

Aus der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

Fortschritte in der chirurgischen Therapie der terminalen Herzinsuffizienz

vorgelegt von: Dr. med. Sebastian Michel

2017

Inhalt

<u>1. EINLEITENDE ZUSAMMENFASSUNG - BEDEUTUNG DER ARBEITEN FÜR DAS FACHGEBIET HERZCHIRURGIE</u>	5
1.1 EXPERIMENTELLER ANTEIL DES HABILITATIONSPROJEKTES	5
1.2 KLINISCHER ANTEIL DES HABILITATIONSPROJEKTES	7
<u>2. EXPERIMENTELLER ANTEIL DES HABILITATIONSPROJEKTES</u>	8
2.1 ARBEITEN ZUR HYPOTHERMEN MASCHINENPERFUSION UND ZUR LAGERUNG FÜR DEN TRANSPORT VON SPENDERHERZEN	8
2.1.1 PRESERVATION OF DONOR HEARTS USING HYPOTHERMIC OXYGENATED PERFUSION (ANN TRANSPLANT. 2014 AUG 20;19:409-16.)	8
2.1.2 TWELVE-HOUR HYPOTHERMIC MACHINE PERFUSION FOR DONOR HEART PRESERVATION LEADS TO IMPROVED ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS COMPARED TO CONVENTIONAL COLD STORAGE (ANN TRANSPLANT. 2015 AUG 11;20:461-8.)	13
2.1.3 INNOVATIVE COLD STORAGE OF DONOR ORGANS USING THE PARAGONIX SHERPA PAK DEVICES (HEART, LUNG, VESSEL 2015;7(3):246-55.)	19
2.2 ARBEITEN ZUR TOLERANZINDUKTION NACH ORGANTRANSPLANTATION IM PRÄKLINISCHEN SCHWEINEMODELL	21
2.2.1 INDUCTION OF CARDIAC ALLOGRAFT TOLERANCE ACROSS A FULL MHC BARRIER IN MINIATURE SWINE BY DONOR KIDNEY COTRANSPLANTATION (AM J TRANSPLANT. 2013 OCT;13(10):2558-66.)	25
2.2.2 EFFECTS OF LUNG COTRANSPLANTATION ON CARDIAC ALLOGRAFT TOLERANCE ACROSS A FULL MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX BARRIER IN MINIATURE SWINE (AM J TRANSPLANT. 2016 MAR;16(3):979-86.)	28

2.2.3 KIDNEY-INDUCED CARDIAC ALLOGRAFT TOLERANCE IN MINIATURE SWINE IS DEPENDENT ON MHC-MATCHING OF DONOR CARDIAC AND RENAL PARENCHYMA (AM J TRANSPLANT. 2015 JUN;15(6):1580-90.)	29
2.2.4 RECIPIENT-MATCHING OF PASSENGER LEUKOCYTES PROLONGS SURVIVAL OF DONOR LUNG ALLOGRAFTS IN MINIATURE SWINE (TRANSPLANTATION. 2015 JUL;99(7):1372-8.)	31
2.2.5 IMMUNOMODULATORY STRATEGIES DIRECTED TOWARD TOLERANCE OF VASCULARIZED COMPOSITE ALLOGRAFTS (TRANSPLANTATION. 2015 2015 AUG;99(8):1590-7.)	33
3. KLINISCHER ANTEIL DES HABILITATIONSPROJEKTES	35
3.1 ARBEITEN ZUR HERZTRANSPLANTATION	35
3.1.1 RENAL RECOVERY AFTER CONVERSION TO AN EVEROLIMUS-BASED IMMUNOSUPPRESSION IN EARLY AND LATE HEART TRANSPLANT RECIPIENTS: A 12-MONTH ANALYSIS (EXP CLIN TRANSPLANT. 2013 OCT;11(5):429-34.)	35
3.1.2 IMPACT OF DONOR AND RECIPIENT SEX ON OUTCOME (CURR OPIN ORGAN TRANSPLANT. 2011 OCT;16(5):543-7.)	37
3.2 ARBEITEN ZU HERZUNTERSTÜTZUNGSSYSTEMEN	38
3.2.1 MODIFIED IMPLANTATION TECHNIQUE FOR THE BERLIN HEART EXCOR ASSIST DEVICE IN ADULTS (ARTIF ORGANS. 2012 MAR;36(3):E48-52.)	38
3.2.2 SURGICAL STRATEGY FOR BIVENTRICULAR ASSIST DEVICE IMPLANTATION AFTER PREVIOUS CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING (HEART SURG FORUM. 2011 AUG 1;14(4):E258-60.)	40
3.2.3 USE OF THE URCHIN® HEART POSITIONER FACILITATES INSERTION OF THE HEARTWARE® DEVICE FOR BIVENTRICULAR APPLICATION (CASE STUDIES IN SURGERY 2016;2(1):69-70.)	42
3.2.4 USE OF METHYLENE BLUE IN THE TREATMENT OF REFRACTORY VASODILATORY SHOCK AFTER CARDIAC ASSIST DEVICE IMPLANTATION: REPORT OF FOUR CONSECUTIVE CASES (J CLIN MED RES. 2012 JUN;4(3):212-5.)	43

4. LITERATURVERZEICHNIS	46
5. DANKSAGUNG	49

1. Einleitende Zusammenfassung - Bedeutung der Arbeiten für das Fachgebiet Herzchirurgie

In der BRD sterben jedes Jahr immer noch ca. 60000 Menschen an den Folgen einer Herzinsuffizienz. Besteht eine terminale Herzinsuffizienz (NYHA IV-Stadium), bei der der Patient Luftnot in Ruhe hat, ist die 1-Jahresüberlebensrate ca. 30%. Fortschritte in der medikamentös-konservativen Therapie konnten diese Prognose nicht wesentlich verbessern, sodass eine chirurgische Therapie in Form einer Herztransplantation oder mit Hilfe eines Herzunterstützungssystems indiziert ist. Dieses Habilitationsprojekt beschäftigt sich mit Fortschritten in beiden Bereichen, sowohl auf experimenteller als auch auf klinischer Ebene.

1.1 Experimenteller Anteil des Habilitationsprojektes

Die Herztransplantation ist der Goldstandard in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz. Das 1-Jahresüberleben nach diesem Eingriff liegt bei ca. 80% (Jahresbericht der International Society for Heart and Lung Transplantation, www.ishlt.org), wobei das primäre Graftversagen durch den initialen Ischämie-Reperfusionsschaden und dessen intensivmedizinische Folgekomplikationen (ECMO-Therapie, Infektionen etc.) innerhalb der ersten 30 Tage die Haupttodesursache darstellt. Der erste Teil des Habilitationsprojektes beschäftigt sich mit Strategien zur Vermeidung des Ischämie-Reperfusionsschadens durch den Einsatz der hypothermen oxygenierten Maschinenperfusion für den Transport von Spenderherzen. Durch das kontinuierliche Angebot von Sauerstoff und Nährstoffen sowie durch

das Auswaschen toxischer Metabolite während des Organtransports kann die Herzfunktion unmittelbar nach Transplantation verbessert werden.

Die Langzeitprognose nach Herztransplantation ist im Wesentlichen abhängig von der Entwicklung der Transplantatvaskulopathie (TVP). Darunter versteht man die zunehmende diffuse Einengung des Lumens der Koronararterien. Im schlimmsten Fall bekommen die Patienten einen Herzinfarkt. Die Entstehung der TVP ist multifaktoriell bedingt, ursächlich sind v.a. akute Abstoßungsepisoden im Verlauf, Infektionen mit dem Cytomegalievirus sowie Bluthochdruck, Diabetes und Fettstoffwechselstörung, die allesamt Folge der Anwendung von Immunsuppressiva sind. Das Auftreten von Tumoren (in erster Linie Lymphome und Melanome) ist ebenfalls bedingt durch die jahrelange Anwendung von Immunsuppressiva. Die Halbwertszeit der transplantierten Herzen beträgt derzeit 11 Jahre. ¹ Nach dieser Zeit sind die Patienten entweder verstorben oder stehen zur Re-Transplantation an, ein Eingriff, der jedoch nur in den seltensten Fällen durchgeführt wird. Eine Möglichkeit, die lebenslang notwendige Einnahme von Immunsuppressiva mit all ihren toxischen Nebenwirkungen zu vermeiden, liegt in der Strategie, immunologische Toleranz gegenüber dem Transplantat zu induzieren, sodass es nicht mehr zu einer Abstoßung kommt, da der Organismus das fremde Herz als „selbst“ erkennt. Am Massachusetts General Hospital in Boston werden bereits klinische Toleranzprotokolle in der Nierentransplantation angewandt, die ein komplettes Absetzen aller Immunsuppressiva ermöglichen. ² Beim Herzen ist es jedoch ungleich schwieriger als bei der Niere, Toleranz zu induzieren. Ein erfolgreiches klinisches Toleranzprotokoll gibt es derzeit noch nicht. Präklinische Versuche in Großtiermodellen, Toleranz gegenüber Herzen zu induzieren, wurden für dieses Habilitationsprojekt im Rahmen eines von der American Society of Transplant Surgeons finanzierten Forschungsaufenthaltes am Massachusetts General Hospital in Boston in der Arbeitsgruppe von Joren Madsen durchgeführt.

1.2 Klinischer Anteil des Habilitationsprojektes

Der klinische Teil des Habilitationsprojektes beschäftigt sich zum einen mit nephroprotektiven Immunsuppressionsschemata nach Herztransplantation unter der Verwendung von Everolimus sowie dem Einfluss des Geschlechtes von Spender und Empfänger auf das Ergebnis nach Herztransplantation (Überleben und Abstoßung). Dabei sind die Erfahrungen des Münchner Zentrums mit über 1000 Herztransplantierten mit berücksichtigt. Zum anderen werden verbesserte chirurgische Techniken für die Implantation von biventrikulären Herzunterstützungssystemen (ventricular assist devices, VAD) erörtert. Beschrieben wurden eine modifizierte Implantationstechnik des Berlin Heart Excor® zur Reduktion von Blutungskomplikationen, sowie eine modifizierte Technik der Kanülierung desselben assist devices bei Re-OP mit offenen Bypasses. Die Verwendung einer Saugglocke (Urchin®, Medtronic Inc., Minneapolis, MN, USA), die ursprünglich für die Koronarchirurgie ohne Herz-Lungen-Maschine entwickelt worden war, kann die Implantation des nicht-pulsatilen HeartWare™ -VAD in biventrikulärer Anwendung erleichtern.

Ein häufiges Problem bei der Implantation von assist devices in kardial dekompensierte Patienten ist das perioperative Auftreten eines Vasoplegiesyndroms, das durch einen kompletten peripheren Widerstandsverlust zur katecholaminrefraktären Hypotonie führt. In solchen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von Methylenblau einen positiven Effekt auf die hämodynamische Situation hat und zu einer Reduktion der oftmals extrem hohen und damit nebenwirkungsreichen Katecholamindosen führen kann.

2. Experimenteller Anteil des Habilitationsprojektes

2.1 Arbeiten zur hypothermen Maschinenperfusion und zur Lagerung für den Transport von Spenderherzen

2.1.1 Preservation of donor hearts using hypothermic oxygenated perfusion (Ann Transplant. 2014 Aug 20;19:409-16.)

Hintergrund

Der initiale Ischämie-Reperfusionsschaden ist bei der Herztransplantation verantwortlich für das primäre Graftversagen, aber auch mitverantwortlich für die Transplantatvaskulopathie im Langzeitverlauf.³ Hypotherme Maschinenperfusion (HMP) von Spenderherzen soll den Ischämie-Reperfusionsschaden reduzieren, da diese Technik einen kontinuierlich aeroben Metabolismus und ein Auswaschen toxisch metabolischer Produkte ermöglicht. Wir evaluierten den Effekt der Maschinenperfusion auf die Integrität der kardialen Myozyten in Schweineherzen, die für 4 Stunden mit pulsatilem hypothermer oxygenierter Maschinenperfusion behandelt wurden.

Material und Methoden

Schweineherzen wurden explantiert und entweder konventionell für 4 Stunden in Celsior-Lösung verpackt und auf Eis gelagert (4 h conventional cold storage (CS), n=6) oder für 4 Stunden mit dem Paragonix Sherpa™ Perfusion Cardiac Transport System bei 4-8°C mit Celsior-Lösung pulsatil perfundiert (4 h pulsatile perfusion (PP), n=6). Nach 4 Stunden wurden die Herzen mit Hilfe eines Langendorff-Modells hämodynamisch evaluiert. Die Kontrollgruppe wurde unmittelbar nach Explantation ohne jegliche Präservierung sofort mit dem Langendorff-System reperfundiert (n=3).

Es wurden Biopsien vom Apex des linken Ventrikels vor und nach der 4-stündigen Präservationszeit genommen sowie nach der Reperfusion am Langendorff-System, um den ATP- und Endothelin-1-Gehalt im Gewebe zu bestimmen. Die ultrastrukturelle Analyse der Herzen wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie durchgeführt.

Ergebnisse

Signifikante Unterschiede in der systolischen und diastolischen Funktion (+dP/dt, -dP/dt, EDP) ließen sich zwischen den Gruppen nicht zeigen. Maschinenperfusion (4 h PP) führte nach 4 Stunden Präservation zu einem signifikant höheren Gewichtsanstieg (myokardiales Ödem, Fig. 2). Die 4 h CS Gruppe zeigte höhere Endothelin-1-Spiegel, was gleichbedeutend mit endothelialer Dysfunktion ist. Dies wurde im histologischen (Fig. 5, 6) und elektronenmikroskopischen Bild (Fig. 7) bestätigt, wo in der 4 h CS Gruppe Schäden am Endothel und auch den Herzmuskelfasern zu sehen waren, die in der 4 h PP Gruppe nicht zu finden waren.

Diskussion

In dieser Studie ging es darum, die Technik der hypothermen Maschinenperfusion mit dem aktuellen Goldstandard der Konservierung für Spenderherzen – Verpackung in Plastiktüten und Lagerung auf Eis – für die derzeit üblichen Ischämiezeiten von bis zu 4 Stunden zu vergleichen. Ein Vorteil von Perfusionstechniken gegenüber der Lagerung auf Eis ist die präzise gewünschte Temperaturregulierung von 4-8°C, die verhindert, dass das Organ zu kalt wird und davon Schaden nimmt. Das beobachtete und gefürchtete Myokardödem – ein Problem aller Perfusionstechniken – war auch in unserer Studie zu beobachten, führte aber glücklicherweise nicht zu einer Einschränkung der diastolischen Funktion (EDP), sodass man annehmen kann, dass das entstandene Myokardödem klinisch keine Bedeutung hat. Die Verwendung einer Lösung mit höherem onkotischen Druck (z. B. University of Wisconsin-Lösung) könnte das Problem komplett beseitigen.

In der biochemischen und (elektronen-)mikroskopischen Analyse ließen sich Unterschiede zeigen, die dafür sprechen, dass HMP in der Lage ist, das Endothel besser zu schützen als die konventionelle Lagerung des Spenderherzens auf Eis. Im Vergleich zur derzeit ebenfalls in Untersuchung befindlichen Technik der normothermen Maschinenperfusion handelt es sich bei HMP um ein billigeres und technisch deutlich einfacheres Verfahren.

Schlussfolgerung

HMP von Spenderherzen führt zu einer besser erhaltenen Zellstruktur im Vergleich zur konventionellen Lagerung auf Eis. Dies könnte eventuell zu einer geringeren Inzidenz von primärem Graftversagen nach Herztransplantation führen.

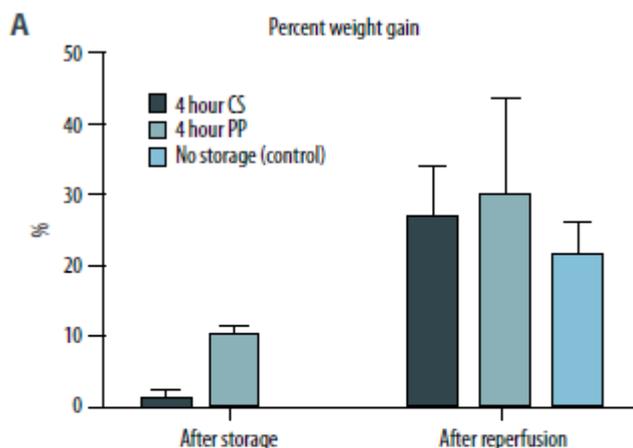


Figure 2. Weight gain of hearts caused by edema in% compared to baseline (A) and absolute numbers in grams (B). Machine perfusion led to more weight gain during the 4-h storage period compared to conventional cold storage. All groups show a similar weight after reperfusion on the Langendorff system.

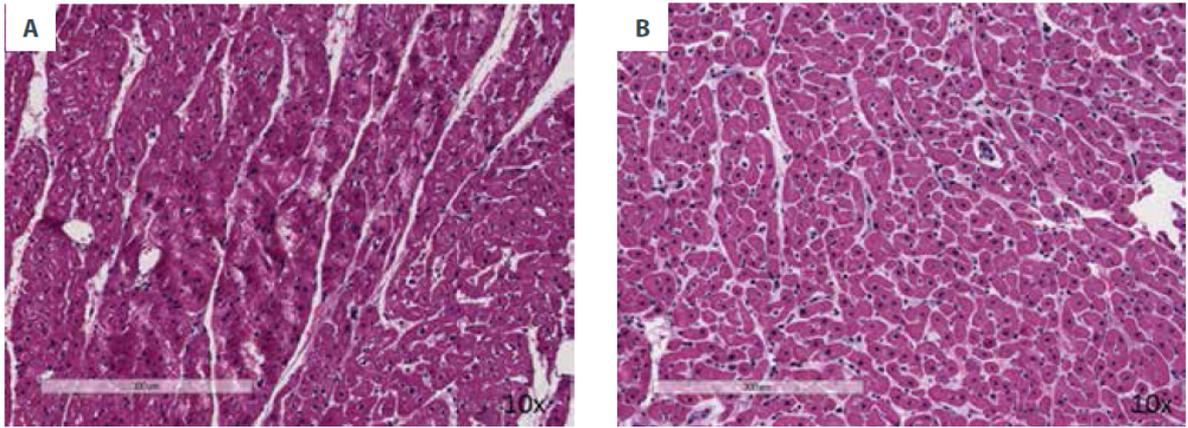


Figure 5. Histology of hearts after reperfusion on the Langendorff system. Representative H&E stains show signs of myocyte injury in the 4-h CS group (A) and no injury in the 4-h PP group (B).

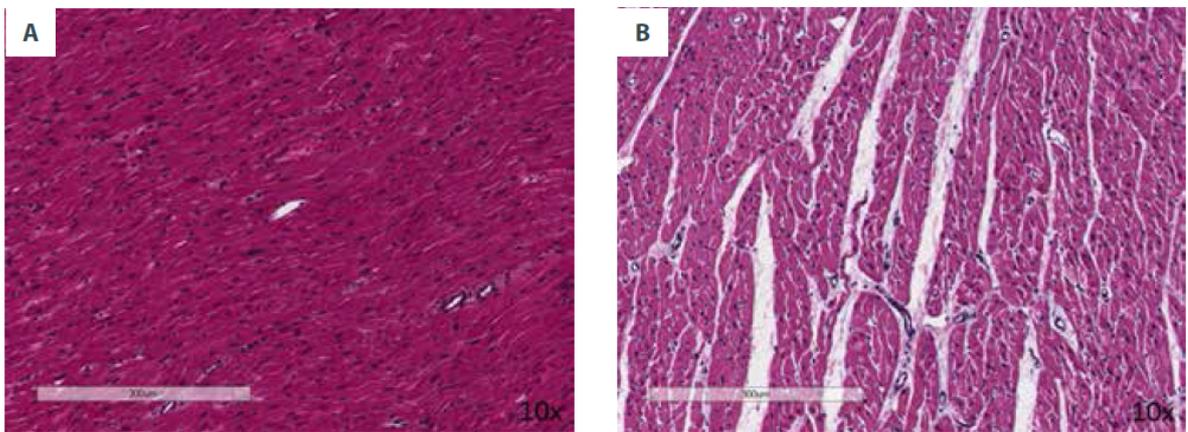


Figure 6. Histology of hearts after preservation. Representative H&E stains show less edema in the 4-h CS group (A) than in the 4-h PP group (B).

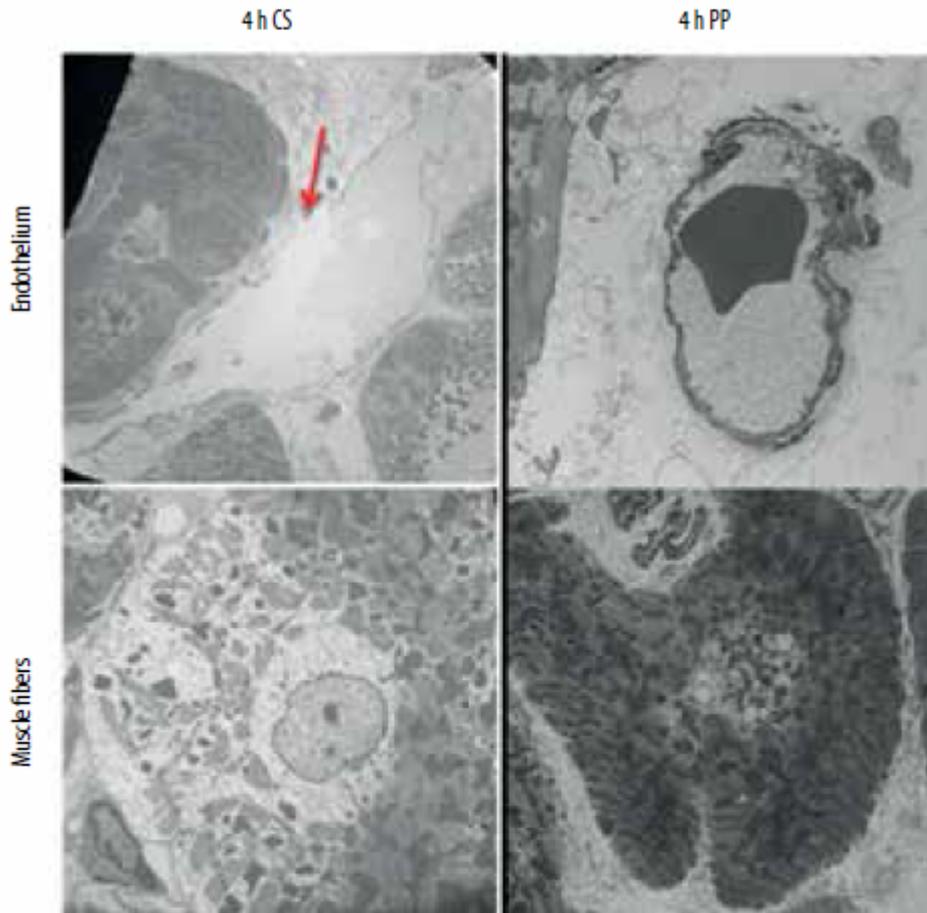


Figure 7. Electron microscopy of hearts after reperfusion on the Langendorff system. Representative images of endothelial cells and muscle fibers are shown left: 4-h CS with ruptured endothelium (top, red arrow), damaged muscle fibers, and edema (bottom); right: 4-h PP with intact endothelium and preserved muscle fibers).

2.1.2 Twelve-hour hypothermic machine perfusion for donor heart preservation leads to improved ultrastructural characteristics compared to conventional cold storage (Ann Transplant. 2015 Aug 11;20:461-8.)

Hintergrund

Als Folgestudie der vorangegangenen wurden nun hier längere Ischämiezeiten (12 Stunden), die derzeit in der klinischen Herztransplantation nicht üblich oder akzeptiert sind, untersucht.

Material und Methoden

Schweineherzen wurden explantiert und entweder konventionell für 12 Stunden in Celsior-Lösung verpackt und auf Eis gelagert (12 h conventional cold storage (CS), n=3) oder für 12 Stunden mit dem Paragonix Sherpa™ Perfusion Cardiac Transport System bei 4-8°C mit Celsior-Lösung pulsatil perfundiert (hypothermic machine perfusion, HMP, Fig. 1). Hierfür wurden verschiedene Fluss- und Druckraten angewendet, um das entstehende Ödem möglichst gering zu halten (12 h pulsatile perfusion (PP), n=3 und 12 h PP low flow, n=2).

Nach 12 Stunden wurden die Herzen mit Hilfe eines Langendorff-Modells reperfundiert. Die Kontrollgruppe wurde unmittelbar nach Explantation ohne jegliche Präservierung sofort mit dem Langendorff-System reperfundiert (n=3).

Es wurden Biopsien vom Apex des linken Ventrikels vor und nach der 4-stündigen Präservierungszeit genommen sowie nach der Reperfusion am Langendorff-System, um den ATP- und Endothelin-1-Gehalt im Gewebe zu bestimmen. Die ultrastrukturelle Analyse der Herzen wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie durchgeführt. Eine TUNEL-Färbung zur Diagnose von Apoptose wurde angefertigt.

Ergebnisse

Maschinenperfusion führte nach 12 Stunden Präservierung zu einem signifikant höheren Gewichtsanstieg (myokardiales Ödem). Die HMP-Gruppe zeigte niedrigere Endothelin-1- (d.h.

weniger endotheliale Dysfunktion) und höhere ATP-Spiegel (d.h. erhaltene Energiereserven) ($p > 0,05$), sowie weniger Apoptose als die konventionell behandelte Gruppe (Fig. 5).

Elektronenmikroskopisch zeigten sich in der 12 h CS Gruppe geschädigte Herzmuskelfasern, Endothelzellrupturen und geschädigte Mitochondrien. In der 12 h PP Gruppe blieben diese Zellstrukturen weitgehend unversehrt (Fig. 6, 7, 8).

Diskussion

Laut den Registerdaten der International Society for Heart and Lung Transplantation steigt die 1-Jahresmortalität nach Herztransplantation signifikant an, wenn die Ischämiezeit des Spenderorgans 4 Stunden überschreitet. ⁴ Aufgrund der positiven Erfahrungen mit der Technik der hypothermen Maschinenperfusion (HMP) im 4-Stunden-Bereich, wollten wir nun mit Hilfe dieser Technik für derzeit noch nicht übliche lange Ischämiezeiten von 12 Stunden positive Effekte auf die Qualität des Spenderherzens nachweisen. HMP führte zu einem besseren Erhalt der Energiereserven (höherer ATP-Gehalt) nach 12 Stunden. Als morphologisches Korrelat hierfür ließen sich runde große Mitochondrien (Energiespeicher der Zellen) elektronenmikroskopisch nachweisen. Diese waren in der Gruppe der konventionell auf Eis gelagerten Herzen (12 h CS) abgeflacht und klein, oft mit offenen Cristae. HMP führte zu einem niedrigeren Endothelin-1 Gehalt nach 12 Stunden, was ein Zeichen für weniger endotheliale Dysfunktion ist. Dies konnte morphologisch in der Elektronenmikroskopie ebenfalls bestätigt werden: Das Endothel der HMP-Herzen war intakt, das Endothel der konventionell präservierten Herzen (12 h CS) war oft rupturiert. Die Herzmuskelfasern in der HMP-Gruppe waren intakt, die der konventionell gelagerten Herzen geschädigt mit schwindenden Z-Bändern.

Da das myokardiale Ödem (Gewichtszunahme der Herzen) in der 12 h PP Gruppe signifikant höher war als in der Gruppe der konventionell gelagerten Herzen (12 h CS), wurde versucht, in einer Untergruppe (12 h PP low flow) die positiven Effekte der Perfusion mit Sauerstoff auszunutzen, aber durch Reduzierung des Perfusionsdrucks bzw. -flusses der Ödembildung

möglichst entgegenzuwirken. Die Reduzierung des Flusses auf 50% hatte noch keine negativen Auswirkungen. Bei einer weiteren Halbierung auf nun 25% des Ausgangsflusses zeigten sich dann deutliche Veränderungen an den Mitochondrien, die nun denen der konventionell gelagerten Herzen auf Eis (12 h CS) ähnelten.

Schlussfolgerung

HMP von Spenderherzen führt zu einer besser erhaltenen Zellstruktur im Vergleich zur konventionellen Lagerung auf Eis. Dies gilt besonders für Ischämiezeiten, die länger als die üblicherweise akzeptierten 4 Stunden liegen. In dieser Studie konnte die Unversehrtheit der Zellstrukturen bis 12 Stunden gezeigt werden. Ob dies auch ein hämodynamisch gut funktionierendes Transplantat *in vivo* bedeuten würde, müssen jedoch erst präklinische Herztransplantationsversuche bestätigen.

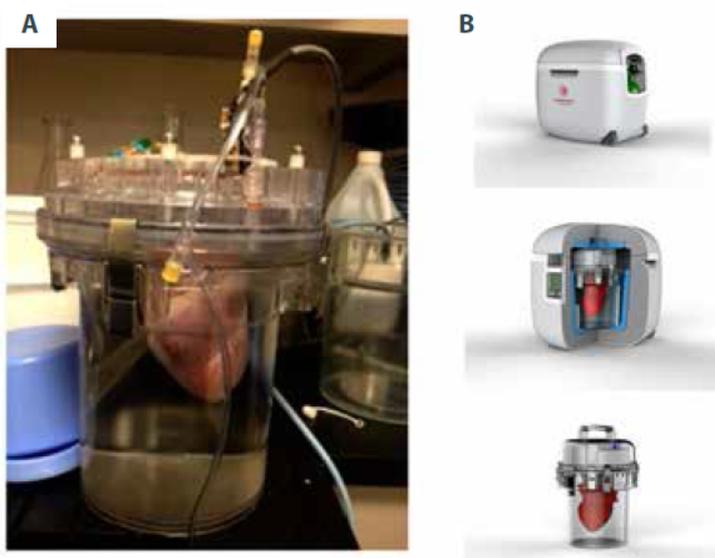


Figure 1. The Paragonix Sherpa Perfusion™ Cardiac Transport System. (A) prototype, (B) commercial design.

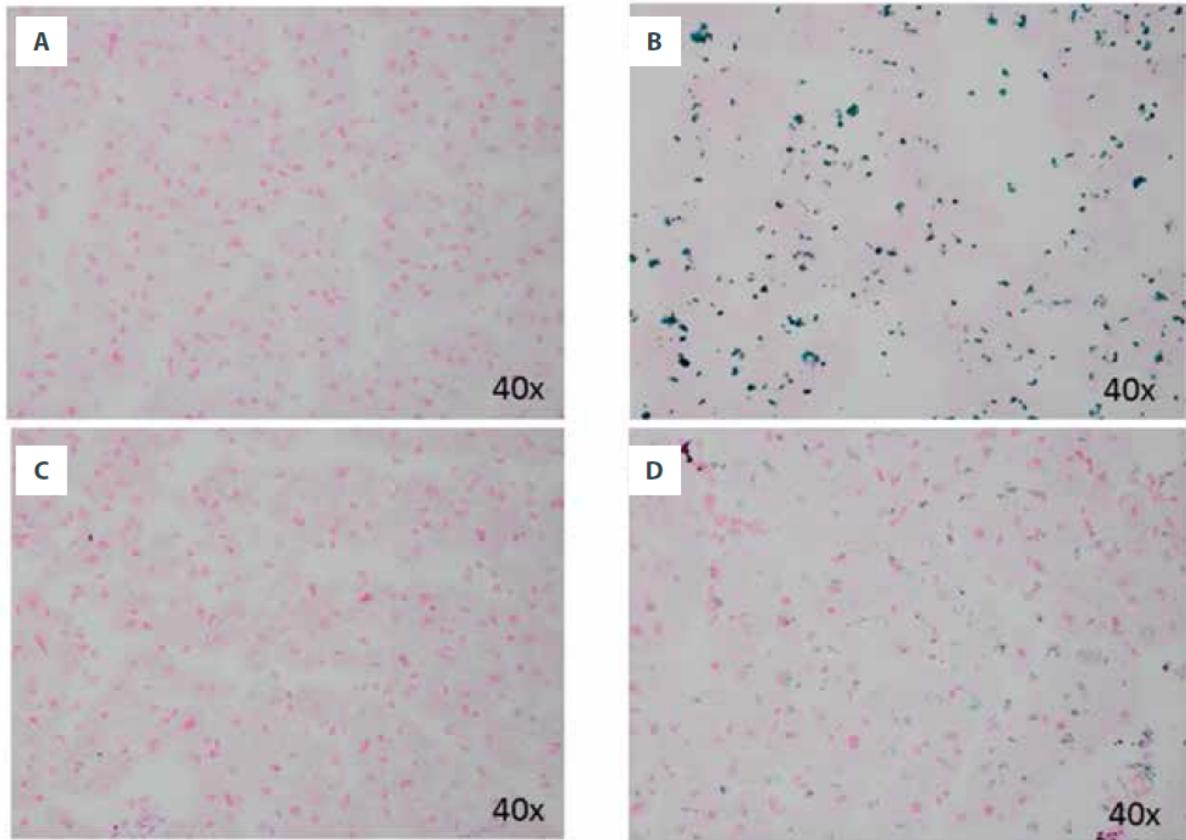


Figure 5. TUNEL-staining for apoptosis in representative heart samples. (A) negative control (no TdT enzyme added). (B) positive control (sample treated with nuclease to cause DNA breaks in every cell). (C) 12 hPP (no apoptosis can be detected). (D) 12 h CS (apoptosis can be detected: cells that contain fragmented nuclear chromatin are stained in blue).

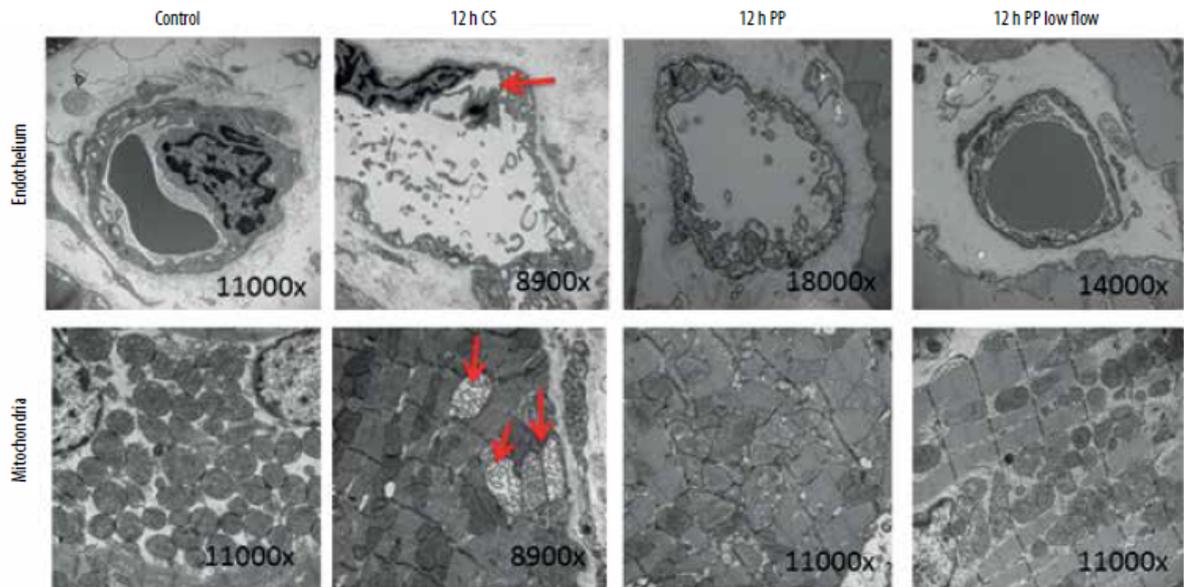


Figure 6. Electron microscopy of hearts after storage. Representative images of endothelial cells and mitochondria are shown (12 h CS with ruptured endothelium (top, arrow), damaged mitochondria with open cristae (bottom, arrows); 12 h PP, 12 h PP low flow and control show intact endothelium and preserved, round mitochondria).

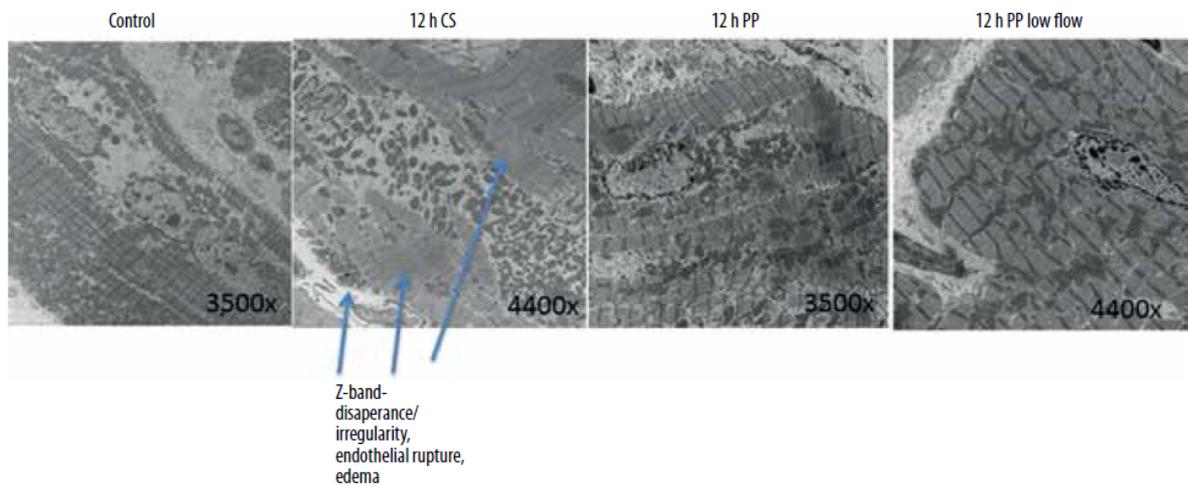


Figure 7. Electron microscopy of hearts after reperfusion on the Langendorff system. Representative images of muscle fibers are shown. Hearts that had been perfused during preservation time show intact muscle fibers (12 h PP and 12 h PP low flow) while hearts that underwent conventional cold storage show damaged muscle fibers with disappearance of the Z-bands (12 h CS).

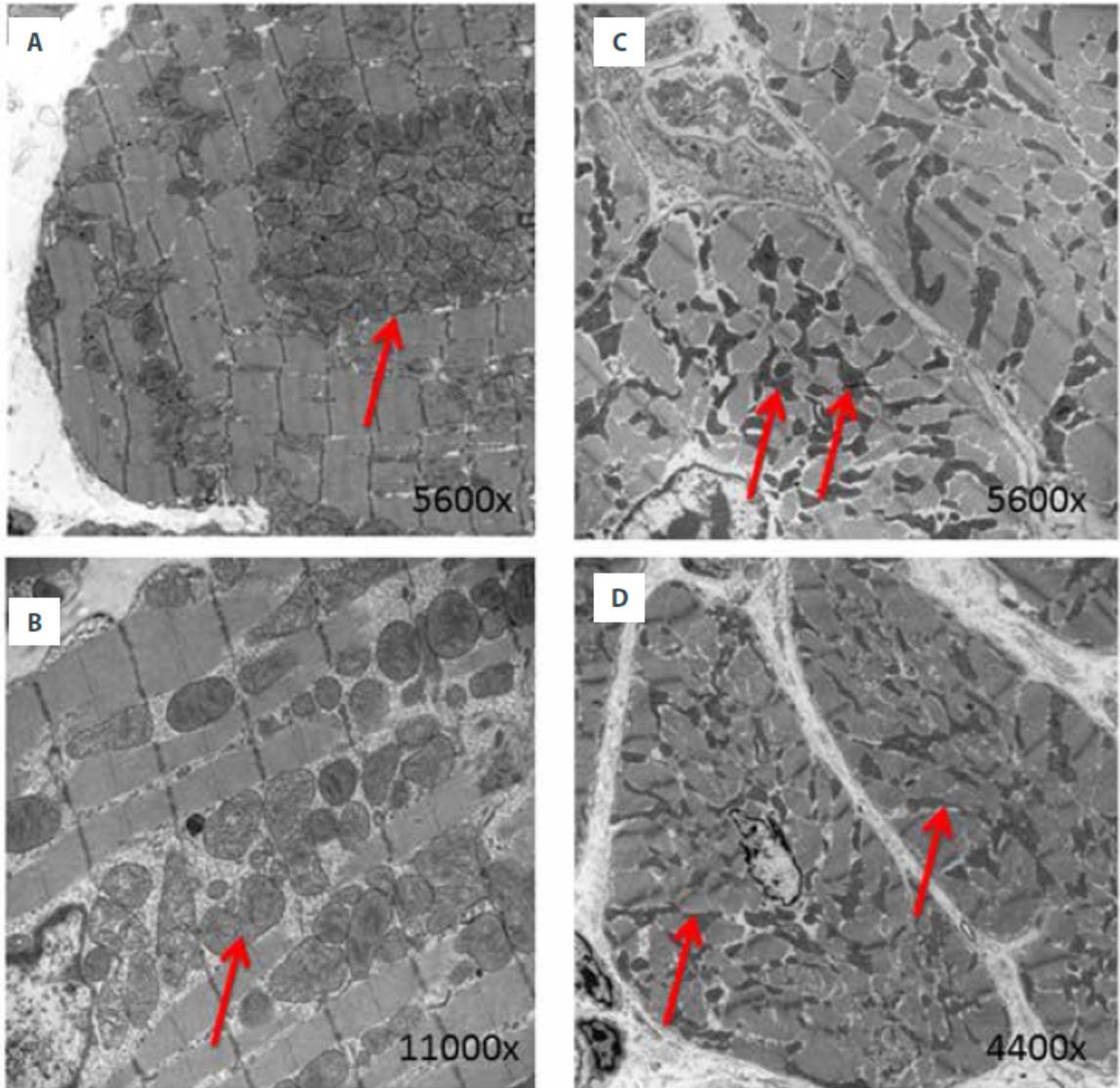


Figure 8. Electron microscopy of mitochondria after storage (red arrows). Depending on perfusion flow the mitochondria are big, round and ATP preserved (A) 12 h PP flow=52.6 ml/min, (B) 12 h PP flow=23.2 mL/min) or small, of irregular shape and ATP depleted (C) 12 h PP flow=13.9 mL/min, (D) 12 h CS).

2.1.3 Innovative cold storage of donor organs using the Paragonix Sherpa Pak devices (Heart, Lung, Vessel 2015;7(3):246-55.)

Hintergrund

Der derzeitige Goldstandard in der Verpackung von Organen für den Transport besteht aus 3 Plastiktüten und einer Eisbox. In die erste Tüte kommt das Organ und meist ein Liter Präservationslösung. Diese Tüte wird in eine zweite mit Kochsalz gefüllte Tüte gegeben und die zweite in eine dritte mit Kochsalz gefüllte. Das gesamte Konstrukt wird in einer mit Eis aufgefüllten Box transportiert. Der Nachteil dieser Methode ist, dass das Organ in der Regel zu kalt wird. Es konnte gezeigt werden, dass die ideale Temperatur bei 4-8°C liegt. Höhere Temperaturen führen zu hypoxischen Schäden, weil der Metabolismus nicht weit genug reduziert wird, niedrigere Temperaturen als 4°C führen zu Kälteschäden mit Proteindenaturierung.⁵ In der vorliegenden Studie wurde ein Gerät getestet, das die Temperatur genau zwischen 4-8°C hält und so den Kälteschaden für das Organ während des Transports vermeiden kann.

Material und Methoden

Das Paragonix Sherpa Pak™ device wurde 3 verschiedenen *ex-vivo* Studien unterzogen: 1. Die Temperatur im flüssigkeitsgefüllten Gerät wurde bei einer konstanten Außentemperatur von 22°C bis zu 30 Stunden lang getestet. 2. Die Temperatur des flüssigkeitsgefüllten Gerätes wurde bis zu 30 Stunden lang bei extremen Außentemperaturen (-8°C und 31°C) gemessen. 3. Die Temperatur von Schweineherzen im Gerät wurde bis zu 12 Stunden lang gemessen.

Ergebnisse

In allen 3 Studien konnte die Temperatur im gewünschten Zielbereich von 4-8°C konstant gehalten werden.

Diskussion

Unsere Ergebnisse bestätigten eine frühere Studie von Horch et al ⁶, bei der gezeigt wurde, dass die Temperatur bei der konventionellen Transportmethode zu stark abfällt (bis auf 0°C) und so Kälteschäden entstehen, die für das Ergebnis nach Organtransplantation sicherlich nicht förderlich sind. Eine konstante Temperatur zwischen 4-8°C bietet den besten Kompromiss zwischen der Absenkung des Sauerstoffverbrauchs einerseits und der Vermeidung von Kälteschäden andererseits.

Schlussfolgerung

Der Paragonix Sherpa Pak™ kann die Temperatur über lange Zeit konstant zwischen 4-8°C halten und ist somit dem aktuellen Goldstandard des Organtransports (Plastiktüten und Eisbox) überlegen.

2.2 Arbeiten zur Toleranzinduktion nach Organtransplantation im präklinischen Schweinemodell

Die folgenden fünf Arbeiten entstanden während eines von der American Society of Transplant Surgeons (ASTS) finanzierten Forschungsaufenthaltes am Transplantation Biology Research Center/Center for Transplantation Sciences des Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School).

Das Ziel dieses Labors ist die Induktion immunologischer Toleranz gegenüber dem Spenderorgan und damit die Vermeidung der sonst notwendigen lebenslangen Einnahme toxischer Immunsuppressiva für die Transplantatempfänger. Moderne Immunsuppressiva können zwar effektiv akute Abstoßungsreaktionen verhindern, haben jedoch ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil bestehend aus Hypertonie, Hyperlipidämie, Nierentoxizität sowie stark erhöhte Anfälligkeit für Infektionen und Tumoren (v.a. Lymphome und Melanome). Fast bei allen Herztransplantierten tritt früher oder später eine schwer beherrschbare chronische Abstoßung in Form der Transplantatvaskulopathie (Einengung der Koronararterien) auf, die in hohem Maße für das begrenzte Überleben nach Herztransplantation (50% nach 11 Jahren ⁷) verantwortlich ist. All diese Dinge wären vermeidbar, wenn Transplantierte ohne Immunsuppressiva leben könnten. Das vielversprechendste Konzept zur Toleranzinduktion beim Menschen ist der gemischte hämatopoietische Chimerismus.

Kurz zusammengefasst wird nach einem Konditionierungsschema zur Deletion von T- und B-Zellen (Ganzkörperbestrahlung, Cyclophosphamid, Thymusbestrahlung, ATG, Splenektomie u.ä.) das Organ zusammen mit dem Knochenmark des Spenders transplantiert. So kolonialisieren sowohl hämatopoietische Zellen des Spenders als auch des Empfängers Knochenmark und Thymus. Durch negative Selektion werden nun sowohl selbst-reaktive als auch Spender-reaktive

T-Zellen eliminiert (klonale Deletion). Die so entstandene zentrale Toleranz hält, egal ob der Chimärismus nach einiger Zeit verschwindet (transient chimerism) oder auch persistiert.

Mittlerweile sind mit dieser Strategie bereits erste klinische Erfahrungen in der Nierentransplantation gesammelt worden: am Massachusetts General Hospital wurden 10 Patienten kombiniert Niere und Knochenmark transplantiert, wobei 7 von 10 Patienten 4 oder mehr Jahre ohne Immunsuppression leben. ^{2, 8, 9}

Die zweite Möglichkeit zur Induktion zentraler Toleranz besteht in der Co-Transplantation von Thymusgewebe, am besten vaskularisiert als Herz-en-bloc-Thymustransplantation ¹⁰, nach Thymektomie oder Thymusbestrahlung und T-Zell-Depletion des Empfängers. Die juvenilen T-Zellen des Empfängers wandern zum Spenderthymus, wo gegen Spenderantigene gerichtete T-Zellen negativ selektioniert werden (klonale Deletion, s.o.). Die so entstandene spenderspezifische T-Zell-Toleranz kann die zelluläre Abstoßung und die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion verhindern, nicht jedoch die humorale Abstoßung durch natürliche Antikörper ¹¹. Die zweite Limitierung liegt in der natürlichen Involution des Thymus mit zunehmendem Alter, so dass die Co-Transplantation von Thymusgewebe auf pädiatrische Patienten beschränkt bleiben würde. ¹²

Die Induktion donorspezifischer Toleranz ist sicherlich ein komplexer Ansatz zur Lösung der Abstoßungsproblematik. Die fehlende Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppression wäre für Organempfänger aber von unschätzbarem Vorteil, da die Anfälligkeit für Infektionen und Tumoren und Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Hypertonie entfallen würden. Auch das Problem der chronischen Abstoßung – soweit sie durch immunologische Prozesse bedingt ist – wäre gelöst. Die Nachsorge der Transplantierten wäre deutlich unkomplizierter und billiger, weil sie weniger Immunsuppressiva-assoziierte Begleiterkrankungen hätten. Auch die Lebensqualität nach

Organtransplantation könnte damit weiter verbessert werden, und ein größerer Teil dieser Patientengruppe könnte wieder in die Arbeitswelt integriert werden, was sowohl für den einzelnen psychologisch von unschätzbarem Wert ist als auch das Gesundheitswesen finanziell entlasten würde.

Für die präklinische Toleranzinduktionsforschung steht am Massachusetts General Hospital eine Schweineherde zur Verfügung, die es erlaubt, Transplantationsversuche mit definierten major histocompatibility complex (MHC) mismatches von Spender und Empfänger durchzuführen (siehe Abb. 1).¹³

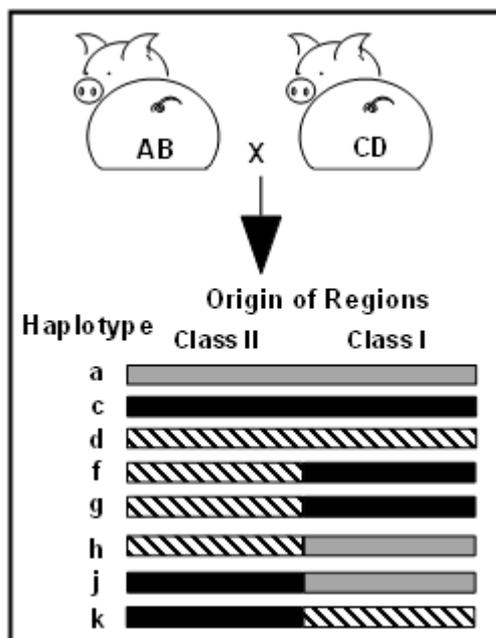


Abb. 1: MGH miniature swine haplotypes

In Vorarbeiten dieses Labors wurde bereits festgestellt, dass es in diesem Modell bei unterschiedlichen Organen unterschiedlich schwierig ist, Toleranz zu induzieren.

Im Folgenden sind die Ergebnisse für die unterschiedlichen Organe kurz zusammengefasst (bei allen Versuchen wird 12 Tage lang ein hochdosierter Calcineurininhibitor gegeben (Cyclosporin A oder Tacrolimus) und dann die Immunsuppression abgesetzt):

<i>Experiment</i>	<i>Immunsuppression</i>	<i>Ergebnis</i>	<i>Ref.</i>
MHC class I mismatch Nieren-Tx	12 Tage CyA	Toleranz	14
MHC class I mismatch Herz-Tx	12 Tage CyA	Abstoßung	15
MHC class I mismatch Herz-Nieren-Tx	12 Tage CyA	Toleranz	15
MHC class I+II mismatch Nieren-Tx	12 Tage Tac	Toleranz	16
MHC class I+II mismatch Herz-Tx	12 Tage Tac	Abstoßung	17
MHC class I+II mismatch Herz-Nieren-Tx	12 Tage Tac	Toleranz	17
MHC class I mismatch Lungen-Tx	12 Tage CyA	Abstoßung	18
MHC class I mismatch Lungen-Tx	12 Tage Tac	Toleranz	18
MHC class I+II mismatch Lungen-Tx	12 Tage Tac	Toleranz	19

Wenn man 12 Tage lang mit einem hochdosierten Calcineurin-Inhibitor behandelt, werden die T-Effektorzellen während der Induktionsphase der Toleranz unterdrückt, so lange bis die Niere selbst in der Lage war, Toleranz über regulierende T-Zellen zu induzieren. Die Balance zwischen Abstoßung (T-Helfer- und T-Killerzellen) und Toleranz (regulierende T-Zellen) wird in Richtung Toleranz verschoben. Es handelt sich der Theorie nach in diesem Modell also um „regulational tolerance“ (periphere Toleranz) im Gegensatz zur „deletional tolerance“ (zentralen Toleranz) beim gemischten hämatopoietischen Chimärismus, wo gegen den Spender gerichtete T-Zellen negativ selektioniert werden. ¹⁶

2.2.1 Induction of Cardiac Allograft Tolerance Across a Full MHC Barrier in miniature Swine by Donor Kidney Cotransplantation (Am J Transplant. 2013 Oct;13(10):2558-66.)

Hintergrund

Nachdem es gelungen war, im MHC-Klasse I mismatch Modell durch eine 12-tägige Therapie mit hochdosiertem Cyclosporin A Toleranz gegenüber Spenderherzen durch Nieren-Cotransplantation zu erzeugen, versuchten wir dies auch in einem Modell mit MHC-Klasse I + II (full) mismatch zwischen Spender und Empfänger zu reproduzieren, um das Modell klinisch relevanter zu gestalten.

Methoden

Herz und Nieren (n=5) von DD-Spendern wurden in CC-Empfänger heterotop abdominell transplantiert. In der Kontrollgruppe wurden nur Herzen transplantiert (n=3). Es wurde 12 Tage Tacrolimus mit Zielspiegeln von 30-50 ng/ml i.v. appliziert, danach wurde die Immunsuppression gestoppt.

Ergebnisse

Alle isolierten Herzen wurden bis zum 40. Tag komplett abgestoßen. Wenn Herz und Niere zusammen transplantiert wurden, überlebten die Transplantate >200 Tage (bis zur elektiven Terminierung des Experiments) ohne Anzeichen einer Abstoßung (Tab. 1). Dies wurde durch regelmäßige Myokardbiopsien gesichert (Fig. 1). Im Serum konnten keine gegen den Spender gerichteten Antikörper detektiert werden, und *in vitro* assays zeigten sich areaktiv gegen spenderspezifische Antigene (aber reaktiv gegen Antigene Dritter).

Table 1: Histology and survival of cardiac allografts in recipients of MHC-mismatched isolated hearts or combined heart/kidney transplants treated with 12 days of tacrolimus

Organ(s) transplanted	SLA mismatches		Heart allograft histology at week ¹														Graft survival (days)	
	Donor	Recipient	3	4	5	8	9	13	14	27	30	32	34	36	38	41		44
Heart	DD	CC	–	–	3R	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	35
Heart	DD	CC	2R	3R	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	32
Heart	DD	CC	3R	3R	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	18
Heart and kidney	DD	CC	–	0	–	–	0	0	–	–	–	–	–	–	–	0	–	>295
Heart and kidney	DD	CC	–	–	0	1R	–	–	0	–	–	–	0	–	0	–	0	>284 ²
Heart and kidney	DD	CC	0	–	–	0	–	–	0	0	–	–	–	–	–	–	–	>272 ³
Heart and kidney	DD	CC	–	0	–	1R	–	–	0	–	0	0	–	–	–	–	–	223 ⁴
Heart and kidney	DD	CC	–	0	–	1R	–	–	0	–	–	–	–	–	–	–	–	100 ⁵

CAV, cardiac allograft vasculopathy; ISHLT, Society for Heart and Lung Transplantation; MHC, major histocompatibility complex; POD, postoperative day; SLA, swine lymphocyte antigen.

¹Grading of rejection from 0 (no rejection) to 4 (severe rejection) based on ISHLT scoring system (9).

²Underwent donor kidney graftectomy on POD 211.

³Underwent donor kidney graftectomy on POD 156.

⁴Animal was sacrificed on POD 223 to examine the heart allograft for cardiac allograft vasculopathy.

⁵Heart allograft fibrillated during POD100 biopsy and could not be defibrillated but no rejection was seen in necropsy specimens.

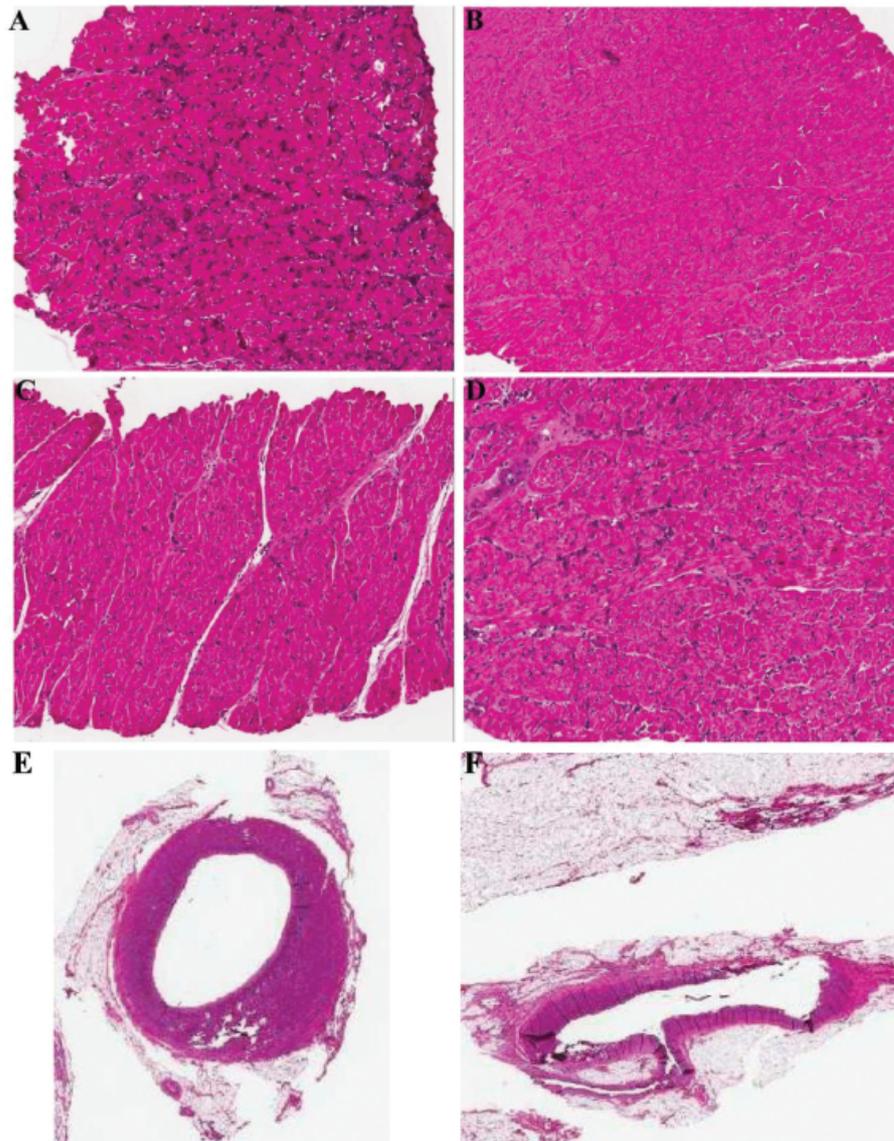


Figure 1: Histology from heart biopsies. (A) Heart biopsy at POD 29 after heart alone transplant showing ISHLT 3R (animal #21109). (B–D) Serial heart biopsies of tolerant animal, #20977, at POD 25 (B), POD 60 (C) and POD 189 (D). (E and F) Heart biopsy of long-term tolerant animal, #21016, showing no cardiac allograft vasculopathy in the left main coronary artery (E) or in the left anterior descending coronary artery (F). ISHLT, Society for Heart and Lung Transplantation; POD, postoperative day.

Diskussion

Nach der erfolgreichen Induktion von Toleranz gegenüber Herzen durch kombinierte Herz-Nieren-Tx im MHC-Klasse I mismatch-Modell ist dies nun auch bei vollem MHC mismatch gelungen. Unklar bleibt, welcher Nieren-spezifische Zelltyp diesen Mechanismus vermittelt. In

Frage kommen RTECs (renal tubular epithelial cells), die T-Effektorzellen in Tregs konvertieren können und damit die Balance der Immunantwort von Abstoßung in Richtung Toleranz verschieben können.^{20, 21} Auch plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) können regulierende T-Zellen generieren.^{22, 23}

Schlussfolgerung

Toleranz gegenüber Spenderherzen durch Nieren-Cotransplantation kann auch im klinisch relevanten Modell (MHC-Klasse I + II mismatch) reproduzierbar induziert werden.

2.2.2 Effects of Lung Cotransplantation on Cardiac Allograft Tolerance Across a Full Major Histocompatibility Complex Barrier in Miniature Swine (Am J Transplant. 2016 Mar;16(3):979-86.)

Hintergrund

Um herauszufinden, ob Lungen die gleiche Fähigkeit wie Nieren haben, Toleranz gegenüber Herzen zu induzieren, führten wir kombinierte Herz-Lungen-Transplantationen mit demselben Therapieregime durch.

Methoden

Eine linksseitige Einzellungentransplantation wurde mit einer heterotop abdominalen Herztransplantation vom selben Spender kombiniert (n=3). Das immunsuppressive Regime bestand wieder aus 12 Tagen Tacrolimus i.v. mit Zielspiegeln von 30-50 ng/ml.

Ergebnisse

Sowohl die Herzen als auch die Lungen wurden abgestoßen (Tag 47, 55, 202). Im Gegensatz zu den Nieren waren die Lungen nicht in der Lage, immunologische Toleranz auf die Herzen zu übertragen.

Diskussion

Es scheint eine Nieren-*spezifische* Zelle oder ein Zellprodukt zu geben, die/das in der Lage ist, Toleranz auf Herzen zu übertragen.

Schlussfolgerung

Lungen haben nicht dasselbe tolerogene Potential wie Nieren.

2.2.3 Kidney-Induced Cardiac Allograft Tolerance in Miniature Swine is Dependent on MHC-Matching of Donor Cardiac and Renal Parenchyma (Am J Transplant. 2015 Jun;15(6):1580-90.)

Hintergrund

Diese Arbeit versuchte herauszufinden, welcher Zelltyp der Niere (Parenchym oder passender leukocytes) für die Vermittlung von KICAT (kidney-induced cardiac allograft tolerance) verantwortlich ist.

Methoden

Es wurden kombinierte Herz-Nieren-Transplantationen mit verschiedenen MHC-Kombinationen (Gruppeneinteilung siehe Tabelle 1) durchgeführt. Die Immunsuppression bestand aus 12 Tagen Tacrolimus i.v. (30-50 ng/ml). Die Nieren aus Gruppe 3 und 4 stammten von chimären Tieren, d.h. die vor der Transplantation durchgeführten Biopsien der

Spendernieren wiesen sowohl MHC-Moleküle vom Typ ihres eigenen Parenchyms als auch eine hohe Anzahl an graft-infiltrating leukocytes (MHC vom ursprünglichen Spender) auf.

Ergebnisse

Table 1: Histology and survival of cardiac allografts in recipients of co-transplanted heart and kidney allografts

Group	Animal #	Mismatched cell type ¹	MHC mismatches					Heart allograft histology ² at week										Heart graft survival (days) ³	Kidney allograft histology ⁴
			Donor		Kidney	Recipient													
			Heart	Parenchyma			Passengers	3	4	10	13	14	15	20	22	25	>35		
1	21421	PCs & PLs	DD	AA	AA	CC	3R											28	3
	21892	PCs & PLs	AA	DD	DD	CC	3R											32	1
	21737	PCs & PLs	AA	DD	DD	CC	2R	3R										35	3
2 ⁵	21019	none	DD	DD	DD	CC		0	0	0							0	>295	0
	21018	none	DD	DD	DD	CC		0	1R		0						0	>284	0
	20977	none	DD	DD	DD	CC		0		0	0						0	>272	0
3	21407	PCs alone	AC	AD	AC	AD	2R			2R		1R						110	0
	21419	PCs alone	AC	AD	AC	AD	3R											40	0
	21501	PCs alone	CC	AA	CC	AA	3R											26	0
4	21266	PLs alone	AD	AD	AC	AC		0			0			0	0	0	0	>254 ⁶	0
	21270	PLs alone	AD	AD	AC	AC	1R		1R		0				0			>160 ⁷	0
	21517	PLs alone	AD	AD	AC	AC		0	1R				0					>150	0

Animal #21407 and #21266 received chimeric kidneys from animal #20311. Animal #21419 and #21270 received chimeric kidneys from animal #20680. Animal #21501 received a chimeric kidney from animal #20407. Animal #21517 received a chimeric kidney from animal #21557.

¹PC, parenchyma cells; PL, passenger cells.

²Grading of acute rejection from 0 (no rejection) to 3 (severe rejection) based on ISHLT scoring system (28).

³Heart graft survival is significantly different between groups 1 versus 2; 1 versus 4; and 3 versus 4 ($p < 0.05$, two-tailed Student's *t* test). Heart graft survival is not significantly different between groups 1 versus 3 and 2 versus 4 ($p > 0.05$, two-tailed Student's *t* test).

⁴Grading of T cell-mediated rejection from 0 (no rejection) to 3 (severe rejection) based on Banff classification (29) on kidney allografts at time of cardiac allograft rejection, kidney allograft removal, or euthanasia.

⁵Previously published results (2).

⁶Underwent donor kidney graftectomy on POD 141. Animal was sacrificed on POD254 to obtain final pathology.

⁷Underwent donor-matched VCA transplantation on POD 131, sacrificed on POD160 since VCA rejected.

KICAT entsteht nur, wenn MHC-matching von Spenderherz und Spenderniere gegeben ist.

Werden chimäre Nieren mit Herzen co-transplantiert, so ist es erforderlich, dass die Parenchymzellen von Herz und Niere MHC gleich sind damit Toleranz entsteht. MHC-matching der passenger leukocytes der Niere mit dem Parenchym des Herzens führt zur Abstoßung.

Diskussion

Ein möglicher Mechanismus der Toleranzinduktion in diesem Modell ist die TGF β -vermittelte Produktion von FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen durch RTECs (renal tubular

epithelial cells). Die mögliche Rolle von passenger leukocytes (z.B. dendritische Zellen) bei der Induktion peripherer Toleranz ist aber in der Literatur ebenfalls belegt (s.a. *liver effect*, Calne et al. ²⁴). Eine alternative Interpretation unserer Daten in Bezug auf passenger leukocytes wäre, dass Abstoßung immer dann auftritt, wenn sie nicht vom selben MHC-Typ wie der Empfänger sind, und Toleranz induziert werden kann, wenn passenger leukocytes mit dem Empfänger MHC-gematcht sind. Die folgende Arbeit im Lungenmodell beschäftigt sich näher mit dieser These. ²⁵

Schlussfolgerung

Diese Daten implizieren, dass KICAT in irgendeiner Weise von Parenchymzellen der Niere (Tubulusepithelzellen (RTECs) oder Endothelzellen) vermittelt wird und dass die verantwortliche Komponente mit dem Spenderherz MHC-gleich sein muss.

2.2.4 Recipient-Matching of Passenger Leukocytes Prolongs Survival of Donor Lung Allografts in Miniature Swine (Transplantation. 2015 Jul;99(7):1372-8.)

Hintergrund

Die Rolle der passenger leukocytes bei der Abstoßung sollte in einem präklinischen Lungentransplantationsmodell untersucht werden.

Methoden

Es wurden 6 orthotope Einzellungentransplantationen (links) unter dem Schutz von 12 Tagen Hochdosis-CyA (Spiegel: 400-800ng/ml) durchgeführt. Spender und Empfänger wiesen einen single-haplotype full (MHC I und MHC II)-mismatch auf, wobei in Gruppe 1 die MHC-

Moleküle der passenger leukocytes vom Empfängertyp waren (n=3, Verwendung von chimären Spendertieren). In Gruppe 2 (n=3) wiesen sowohl die MHC-Moleküle des Parenchyms als auch die der passenger leukocytes einen MHC-Klasse I und II mismatch zum Empfänger auf (Tab. 2).

Ergebnisse

TABLE 2.

Histology and survival of lung allografts in recipients of single-haplotype MHC-mismatched lung transplants treated with 12 days of cyclosporine

Group	Animal (recipient)	Animal (donor)	MHC mismatches		Lung allograft histology ^a at week								Graft survival, d	
			Recipient	Donor	3	4	5	7	9	11	12	14		22
1	20557	20313	AC	AD parenchyma	1			2/3		4				80
	21264	20311		AC passengers			1		1			1	4	156
	21762	21557				1				3		4		85
2	21516	21610	AC	AD parenchyma	0				4					64
	21280	21098		AD passengers		4								29
	21797	21611				0		4						41

^a Grading of rejection from 0 (none) to 4 (severe), based on the International Society for Heart and Lung Transplantation classification of pulmonary allograft rejection.¹¹

Das Transplantatüberleben war signifikant verlängert, wenn die passenger leukocytes vom selben MHC-Typ waren wie der Empfänger.

Diskussion

Ob passenger leukocytes, die mit dem Spenderorgan auf den Empfänger übertragen werden, positive oder negative Effekte auf das Transplantatüberleben haben, ist nach wie vor Gegenstand der wissenschaftlichen Debatte. In manchen Berichten ist der entstehende periphere „Mikrochimerismus“ assoziiert mit einer Transplantatdysfunktion²⁶ in anderen mit spenderspezifischer Hyporeaktivität.²⁷

Schlussfolgerung

Wir konnten in diesem präklinischen Großtiermodell einen positiven Effekt des MHC-matchings von passender Leukozyten und Empfänger auf das Transplantatüberleben feststellen.

2.2.5 Immunomodulatory Strategies Directed Toward Tolerance of Vascularized Composite Allografts (Transplantation. 2015 2015 Aug;99(8):1590-7.)

Hintergrund

Im Gegensatz zur Herz- oder Lungentransplantation handelt es sich bei der Transplantation von vascularized composite allografts (VCAs, z.B. Gesichts- oder Handtransplantation) nicht um einen lebensrettenden, sondern lediglich um einen Eingriff, der die Lebensqualität verbessert. Die notwendige chronische Gabe von Immunsuppressiva ist hier also besonders kritisch zu sehen. Umso wichtiger wäre hier die Induktion immunologischer Toleranz gegenüber dem Spendergewebe. In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob es gelingt, Toleranz von VCAs bei vollem MHC-mismatch ohne gemischten hämatopoietischen Chimerismus (Risiko von Graft-versus-host disease) zu erzielen, sondern nur durch immunmodulatorische (regulatorische) Maßnahmen.

Methoden

Es wurde versucht, in Langzeit-tolerante Herz-/Nieren-Empfänger VCAs ohne weitere Immunsuppression zu transplantieren.

Ergebnisse

TABLE 1.

Survival of vascularized composite allografts

Group	VCA MHC Disparity	Animal no.	MHC of allografts				VCA Survival, d	
			Heart	Donor		Recipient	Epidermis	Dermis/Muscle
				Kidney	VCA			
1 ^a	Class I	19842	—	GG	GG	DD	40	accepted
		19941	—	GG	GG	DD	28	accepted
		20652	—	GG	GG	DD	30	accepted
2 ^b	Class I	18954	—	GG, GG	GG	DD	>200	accepted
		18958	—	GG, GG	GG	DD	85	accepted
		18955	—	GG, GG	GG	DD	45	accepted
3	One haplotype, class I and II	21270	AD	AD	AD	AC	15	29
		21517	AD	AD	AD	AC	13	31
4	Two haplotype, class I and II	21740	DD	DD	DD	CC	14	35
		22025	DD	DD	DD	CC	30	30

^a Group 1 animals previously published in Cetrulo et al.²³ Group 1 animals received a class I-mismatched VCA transplant less than 70 days after primary kidney transplant.

^b Group 2 animals previously published in Cetrulo et al.²³ Group 2 animals received a class I-mismatched VCA transplant at least 100 days after kidney retransplantation, without further immunosuppression (i.e., >200 days after primary transplantation).

Bei vollem MHC mismatch (one haplotype=Gruppe 3 und two haplotype=Gruppe 4) kommt es innerhalb von 35 Tagen zur Abstoßung von Dermis und Muskel. Bei MHC Klasse I mismatch werden Dermis und Muskel des VCAs akzeptiert.

Diskussion

Gewebe-spezifische Antikörper (*minor antigens*) könnten dafür verantwortlich sein, dass VCAs weniger tolerogen als Nieren sind.

Schlussfolgerung

Immunmodulatorische Maßnahmen alleine reichen nicht aus, um Toleranz von VCAs bei vollem MHC-mismatch zu erzielen. Toleranz von VCAs (speziell der Hautkomponente) ist schwieriger zu erzielen als Toleranz von Nieren und Herzen.

3. Klinischer Anteil des Habilitationsprojektes

3.1 Arbeiten zur Herztransplantation

3.1.1 Renal recovery after conversion to an everolimus-based immunosuppression in early and late heart transplant recipients: a 12-month analysis (*Exp Clin Transplant.* 2013 Oct;11(5):429-34.)

Hintergrund

Calcineurininhibitor-induzierte Nephrotoxizität reduziert das Langzeitüberleben nach Herztransplantation. Wir untersuchten in dieser retrospektiven Studie den Effekt des Proliferation signal inhibitors (PSI) Everolimus (EVL) auf die Nierenfunktion nach Herztransplantation.

Methoden

24 Patienten mit einer eingeschränkten Kreatinin-Clearance (<60ml/min) wurden von der Standard Immunsuppression bestehend aus Tacrolimus (Tac)/Mycophenolatmofetil (MMF) umgestellt auf niedrigdosiertes Tac (3-5ng/ml) mit EVL (4-6ng/ml), wenn die Herztransplantation weniger als 1 Jahr zurücklag (Gruppe 1, n=13) und auf EVL (6-10ng/ml) mit MMF (1,5-4µg/ml), wenn die Herztransplantation länger als 1 Jahr zurücklag (Gruppe 2, n=11).

Ergebnisse

Table 3. Time Course of Mean (\pm SD) Serum Creatinine and Creatinine Clearance by Group

	Group 1 (Tac/EVL) (n=13)	Group 2 (EVL/MMF) (n=11)
Serum creatinine (μ mol/L) baseline	221.0 \pm 70.7	247.5 \pm 79.6
Month 3	168.0 \pm 53.0*	168.0 \pm 53.0*
Month 6	159.1 \pm 44.2*	159.1 \pm 61.9†
Month 9	159.1 \pm 44.2†	159.1 \pm 44.2†
Month 12	159.1 \pm 44.2*	159.1 \pm 44.2†
CrCl (mL/s) baseline	0.75 \pm 0.45	0.57 \pm 0.23
Month 3	0.98 \pm 0.47	0.84 \pm 0.37*
Month 6	1.00 \pm 0.45*	0.94 \pm 0.37†
Month 9	1.01 \pm 0.44†	0.93 \pm 0.28†
Month 12	1.01 \pm 0.50*	0.93 \pm 0.38†

Abbreviations: CrCl, creatinine clearance; EVL, everolimus; MMF, mycophenolate mofetil; Tac, tacrolimus

* $P < .01$ for paired analysis with baseline

† $P < .05$ for paired analysis with baseline

In beiden Gruppen konnte der Kreatininwert signifikant gesenkt werden (siehe Tabelle).

Diskussion

Die Strategie, auf den Calcineurininhibitor erst nach dem ersten Jahr nach HTx zu verzichten erwies sich auch in anderen Studien. So kann die Nierenfunktion verbessert werden, ohne Kompromisse bei der immunsuppressiven Sicherheit (keine erhöhte Inzidenz von Abstoßungen) eingehen zu müssen. Die „Heart Spare the Nephron Trial“, wo Patienten bereits 12 Wochen nach HTx auf CNI-freie Immunsuppression umgestellt wurden, musste aufgrund einer stark erhöhten Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen vorzeitig abgebrochen werden.²⁸

Schlussfolgerung

Der Einsatz von EVL erlaubt die Reduktion bzw. den Verzicht auf einen Calcineurininhibitor und kann so die Nierenfunktion der Herztransplantierten signifikant verbessern. Es besteht jedoch eine aufgrund des Nebenwirkungsprofils (v.a. Ödeme und Ergüsse) eine relativ hohe Konversionsrate (5 von 24 Patienten).

3.1.2 Impact of donor and recipient sex on outcome (*Curr Opin Organ Transplant.* 2011 Oct;16(5):543-7.)

Hintergrund

Der Einfluss des Geschlechtes auf das Ergebnis nach Herztransplantation wird kontrovers diskutiert. Ziel dieser Arbeit war es, die aktuelle Literatur zusammenzufassen und die Ergebnisse des eigenen Zentrums mit über 1000 Patienten mit einfließen zu lassen.

Ergebnisse

Table 1 One-year survival (International Society for Heart and Lung Transplantation database) in different sex combinations

	Male recipient	Female recipient
Male donor	84%	83%
Female donor	79%	82%

Table 2 Fifteen-year survival (International Society for Heart and Lung Transplantation database) in different sex combinations

	Male recipient	Female recipient
Male donor	36%	39%
Female donor	33%	41%

Die Kombination männlicher Empfänger/weiblicher Spender erhöht die Mortalität in der früh postoperativen Phase. Langfristig überleben am besten weibliche Empfänger von weiblichen Spenderherzen. Weibliche Empfänger männlicher Spenderherzen haben häufiger zelluläre Abstoßungsreaktionen.

Schlussfolgerung

Gleichgeschlechtliche Herztransplantationen wären theoretisch vorteilhaft, sind aber wegen der längeren Wartezeit nicht umsetzbar. Die Kombination weiblicher Spender/männlicher Empfänger muss sorgfältig von Fall zu Fall evaluiert werden.

3.2 Arbeiten zu Herzunterstützungssystemen

3.2.1 Modified implantation technique for the Berlin Heart EXCOR assist device in adults (Artif Organs. 2012 Mar;36(3):E48-52.)

Hintergrund

36 Patienten erhielten das Berlin Heart EXCOR Unterstützungssystem (VAD, ventricular assist device) als bridge-to-transplantation bei terminaler Herzinsuffizienz mit beginnendem Multiorganversagen. Hierbei wurde eine modifizierte Implantationstechnik angewendet, um Blutungskomplikationen und Ansaugphänomene zu vermeiden.

Technik

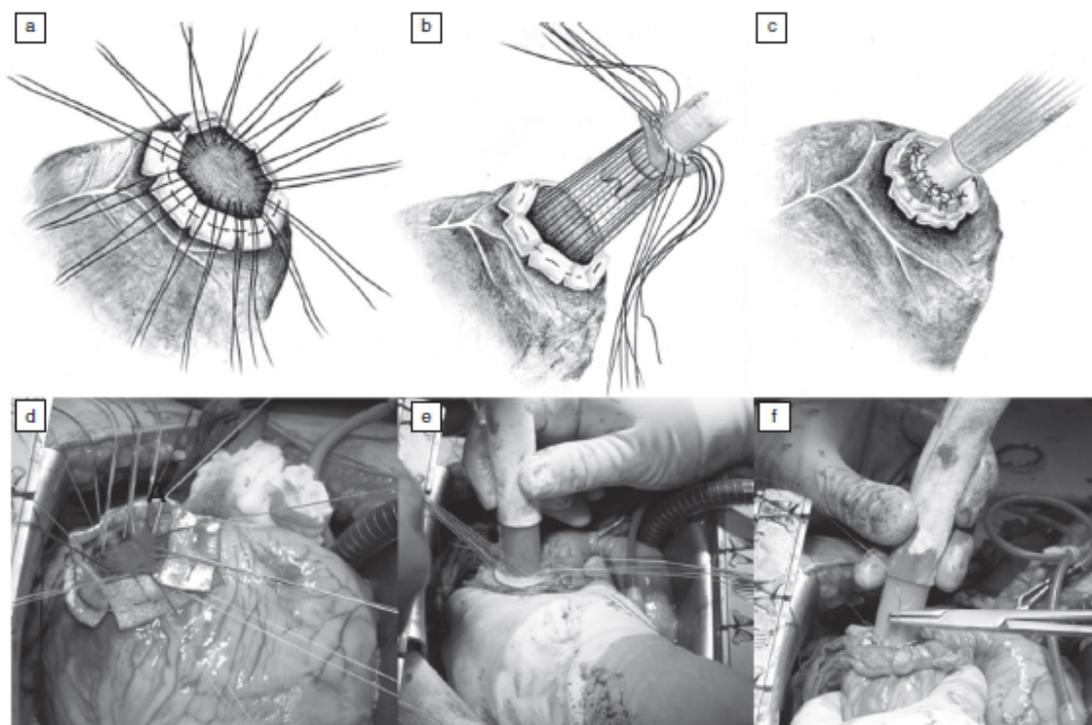


FIG. 1. Scheme of the procedure: (a, d) A PTFE-felt ring consisting of six to eight PTFE-felt pledgets is created using U-sutures. (b, e) The U-sutures are passed through the patch-reinforced suture ring and the cannula is pushed down on the sutures. (c, f) A continuous suture is placed through the cannula suture ring, through the myocardium, and through the pledgets of the previous mattress sutures for reinforcement.

TABLE 1. Summary of the differences between new and conventional implantation technique

New technique	Conventional technique/purpose
1. OPCAB Medtronic Octobase Sternal Retractor	To facilitate surgery through minimizing the number of clamps and holding sutures
2. Deep pericardial traction sutures to mobilize the LV apex out of the pericardium	Manipulation of the heart can be reduced or avoided
3. Crown-shaped apex cannula (C27A-003) instead of the round-shaped apex cannula (C22A-004)	Reduction of suction phenomena
4. Continuous felt ring consisting of six to eight large PTFE-felt pledgets	Improvement of sealing characteristics vs. interrupted pledget felts
5. Pericardial patch between myocardium and LV and RA cannulas	Improvement of sealing characteristics and avoidance of bleeding through needle holes
6. MEDOS arterial cannula for cannulation of the aorta and PA	Cannulas provided by Berlin Heart are too stiff and rigid Advantages: <ul style="list-style-type: none"> • Easier and safe anastomosis of the aorta and PA due to the Vascutek graft portion • High flexibility of the MEDOS cannula ensures a clear operation field • Vascutek graft portion can be used for the arterial cannulation during cardiac transplantation Disadvantages: <ul style="list-style-type: none"> • Roughened velour sheathing of the Berlin Heart arterial cannula ensures better ingrowth and thus a better infection barrier
7. GoreTex Pericardial Membrane covering the assist device cannulas	Avoidance of adhesions thus simplifying following surgical procedures

Diskussion

Durch die dargestellten Modifikationen konnte die Rethorakotomierate wegen Blutung bei dieser Prozedur in unserem Zentrum reduziert werden (nur 4 von 36 Patienten). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund, dass die meisten der Patienten mit beginnendem Leberversagen (reduzierter Spontanquickwert) und daher eingeschränkter Gerinnung operiert wurden als Erfolg zu werten.

3.2.2 Surgical strategy for biventricular assist device implantation after previous coronary artery bypass grafting (Heart Surg Forum. 2011 Aug 1;14(4):E258-60.)

Hintergrund

Die Implantation eines biventrikulären Unterstützungssystems nach stattgehabter Bypassoperation im Endstadium einer ischämischen Kardiomyopathie ist eine hochriskante Operation. Wir versuchten, die Implantationstechnik zu vereinfachen, um die Morbidität und Mortalität dieses Eingriffs zu reduzieren.

Technik

Surgical Concept for Implantation of a Biventricular Assist Device after Previous Coronary Artery Bypass Graft

1. Femoral cannulation and starting cardiopulmonary bypass
2. (Re-)Sternotomy
3. Dissection of the right and left atria, aorta, and small parts of the right ventricle
4. Implantation of the left (Medos Medizintechnik AG, Stolberg, Germany) and right (Berlin Heart GmbH, Berlin, Germany) atrial cannulae
5. Anastomosis of the arterial cannula (Medos) to the aorta
6. Purse-string suture (pledget-enforced) on the right ventricular out-flow tract and insertion of the arterial cannula
7. Start of the assist device and weaning from cardiopulmonary bypass
8. Hemostasis and (eventually) chest closure

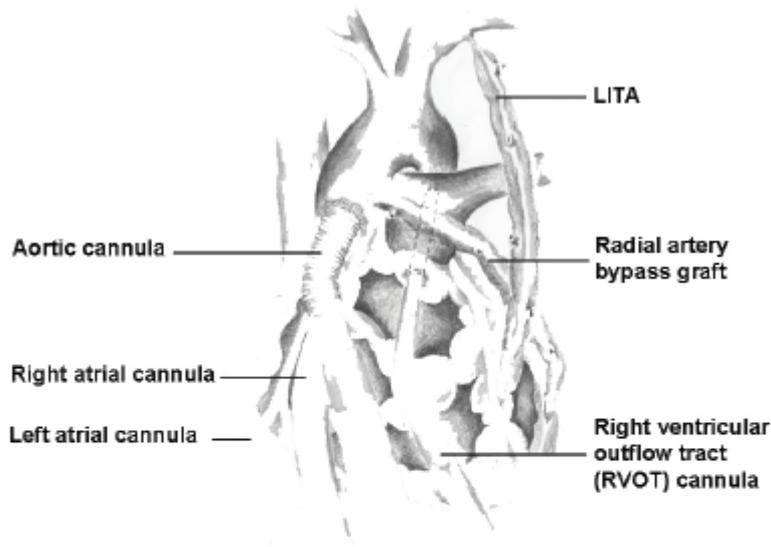


Figure 2. Intraoperative view of the connection sites of a Berlin Heart Excor® (Berlin Heart GmbH, Berlin, Germany) biventricular assist device (BVAD) in a patient with 2 patent arterial bypass grafts (left interior thoracic artery [LITA] to left anterior descending artery [LAD] and radial artery to a diagonal branch).

Diskussion

Bei diesem Eingriff geht es darum, möglichst wenige Strukturen zu verletzen. Daher werden nur die vier Implantationsziele freipräpariert und in diesem Fall, wenn möglich auch der linke Vorhof, statt des linken Ventrikels für die inflow Kanüle verwendet, da so die Ventrikelspitze nicht freipräpariert werden muss (Fig. 2). Besonders der Verzicht auf die Freipräparation der äußerst fragilen Arteria pulmonalis und stattdessen die Kanülierung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes reduziert die Blutungsgefahr erheblich.

3.2.3 Use of the Urchin® heart positioner facilitates insertion of the HeartWare® device for biventricular application (Case Studies in Surgery 2016;2(1):69-70.)

Hintergrund

Wir berichten über eine neue Technik zur Vereinfachung der Implantation von ventrikulären Unterstützungssystemen mit kontinuierlichem Blutfluss, z.B. Heart Ware®).

Technik

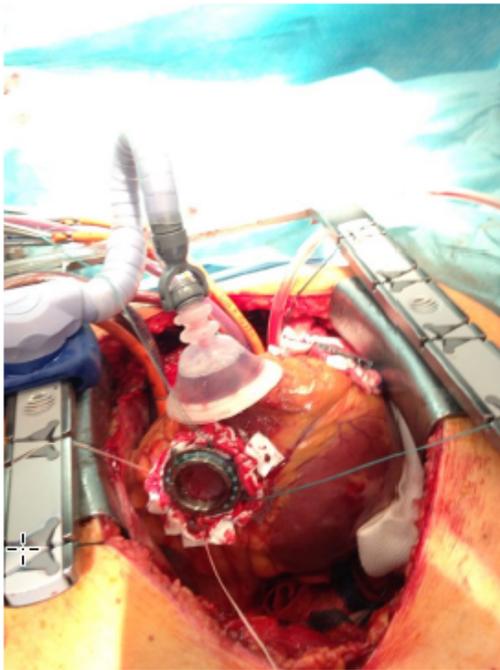


Figure 1. Urchin® suction device to facilitate exposure to insert LVAD and/or RVAD

Diskussion

Durch die Verwendung von Saugglocken, die ursprünglich für die Koronarchirurgie am schlagenden Herzen entwickelt worden sind, lassen sich die Blutpumpen einfacher und präziser im Ventrikel positionieren, und spätere Ansaugphänomene beim Betrieb der Unterstützungssysteme werden vermieden.

3.2.4 Use of methylene blue in the treatment of refractory vasodilatory shock after cardiac assist device implantation: report of four consecutive cases (J Clin Med Res. 2012 Jun;4(3):212-5.)

Hintergrund

Das Vasoplegiesyndrom ist eine gefürchtete Komplikation nach herzchirurgischen Eingriffen. Besonders hoch ist die Inzidenz nach der Implantation von Herzunterstützungssystemen.²⁹ Die konventionelle vasokonstriktorische Therapie mit Noradrenalin und Vasopressin kann den systemischen Widerstand oft nicht schnell und anhaltend genug erhöhen, sodass der Perfusionsdruck lebenswichtiger Organe zu niedrig ist, und die Patienten im Multiorganversagen versterben. Eine zusätzliche therapeutische Option ist in dieser Situation der Guanylatzyklase-Inhibitor Methylenblau, der die NO-vermittelte Vasodilatation hemmt.

Methoden

Wir berichten über vier Patienten, die nach assist device Implantation bei therapierefraktärem Vasoplegiesyndrom 2 mg/kg Körpergewicht Methylenblau i.v. erhielten.

Ergebnisse

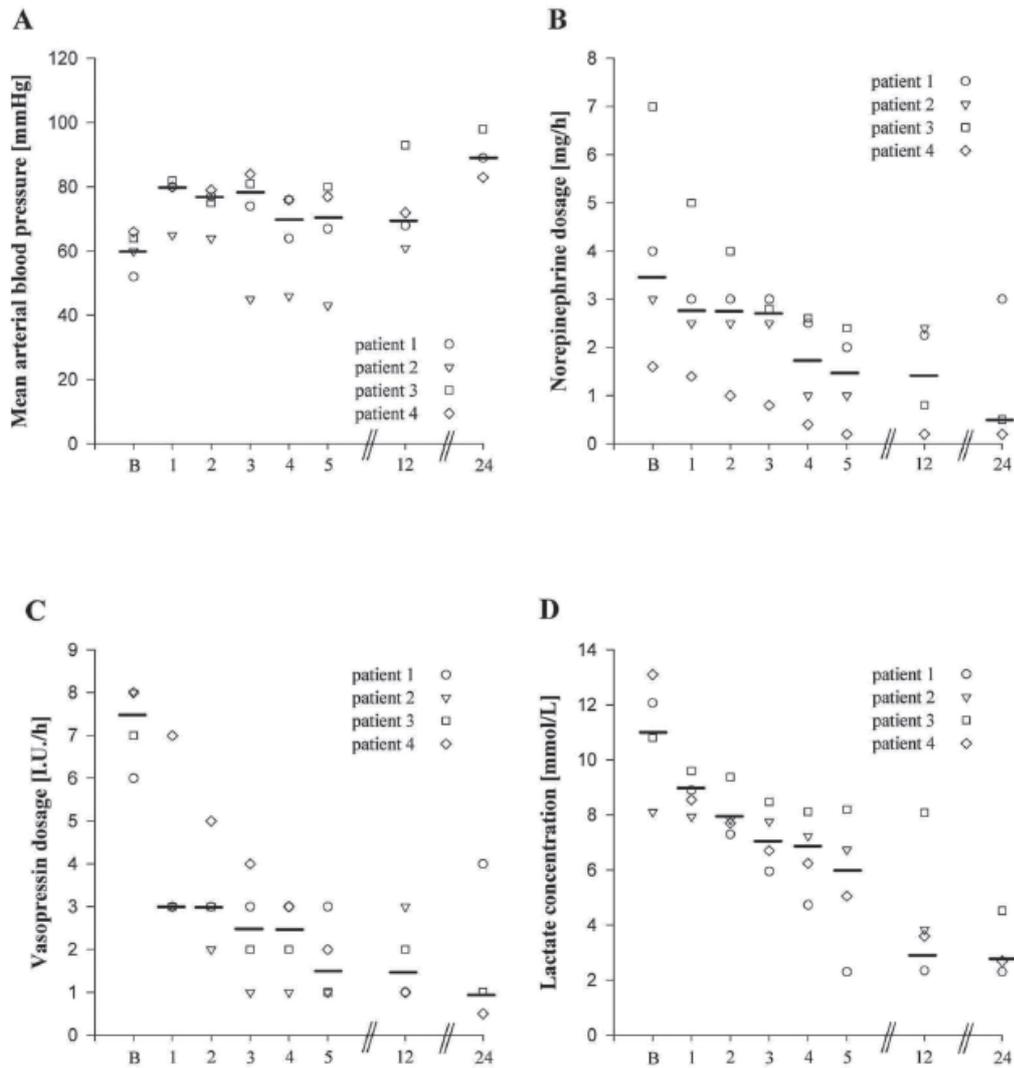


Figure 1. Individual and median values of mean arterial blood pressure (panel A), norepinephrine dosage (panel B), vasopressin dosage (panel C), and serum lactate concentration (panel D) before (B) and 1, 2, 3, 4, 5, 12, and 24 hours after a single dose administration of methylene blue (2 mg/kg body weight).

Wir konnten eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks, eine Senkung der Lactatwerte sowie eine Reduktion der Noradrenalin- und Vasopressindosierungen erreichen (Fig. 1).

Diskussion

Durch die hemmenden Effekte im NO-Signalweg ist Methylenblau ein effizientes Zusatztherapeutikum im katecholaminrefraktären Vasoplegiesyndrom nach assist device-Implantation.

4. Literaturverzeichnis

1. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report--2006. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25(8):869-79.
2. Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, et al. Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant* 2014; 14(7):1599-611.
3. Gaudin PB, Rayburn BK, Hutchins GM, et al. Peritransplant injury to the myocardium associated with the development of accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients. *Am J Surg Pathol* 1994; 18(4):338-46.
4. Taylor DO, Stehlik J, Edwards LB, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Heart Transplant Report-2009. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28(10):1007-22.
5. Keon WJ, Hendry PJ, Taichman GC, et al. Cardiac transplantation: the ideal myocardial temperature for graft transport. *Ann Thorac Surg* 1988; 46(3):337-41.
6. Horch DF, Mehltitz T, Laurich O, et al. Organ transport temperature box: multicenter study on transport temperature of organs. *Transplant Proc* 2002; 34(6):2320.
7. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report--2012. *J Heart Lung Transplant* 2012; 31(10):1052-64.
8. Spitzer TR, Delmonico F, Tolckoff-Rubin N, et al. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999; 68(4):480-4.
9. Buhler LH, Spitzer TR, Sykes M, et al. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 2002; 74(10):1405-9.
10. Johnston DR, Muniappan A, Hoerbelt R, et al. Heart and en-bloc thymus transplantation in miniature swine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130(2):554-9.
11. Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* 2005; 11(1):32-4.
12. Guenther DA, Madsen JC. Advances in strategies for inducing central tolerance in organ allograft recipients. *Pediatric Transplantation* 2005; 9(3):277-281.
13. Sachs DH, Leight G, Cone J, et al. Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation* 1976; 22(6):559-67.

14. Rosengard BR, Ojikutu CA, Guzzetta PC, et al. Induction of specific tolerance to class I-disparate renal allografts in miniature swine with cyclosporine. *Transplantation* 1992; 54(3):490-7.
15. Madsen JC, Yamada K, Allan JS, et al. Transplantation tolerance prevents cardiac allograft vasculopathy in major histocompatibility complex class I-disparate miniature swine. *Transplantation* 1998; 65(3):304-13.
16. Utsugi R, Barth RN, Lee RS, et al. Induction of transplantation tolerance with a short course of tacrolimus (FK506): I. Rapid and stable tolerance to two-haplotype fully mhc-mismatched kidney allografts in miniature swine. *Transplantation* 2001; 71(10):1368-79.
17. Madariaga ML, Michel SG, Tasaki M, et al. Induction of cardiac allograft tolerance across a full MHC barrier in miniature swine by donor kidney cotransplantation. *Am J Transplant* 2013; 13(10):2558-66.
18. Shoji T, Muniappan A, Guenther DA, et al. Long-term acceptance of porcine pulmonary allografts without chronic rejection. *Transplant Proc* 2005; 37(1):72-4.
19. Shoji T, Sahara H, Muniappan A, et al. An MHC class II disparity raises the threshold for tolerance induction in pulmonary allografts in miniature swine. *Transplant Proc* 2006; 38(10):3268-70.
20. Amarnath S, Mangus CW, Wang JC, et al. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2011; 3(111):111ra120.
21. Frasca L, Marelli-Berg F, Imami N, et al. Interferon-gamma-treated renal tubular epithelial cells induce allospecific tolerance. *Kidney Int* 1998; 53(3):679-89.
22. Gehrie E, Van der Touw W, Bromberg JS, et al. Plasmacytoid dendritic cells in tolerance. *Methods Mol Biol* 2011; 677:127-47.
23. Ochando JC, Homma C, Yang Y, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006; 7(6):652-62.
24. Calne RY. Immunological tolerance--the liver effect. *Immunol Rev* 2000; 174:280-2.
25. Madariaga ML, Michel SG, La Muraglia GM, 2nd, et al. Recipient-matching of Passenger Leukocytes Prolongs Survival of Donor Lung Allografts in Miniature Swine. *Transplantation* 2015; 99(7):1372-8.
26. Schlitt HJ, Hundrieser J, Ringe B, et al. Donor-type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330(9):646-7.
27. Reinsmoen NL, Jackson A, McSherry C, et al. Organ-specific patterns of donor antigen-specific hyporeactivity and peripheral blood allogeneic microchimerism in lung, kidney, and liver transplant recipients. *Transplantation* 1995; 60(12):1546-54.
28. J. Hunt HBn, R.C. Starling, G. Rabágo, N.R. Banner, J. Kobashigawa, A. Keogh, R. Kormos, M. Mehra, T. Wahlers, J. Noeldeke. Premature termination of a prospective, open label, randomized, multicenter study of sirolimus to replace calcineurin inhibitors (CNI) in a standard care regimen of CNI, MMF and corticosteroids early after heart transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2007; 26(Supp 2):S203.

29. Argenziano M, Chen JM, Choudhri AF, et al. Management of vasodilatory shock after cardiac surgery: identification of predisposing factors and use of a novel pressor agent. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116(6):973-80.

5. Danksagung

Mein vornehmlichster Dank gilt meinem Chef und Mentor, Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagl, Direktor der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für seine kontinuierliche materielle und ideelle Unterstützung sowie für die Möglichkeit, an seiner Klinik mit Hilfe einer Freistellung für meinen wissenschaftlichen Auslandsaufenthalt habilitieren zu können.

Für die Vergabe eines Stipendiums zur Finanzierung meines 2-jährigen Auslandsaufenthaltes an der *Harvard Medical School* bedanke ich mich bei der *American Society of Transplant Surgeons*.

Großen Dank schulde ich meinen Mentoren am *Massachusetts General Hospital*, allen voran Joren Madsen MD, DPhil und James Allan MD, die mich wissenschaftlich rundum hervorragend betreuten und mir bei den Herz- und Lungentransplantationen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Kazuhiko Yamada MD, PhD danke ich recht herzlich für die Durchführung der Nierentransplantationen bei meinen Versuchen. Für die zahlreichen interessanten immunologischen Diskussionen und die herzliche Aufnahme im *Transplantation Biology Research Center* bin ich David Sachs MD zu Dank verpflichtet. Besonders hervorheben möchte ich meine Kollegen und Freunde Maria Lucia Madariaga MD, Kumaran Shanmugarajah MD, PhD und Vincenzo Villani MD, mit denen ich in den unzähligen Stunden im OP so viel Freude und Spaß haben durfte und so viel gelernt habe.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter, Dr. Ingeborg Michel und meiner Frau Bettina für die enorme private Unterstützung bedanken. Ohne den starken familiären Rückhalt wäre dieses Projekt so nicht möglich gewesen.