ml]
- Abbildung 41: Mittelwerte mit Standardabweichung der Anti-Pig-Antikörper Titer [AUC] im Serum der Kontroll- und Defibrotidegruppe am Anfang und Ende der Versuchsreihen
- Abbildung 42: Mittelwerte mit Standardabweichung der Anti-Gal- $\alpha 1,3$ -Gal IgM Titer [AUC] im Serum der Kontroll- und Defibrotidegruppe am Anfang und Ende der Versuchsreihen
- Abbildung 43: Mittelwerte mit Standardabweichung der Anti-Gal- $\alpha 1,3$ -Gal IgG Titer [AUC] im Serum der Kontroll- und Defibrotidegruppe am Anfang und Ende der Versuchsreihe

118 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 44: Herzgewichtzunahme in der Kontroll- und Defibrotidegruppe
- Abbildung 45: Herz von Pig13 (Beispiel eines Herzens mit den höchsten Abstoßungszeichen in der Defibrotidegruppe) vor und nach Perfusion
- Abbildung 46: Mikroskopisches Bild des Herzgewebes von Pig20 (Beispiel eines Herzens mit den geringsten Abstoßungszeichen in der Kontrollgruppe) nach Perfusion
- Abbildung 47: Mikroskopisches Bild des Herzgewebes von Pig25 (Beispiel eines Herzens mit den höchsten Abstoßungszeichen in der Defibrotidegruppe) nach Perfusion
- Abbildung 48: humanes physiologisches Gerinnungsmodell.
- Abbildung 49: Xenogenes Gerinnungsmodell: porcines Endothel in Kontakt mit humanem Blut.

- Tabelle 1: Funktionen von Defibrotide
- Tabelle 2: Versuchsprotokol
- Tabelle 3: Tabellarische Zusammenfassung der angegebenen Parameter mit Ausgangswert und Einheit, sowie dem signifikanten Effekt
- Tabelle 4: Varianzanalyse ABF [%]
- Tabelle 5: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen ABF [%]
- Tabelle 6: Varianzanalyse dP/dt max [%]
- Tabelle 7: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen dP/dt max [%]
- Tabelle 8: Varianzanalyse SV [%]
- Tabelle 9: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen SV [%]
- Tabelle 10: Varianzanalyse SWI [%]

119 Abbildungsverzeichnis

- Tabelle 11: Varianzanalyse SVI [%]
- Tabelle 12: Varianzanalyse C(a-v)O₂ [%]
- Tabelle 13: Varianzanalyse CR [%]
- Tabelle 14: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede für die Variablen CR [%]
- Tabelle 15: Varianzanalyse CBFI [%]
- Tabelle 16: Varianzanalyse CBF [%]
- Tabelle 17: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen CBF [%]
- Tabelle 18: Varianzanalyse CO [%]
- Tabelle 19: Varianzanalyse HR [%]
- Tabelle 20: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede für die Variablen HR [%]
- Tabelle 21: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede für die Variablen CK-MB [ng/ml]
- Tabelle 22: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen LDH [U/l]
- Tabelle 23: Varianzanalyse Fibrinogen [%]
- Tabelle 24: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen WBC [%]
- Tabelle 25: Varianzanalyse Hkt [%]
- Tabelle 26: Varianzanalyse C3 [%]
- Tabelle 27: Varianzanalyse C4 [%]
- Tabelle 28: Varianzanalyse PGE₂ [%]
- Tabelle 29: Kontrasttest in Manova für die Variablen PGE₂ [pg/ml]
- Tabelle 30: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede in Zeitpunkt 1-4 für die Variablen PGE₂ [pg/ml]
- Tabelle 31: Test zur Analyse der Gruppenunterschiede in Zeitpunkt 5-8 für die Variablen PGE₂ [pg/ml]

120 Abbildungsverzeichnis

Tabelle 32: Varianzanalyse 6-keto-PGF_{1 α} [pg/ml]

Tabelle 33: Test zur Analyse der Zeitunterschiede für die Variablen 6-keto-PGF_{1 α} [pg/ml]

9. Anhang

9.1 Publikation

Der Einfluss von Defibrotide auf die Herzfunktion und den myokardialen Schaden in einem ex vivo Perfusionsmodell der kardialen Xenotransplantation.
Transplantationsmedizin, Supplement II 2009

9.2 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei meiner Familie und meinen Freunden für die große Unterstützung während meines gesamten Medizinstudiums.

Ein besonderer Dank geht an Professor Bruno Reichart für die Vergabe dieses Dissertationsthemas, an Professor Paolo Brenner Johannes Postrach, PD Dr. Andreas Bauer, Dr. Michael Thormann der Herzchirurgischen Klinik Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München und Dr. Maureen Löwenthal für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche. Zudem danke ich Dr. Claudius Faber im Institut für Pathologie (Innenstadt) der Ludwig-Maximilians-Universität München für die histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen und die kompetente Beratung. Ein großer Dank geht auch an die Abteilung für Klinische Chemie im Klinikum Großhadern München für die klinisch- chemischen Auswertungen.

Eidesstattliche Versicherung

Stanescu, Ioana

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Der Einfluss von Defibrotide auf die Herzfunktion und den myokardialen Schaden in einem ex vivo
Perfusionsmodell der kardialen Xenotransplantation

selbstständig 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
einzelnen 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

Unterschrift Doktorandin/Doktorand