

Chirurgische Klinik und Poliklinik der  
Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert)

# **Zelluläre und humorale Faktoren für das Überleben diskordanter Herzxenotransplantate in Abwesenheit des Membran Attack Complex**

**Eine experimentelle Studie im Meerschweinchen-Ratte  
Xenotransplantationsmodell**

**Tino Niclas Beck**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation :

1. Priv.-Doz. Dr. R. B. Brauer
2. Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert

Die Dissertation wurde am 19.08.2002 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2002  
angenommen.

Meinen Eltern Ursula Beck-Oberle und  
Jürgen Beck in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet.

<b>VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>0</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>7</b>
2.1 GENEHMIGUNG DES VORHABENS .....	7
2.2 TIERSPEZIES .....	7
2.3 APPARATIVE AUSSTATTUNG.....	8
2.4 ANÄSTHESIE .....	9
2.5 OPERATIONEN .....	10
2.5.1 <i>Das Prinzip der heterotopen Herztransplantation</i> .....	10
2.5.2 <i>Herzentnahme beim Spender</i> .....	11
2.5.3 <i>Heterotope Xenotransplantation</i> .....	12
2.5.4 <i>Organentnahme zur histologischen/ immunhistochemischen Untersuchung</i> .....	15
2.5.5 <i>Intraperitoneale Injektion von Fucoidin und Busulfan</i> .....	16
2.6 ANFERTIGUNG VON KNOCHENMARK-AUSSTRICHEN.....	16
2.7 IN VITRO TECHNIKEN .....	17
2.7.2 <i>Immunperoxidase-Färbung</i> .....	17
2.7.3 <i>RNase Protection Assay</i> .....	20
2.8 STATISTIK.....	22
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>23</b>
3.1 KINETIK DES ZELLULÄREN INFILTRATES .....	24
3.2 DIFFERENZIERUNG DES ZELLULÄREN INFILTRATS DURCH IMMUNPEROXIDASE-FÄRBUNG .....	27
3.3 AUSWIRKUNGEN AUF DIE ÜBERLEBENSZEIT DISKORDANTER XENOTRANSPLANTATE DURCH VORBEHANDLUNG DER EMPFÄNGERTIERE MIT BUSULFAN UND FUCOIDIN.....	30
3.3.1 <i>Fucoidin</i> .....	30
3.3.2 <i>Busulfan</i> .....	30
3.4 AUSWERTUNG DES RNASE –PROTECTION-ASSAY.....	34
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>35</b>
4.1 ALLGEMEINE DISKUSSION .....	35
4.1.1 <i>Xenotransplantation und hyperakute Transplantatabstoßung</i> .....	35
4.1.2 <i>Therapeutische Strategien zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßung</i> .....	38
4.1.3 <i>Die verzögerte Transplantatabstoßung</i> .....	41
4.1.4 <i>Die akute Transplantatabstoßung (T-Zell- vermittelte Abstoßung)</i> .....	42
4.1.5 <i>Die chronische Transplantatabstoßung</i> .....	44
4.2 SPEZIELLE DISKUSSION.....	47
4.2.1 <i>PVG C- Ratten als Transplantatempfänger</i> .....	47
4.2.2 <i>Kinetik der zellulären Infiltration und morphologische Differenzierung</i> .....	50
4.2.3 <i>Busulfan und Fucoidin</i> .....	52
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>56</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>64</b>
<b>8 TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>9 DANKSAGUNG.....</b>	<b>68</b>

**Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

<b>A</b>	Arteria
<b>Aa</b>	Arteriae
<b>ADP</b>	Adenosin-Diphosphat
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>C</b>	Komplement
<b>C6</b>	Komplementfaktor 6
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CVF</b>	Cobra Venom Factor
<b>d</b>	Tag
<b>DAF</b>	Decay-accelerating Factor
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DXTx</b>	Diskordante Xenotransplantation
<b>h</b>	Stunde
<b>HAR</b>	Hyperakute Abstoßungsreaktion
<b>HE</b>	Hämatoxilin-Eosin
<b>Inf.</b>	Inferior
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IgM</b>	Immunglobulin M
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>kD</b>	Kilodalton
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LA</b>	Linkes Atrium
<b>LV</b>	Linker Ventrikel
<b>m</b>	Meter
<b>MAC</b>	Membran Attack Complex
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>n</b>	— Anzahl

<b>nAk</b>	Natürlicher Antikörper
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>PMN</b>	Polymorph-nukleäre Zellen
<b>Proc.</b>	Processus
<b>RA</b>	Rechtes Atrium
<b>RCA</b>	Regulator of Complement Activation
<b>RNA</b>	Ribonuklein-Acid
<b>RV</b>	Rechter Ventrikel
<b>sAk</b>	Sekundärantikörper
<b>sup.</b>	Superior
<b>V</b>	Vena
<b>VT</b>	Versuchstier
<b>Vv</b>	Venae
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>XNA</b>	Natürliche xenoreaktive Antikörper

## **1 Einleitung**

Die Diskrepanz zwischen dem Bedarf und dem Angebot an geeigneten allogenen Spenderorganen ist ein weltweites Problem der modernen Transplantationsmedizin. Die Ursachen dieses Defizits sind vielseitig, das mangelnde Vertrauen der Öffentlichkeit in die Organspende ist jedoch sicherlich einer der Hauptgründe. Öffentliche Diskussionen über die Definition des Hirntodes, Berichte über Organhandel und eine ungenügende Aufklärung der Bevölkerung über die Organspende und die Transplantationsmedizin, sind Ursachen dieses Misstandes. Umfassende nationale Kampagnen versuchen seit einigen Jahren, verlorengewonnenes Vertrauen wiederzugewinnen. Dies ist angesichts der dramatischen Verschärfung der Situation auch dringend geboten:

Seit 1991 stagnieren die Transplantationszahlen, da die Schere zwischen Angebot und Nachfrage für allogene Spenderorgane immer weiter auseinander klafft. So warten derzeit in Deutschland fast 14000 Patienten auf ein Spenderorgan, davon etwa 12000 auf eine Niere und knapp 1000 auf ein Herz. Die Warteliste für eine Nierentransplantation steigt seit Jahren kontinuierlich an, da immer mehr Patienten dialysepflichtig werden. Jährlich werden in Deutschland zwischen 2000 und 2300 (1990-2001) Patienten nierentransplantiert, die Anzahl der Neuanmeldungen liegt jedoch bei 2700-3000 Patienten pro Jahr. Die durchschnittliche Wartezeit für eine Nierentransplantation beträgt im Augenblick etwa fünf Jahre. Für Herz und Leber gilt, dass in den vergangenen sechs Jahren (bis 2001) 1996 Herz- und 1017 Leberpatienten entweder wegen einer massiven Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes von den Wartelisten genommen werden mussten, oder auf der Warteliste stehend an ihrer Erkrankung verstarben, da rechtzeitig kein geeignetes allogenes Spenderorgan gefunden werden konnte. Um zu verhindern, dass Patienten während der Wartezeit versterben, und um die Warteliste für die Nierentransplantation abzubauen, müssten in Deutschland jährlich 900 Herzen, 1100 Lebern, 4500 Nieren, 400 Lungen und 400 Pankreas zur Verfügung stehen (70, 82,15).

Eine Reihe verschiedener Strategien werden verfolgt, den Spenderpool zu erweitern und damit die Situation zu entschärfen. Auf dem Gebiet der Nierentransplantation wird eine Optimierung der Ausschöpfung von Lebendspenden angestrebt, ohne dass diese Maßnahme allein den Mangel an Organen beheben könnte. Die Verwendung sogenannter „Non-heart-beating“ Spender auf dem Gebiet der Nieren- (39,38,28) und Lebertransplantation (30), sowie die Technik der Splitliver- Transplantation, die an einigen Zentren bereits erfolgreich

durchgeführt wird, sind weitere Ansätze. Große Hoffnungen werden in die Möglichkeiten der modernen Stammzellforschung und in das Tissue-Engineering gesetzt, die vielleicht bald die Chance eröffnen, Organe ohne jede antigene Eigenschaften zu züchten (45). Auch eine Verbesserung von biomechanischen Ersatzorganen ist Ziel intensiver Bemühungen.

Seit mehr als drei Jahrzehnten ist die Ermöglichung der Xenotransplantation, als eine bedarfsgerechte Lösung des Organmangels, Mittelpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten.

Die Überlebenszeit von Xenotransplantaten variiert stark mit der Heftigkeit der Abstoßungsreaktion, wobei diese wiederum vom Grad der phylogenetischen Verwandtschaft von Spender und Empfänger abhängt. 1970 führte Sir Roy Calne, aufgrund der beobachteten Heftigkeit der Abstoßung von Xenotransplantaten, die Begriffe „konkordant“ und „diskordant“ für die unterschiedlichen Kombinationen von Spender und Empfänger ein (16). Als konkordante Kombination wird nach dieser Nomenklatur eine Spender-Empfänger-Kombination bezeichnet, die phylogenetisch einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweist. Xenotransplantate werden bei dieser Kombination erst nach 4-6 Tagen vom Empfänger abgestoßen. Die Organtransplantation vom Schimpansen auf den Menschen wäre ein Beispiel für eine konkordante Xenotransplantation.

Die diskordante Xenotransplantation (DXTx), also die Transplantation von Organen zwischen phylogenetisch weit entfernten Spezies, ist gekennzeichnet durch eine schnelle und heftige Abstoßungsreaktion, der hyperakuten Abstoßung (HAR). Diese findet innerhalb weniger Minuten statt und führt zur raschen Zerstörung des Xenotransplantates. Die Transplantation eines Schweineorgans auf den Menschen ist ein Beispiel für eine DXTx.

Die konkordante Spezieskombination stellt die immunologisch günstigere Variante der Xenotransplantation dar, jedoch gibt es entscheidende Nachteile bei der Verwendung von Primaten als potentielle Organspender: Ethisch und kulturell sind sie aufgrund ihrer hohen Entwicklungsstufe und damit nahen Verwandtschaft zum Menschen nicht akzeptabel. Die Züchtung einer geeigneten Population von potentiellen Spendertieren würde außerdem 30-50 Jahre in Anspruch nehmen. Die Forschung konzentriert sich daher auf die diskordante Xenotransplantation und hier vor allem auf die Verwendung von Schweinen als Organspender. Diese Kombination bietet den Vorteil geringerer ethischer Bedenken und einer damit größeren Akzeptanz in der Bevölkerung, sowie einer schnelleren Verfügbarkeit einer großen Anzahl von

Spenderorganen (24). Sie bietet aber auch den Nachteil noch immer nicht beherrschbarer immunologischer Barrieren. Im Falle der DXTx von primär vaskularisierten Organen (Leber, Herz, Niere, Lunge) kommt es direkt nach Beginn der Reperfusion zur Hyperakuten Abstoßungsreaktion, die als heftige, größtenteils humorale Immunantwort, das Transplantat durch mikrovaskuläre Thrombosierung, interstitielle Einblutung und Nekrose irreversibel schädigt. Die HAR wird ausgelöst durch die Bindung xenoreaktiver Antikörper (XNA) an Gal $\alpha$ 1,3-Gal-Epitope der Endothelzellen des Transplantates. Dadurch kommt es zur Bindung von Komplement und zur Aktivierung der Komplementkaskade, die in der Formierung des Membran Attack Complex (MAC) gipfelt. Das Zusammenspiel dieser Faktoren führt letztlich zur Xenotransplantatabstoßung, wobei noch nicht geklärt ist, welche Wertigkeit diese Faktoren im einzelnen bei der HAR besitzen.

Die Rolle der Komplementaktivierung bei der HAR wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung, bzw. Blockade einer vollständigen Komplementaktivierung der entscheidende Schritt ist, die HAR erfolgreich zu verhindern (57, 40, 41). Die HAR konnte in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung eines Rattenstammes mit einem isolierten Defekt des Komplementfaktors C6 (PVG C-) überwunden werden (11,12,13). Diese Ratten sind durch eine Punktmutation im C6 Gen nicht mehr in der Lage, eine korrekte Transkription und Biosynthese von C6 durchzuführen. Daher ist eine Formierung des MAC (C5b-C9), und damit die Schädigung des Transplantates im Sinne einer HAR, nicht möglich. Diskordante Herzxenotransplantate vom Meerschweinchen wurden von Ratten mit normaler Komplementaktivität nach  $0,2 \pm 0,1$ h (n=5) hyperakut abgestoßen. Im Gegensatz dazu verlängerte sich das Überleben der Herzxenotransplantate auf  $29 \pm 3,4$ h (n=6) mit PVG C- Ratten als Transplantatempfänger. Die Aktivierung der Komplementkaskade und ein Entstehen von Splitprodukten sind jedoch durch den C6-Defekt nicht beeinträchtigt. Vor allem die Splitprodukte C3a und C5a sind für die Transplantatschädigung nach Überwindung der HAR mitverantwortlich (5,6,36).

Erst der Vergleich dieser C6-defekten Rattenpopulation mit der kongenen Rattenpopulation mit normalen C6-Spiegeln, konnte die Bedeutung des Komplementfaktors C6 im Rahmen akuter entzündlicher Prozesse, wie der Allo-und Xenotransplantatabstoßung, aber auch der akuten Infektion, zeigen (7,11). Die Rolle der infiltrierenden inflammatorischen Zellen bei der Abstoßung diskordanter Xenotransplantate, sowie der genaue Pathomechanismus der Abstoßung nach Überwindung der HAR sind jedoch noch immer völlig unklar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Transplantatschädigung nach Überwindung der HAR und mit möglichen therapeutischen Strategien zur weiteren Verlängerung des Überlebens diskordanter Xenotransplantate. Immunologische Vorgänge, insbesondere die Kinetik der Transplantatschädigung und der zellulären Infiltration des Xenotransplantates nach Überwindung der HAR, wurden im diskordanten Xenotransplantationsmodell Meerschweinchen-Ratte untersucht. Hierzu wurden Meerschweinchenherzen heterotop in PVG-Ratten transplantiert, nach bestimmten Zeitpunkten wieder entnommen und histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die Kombination Meerschweinchen als Organdonor und PVG C- Ratte als Organempfänger wurde gewählt, da beide Spezies einen geringen phylogenetischen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Das Modell der heterotopen Herztransplantation bei Ratten ist ein etabliertes immunologisches Transplantationsmodell (55), das in der vorliegenden Arbeit als heterotopes diskordantes Xenotransplantationsmodell durchgeführt wurde.

Aufgrund der histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse wurden verschiedene medikamentöse Strategien zur Minimierung der Transplantatschädigung und damit zur Verlängerung der Überlebenszeit diskordanter Herzxenotransplantate getestet. Ziel dieser Arbeit war es, das zelluläre Infiltrat im diskordanten Herzxenotransplantat an verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation zu differenzieren, zu quantifizieren, und den Einfluss von Busulfan und Fucoidin auf das Ausmaß dieser Infiltration zu untersuchen. Ebenso sollte die Expression verschiedener Zytokine aus den Transplantat- infiltrierenden Zellen mittels RNase-Protection Assay zu bestimmten Zeitpunkten nach Transplantation und unter dem Einfluss von Fucoidin und Busulfan untersucht werden.

Die Blockade von endothelialen Adhäsionsmolekülen durch Fucoidin, und die Ausschaltung von polymorph-nukleären Zellen durch Busulfan sollte Aufschluss über die Rolle des beobachteten zellulären Infiltrates nach Überwindung der HAR geben, und zeigen, dass bestimmte Zellpopulationen maßgeblich für die Transplantatschädigung im beobachteten Zeitraum nach DXTx verantwortlich sind.

## **2 Material und Methodik**

### **2.1 Genehmigung des Vorhabens**

Die im folgenden beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes beantragt und unter dem **AZ. 211-2531-2/99** durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### **2.2 Tierspezies**

Im durchgeführten Xenotransplantationsmodell entstammten sowohl die Spender-, als auch die Empfängertiere, aus Inzuchtstämmen.

Als Organspender dienten männliche, 6-10 Wochen alte und 300-350g schwere Hartley Meerschweinchen (Firma Charles River Laboratories, Kiblegg/Germany). Die Empfängertiere, 8-16 Wochen alte, männliche und 200-300g schwere C6-defekte PVG (C-) (RT1C) Ratten, wurden von Prof. Daha (Abteilung für Nephrologie, Academisch Ziekenhuis, Leiden/Holland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die für die Versuche verwendeten Ratten und Meerschweinchen wurden im Tierstall des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung (Direktor: Prof. Dr. Bernd Gänsbacher) am Klinikum rechts der Isar (TU München) gehalten.

Hierbei herrschten die für die Haltung von Versuchstieren üblichen Bedingungen in einem abgetrennten 32m<sup>2</sup> großen Raum bei einer Raumtemperatur von 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55±5%. Eine Zwangsbelüftung mit Filteranlage wechselte die Raumluft zehnmal pro Minute. Der Schlaf- Wachrhythmus betrug jeweils zwölf Stunden, die Beleuchtung für die Tagesperiode hatte eine Lichtstärke von 500 Lux.

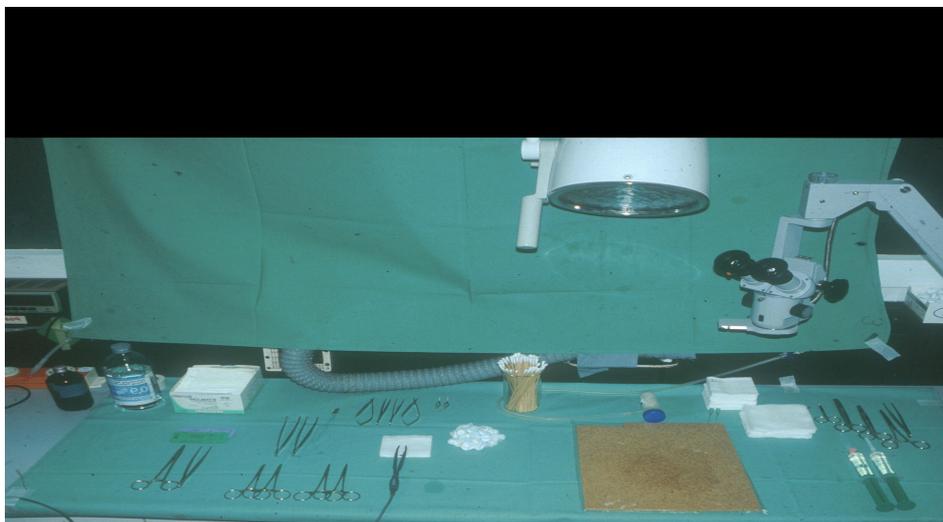
Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen Typ IV (Ehret GmbH, Emmendingen/Germany) mit einer Bodenfläche von 1815cm<sup>2</sup> gehalten. Die Käfige waren hierbei, unter genauer Berücksichtigung der Dichtestatistik, mit maximal sechs gleichgeschlechtlichen Tieren besetzt. Jede transplantierte Ratte wurde bis zum Zeitpunkt der Organentnahme in einen eigenen Makrolonkäfig Typ III (Bodenfläche 900 cm<sup>2</sup>) umgesetzt.

Gefüttert wurden die Tiere mit handelsüblichem gepressten Trockenfutter (Altromin 1324 Standarddiät, Altromin GmbH, Lage/Germany) und Trinkwasser ad libitum. Der Wechsel des Trinkwassers und die Reinigung der Käfige erfolgten täglich.

Die Meerschweinchen wurden in Makrolonkäfigen Typ IV (Bodenfläche 1815 cm<sup>2</sup>) mit einem maximalen Käfigbesatz von vier Tieren pro Käfig in einem separaten Raum unter den oben genannten Umgebungsbedingungen gehalten. Die Meerschweinchen erhielten Spezialfutter (Altromin 3022 Haltungsfutter) und Trinkwasser ad libitum. Reinigung der Käfige und Trinkwasserwechsel erfolgten auch hier täglich.

### **2.3 Apparative Ausstattung**

Zur Durchführung der Transplantationen wurde ein Operationsmikroskop (OPMI-1F, Zeiss GmbH/West Germany) mit stufenlos verstellbarem Zoomobjektiv und bis zu zwölfacher Vergrößerung verwendet. Als Operationsinstrumentarium diente ein übliches mikrochirurgisches Besteck, das durch einen bipolaren Kauter (Bechtold Elektrotom 80B, Bechtold GmbH/Germany), Biemer- Gefäßklemmen (Biemer-Clip Art.-Nr.561, Aesculap AG Tuttlingen/Germany) und Spülkanülen (Plastikeinsatz Braunüle Luer-Lock, Art.-Nr.420 755 761-G16, Braun Melsungen AG/Germany) ergänzt wurde.



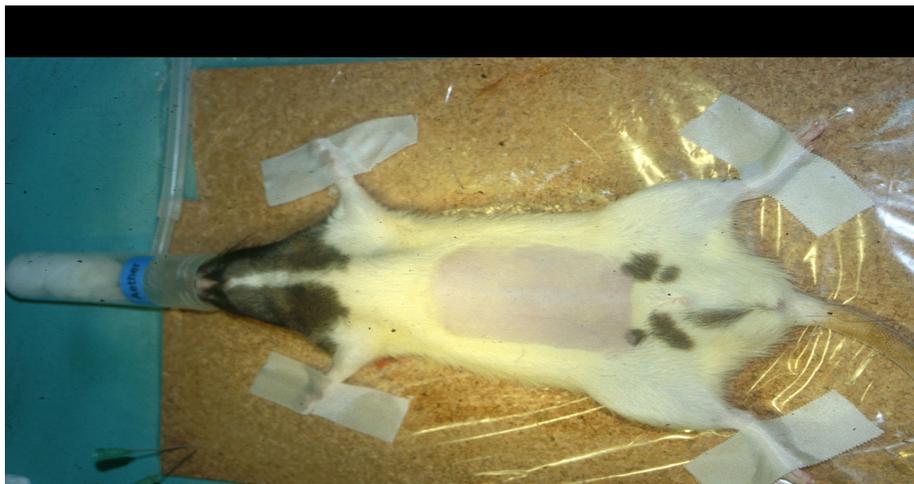
**Abb.1** OP-Arbeitsplatz für die heterotope Herzxenotransplantation im Meerschweinchen-Ratte-Modell.

## 2.4 Anästhesie

Sämtliche Operationen wurden in Diäthyläther - Inhalationsnarkose (Äther zur Narkose, Reg.-Nr.A254, Asid Bonz u. Sohn GmbH ,Böblingen/Germany) durchgeführt.

Dazu wurde das Versuchstier (VT) in ein fünf Liter fassendes Glasgefäß eingebracht, dessen Boden mit Diäthyläther benetzt war. Nachdem das VT eine ausreichende Narkosetiefe erreicht hatte, wurde es aus dem Gefäß entnommen und mittels Pflasterstreifen (Leukoplast Klebestreifen No.2321, Beiersdorf AG/Germany) auf einer Korkplatte fixiert. Um dem VT während der Operation konstant ein Äther- Sauerstoff-Gemisch zuführen zu können, wurde der Boden eines 50ml-Cup (Eppendorf GmbH, Hamburg/Germany) mit ätherbefeuchteten Kompressen ausgelegt und mit der Öffnung ca. 1-2cm vor der Nasenspitze des VT positioniert. Das 50ml-Cup war dabei über einen Schlauch mit einer O<sub>2</sub>-Quelle verbunden. Der O<sub>2</sub>-Flow betrug 2l/min. Durch Veränderung des Abstandes zur Nasenspitze des VT war es möglich, die Narkosetiefe zu regulieren (siehe Abb.2).

Nachdem die Operation mit dem Wundverschluss beendet war, wurde zur Narkoseausleitung das 50ml-Cup von der Nasenspitze des VT entfernt. Nach 5-10 min war das Äther-Sauerstoffgemisch soweit abgeatmet, dass das VT das Bewusstsein wiedererlangte, und nach weiteren 10-15 min Flüssigkeit und Nahrung zu sich nehmen konnte.



**Abb.2** PVG C-Ratte in Äthernarkose vor der Herzxenotransplantation. Die Ratte ist auf einer Korkplatte fixiert und atmet über ein 50ml-Cup ein Äther-Sauerstoff-Gemisch.

## 2.5 Operationen

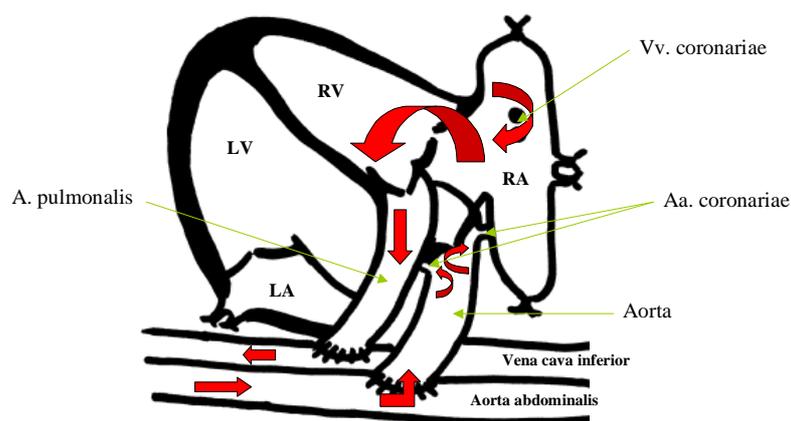
### *2.5.1 Das Prinzip der heterotopen Herztransplantation*

Bei der heterotopen Herztransplantation handelt es sich um ein rein immunologisches Hilfsmodell, bei dem das Spenderherz an die großen Abdominalgefäße des Empfängers transplantiert wird. Das eigene Herz des Empfängertieres verbleibt in der Thoraxhöhle und das transplantierte Herz übernimmt keinerlei hämodynamische Funktion.

Die Aorta ascendens des Spenderherzens wird dabei mittels einer End-zu-Seit-Anastomose an die Aorta abdominalis des Empfängers anastomosiert. Ebenso wird die Arteria pulmonalis des Spenderherzens mit der Vena cava inferior des Empfängers anastomosiert.

Das Blut fließt demnach von der Aorta abdominalis des Empfängers über die End-zu-Seit-Anastomose in die Aorta ascendens des Spenderherzens und versorgt über die Aa. coronariae das transplantierte Herz. Über die Vv. coronariae gelangt das Blut in den Sinus venosus und von dort in den rechten Vorhof. Schließlich fließt das Blut über den rechten Ventrikel und die zweite End-zu-Seit-Anastomose in die Vena cava inferior des Empfängertieres ab.

Das auf die oben beschriebene Art transplantierte Herz ist denerviert und kontrahiert sich mit einer Eigenfrequenz von 60-80 Schlägen pro Minute.



**Abb.3** Schematische Darstellung des Blutflusses im heterotop transplantierten Herzxenotransplantat unter Umgehung des linken Ventrikels.

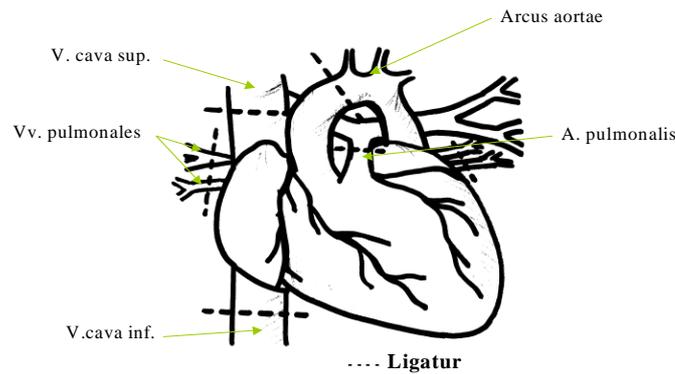
Das oben beschriebene Modell der heterotopen Herztransplantation bietet den Vorteil, dass das Empfängertier auch nach endgültiger Abstoßung des Transplantates ohne Beeinträchtigung der systemischen Blutzirkulation weiterlebt. Eine Transplantatabstoßung ist demnach nicht letal für das Empfängertier. Ebenso lässt sich die Transplantatfunktion jederzeit direkt durch die Palpation des Abdomens kontrollieren.

### ***2.5.2 Herzentnahme beim Spender***

Nach Rasur des Thorax und Desinfektion mit Alkoholspray (Kodan Tinktur Forte, Schülke & Mayr GmbH/Germany), wurde der Thorax des Spendertieres mit einer großen Laparotomieschere entlang der linken und rechten Axillarlinie eröffnet. Am Processus xiphoideus wurde eine große Klemme befestigt, mit der die obere Thoraxhälfte nach kranial geklappt wurde. Auf diese Weise lagen nun Herz und beide Lungenflügel frei.

Mit einem Wattestäbchen wurde dann der Thymus stumpf abpräpariert. Die beiden Vv. pulmonales und die distalen Aa. pulmonales wurden mit 6/0 Seide (Perma Handseide schwarz geflochten 6-0, Ethicon GmbH Norderstedt/Germany) ligiert. Anschließend wurde das Lungengewebe distal der Ligaturen vom Herzen abgetrennt. Die V. cava superior und inferior sowie die V. hemiazygos wurden ligiert, das Herz mit einer Pinzette an den Ligaturen aus dem Thorax gehoben und vom Gewebe distal der Ligaturen abgetrennt (Abb.4).

Ex situ erfolgte dann zunächst die Entfernung des Perikard. Anschließend wurden unter dem Operationsmikroskop die Aorta ascendens und der Pulmonalishauptstamm präpariert. Mit einer Spülkanüle, die in die Aorta ascendens und die A. pulmonalis eingeführt wurde, erfolgte dann die Spülung der vier Herzkammern und der Koronargefäße mit 5°C kalter Ringer-Laktat Lösung (Braun Melsungen AG/Germany). Die auf diese Weise durchgeführte Perfusion wurde solange aufrechterhalten, bis die Koronargefäße blutfrei waren und das Myokard sich blass verfärbte. Das Spenderherz verblieb nun bis zur Transplantation in eisgekühlter Ringer-Laktat-Lösung. Die kalte Ischämiezeit betrug 30-50 min.



**Abb.4** Schematische Darstellung der Präparation des Spenderherzens in situ für die heterotope Herztransplantation.

### 2.5.3 Heterotope Xenotransplantation

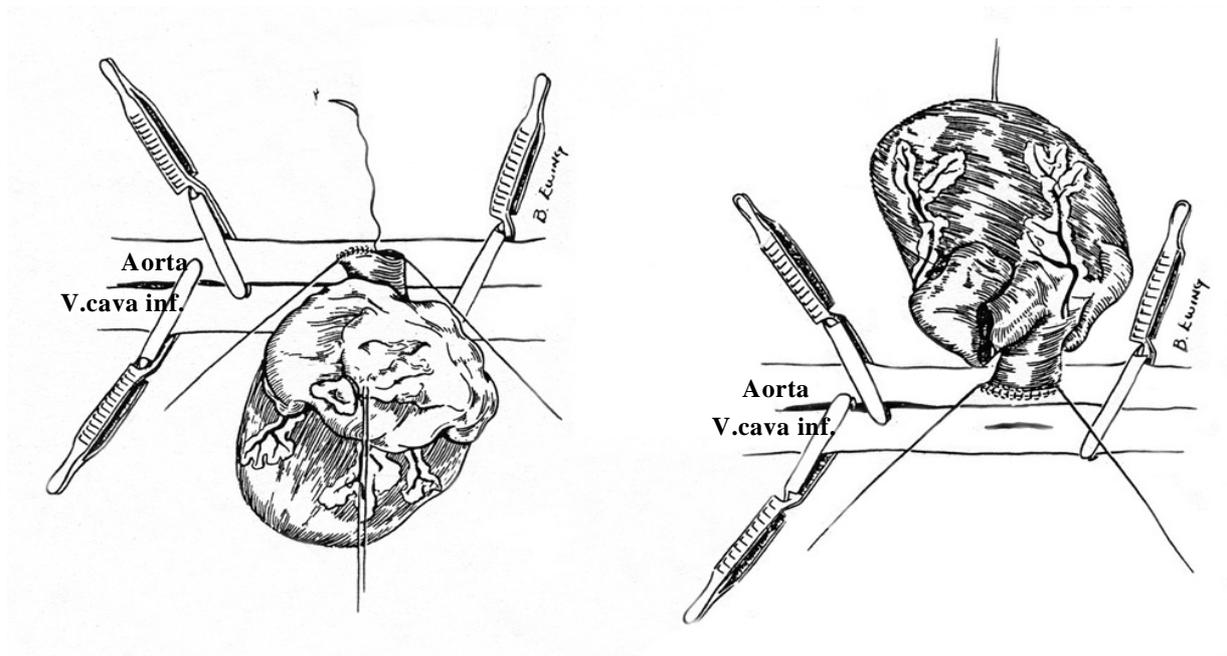
Nach Rasur und Desinfektion der Bauchhaut und dem Feststellen einer ausreichenden Narkosetiefe, wurden die Bauchhaut und die Muskulatur mit einer Laparotomieschere entlang der Linea alba, distal des Proc. Xiphoideus bis knapp proximal der Symphyse, eröffnet. Das gesamte Darmkonvolut wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl-Lösung 0,9%, Braun Melsungen AG/Germany) befeuchtet, in ebenfalls befeuchtete Kompressen eingeschlagen und auf die linke Seite des VT lateralisiert.

Mit Hilfe zweier Wattestäbchen wurde das Retroperitoneum stumpf eröffnet und die Aorta abdominalis und V. cava inferior ebenfalls stumpf freipräpariert. Somit lagen die Aorta abdominalis und die V. cava inferior frei. Auf einer etwa 10mm langen Strecke, distal der Abgänge der Nierenarterien, wurden sämtliche Zuflüsse in die V. cava inferior und alle abgehenden Arterien aus der Aorta abdominalis mit 6/0- Seide ligiert, oder mit einem bipolaren Elektrokauter (Bechtold Elektrotom 80 B, Bechtold GmbH/Germany) koaguliert.

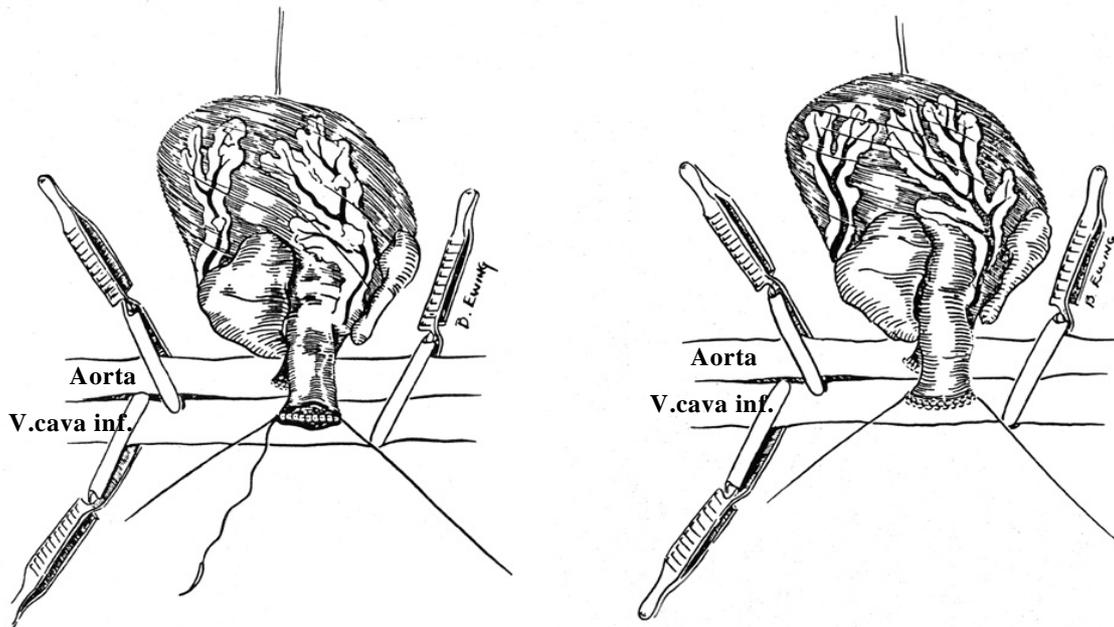
Dann wurde diese Gefäßstrecke (d.h. Vena cava inferior und Aorta abdominalis) mit Biemer-Gefäßklemmen ausgeklemmt, und zunächst die Aorta mit einer mikrochirurgischen Federschere auf einer 3-4mm langen Strecke längs arteriotomiert. Im nächsten Schritt erfolgte die End-zu-Seit-Anastomose der Aorta ascendens des Spenderherzens mit der Aorta

abdominalis des VT. Die Anastomose wurde in mikrochirurgischer Technik durchgeführt, wobei die Vorder- und die Hinterwand der Aorta ascendens mit jeweils einem monofilen 9/0 Ethilon-Faden (Ethicon schwarz monofil 9-0, Ethicon GmbH Norderstedt/Germany) mit fortlaufender Naht an die Aorta abdominalis anastomosiert wurden (siehe Abb.7).

Nach Venotomie der V. cava inferior wurden Gefäßvorder- und Hinterwand der A.pulmonalis auf diese Weise mit der V.cava inferior anastomosiert.

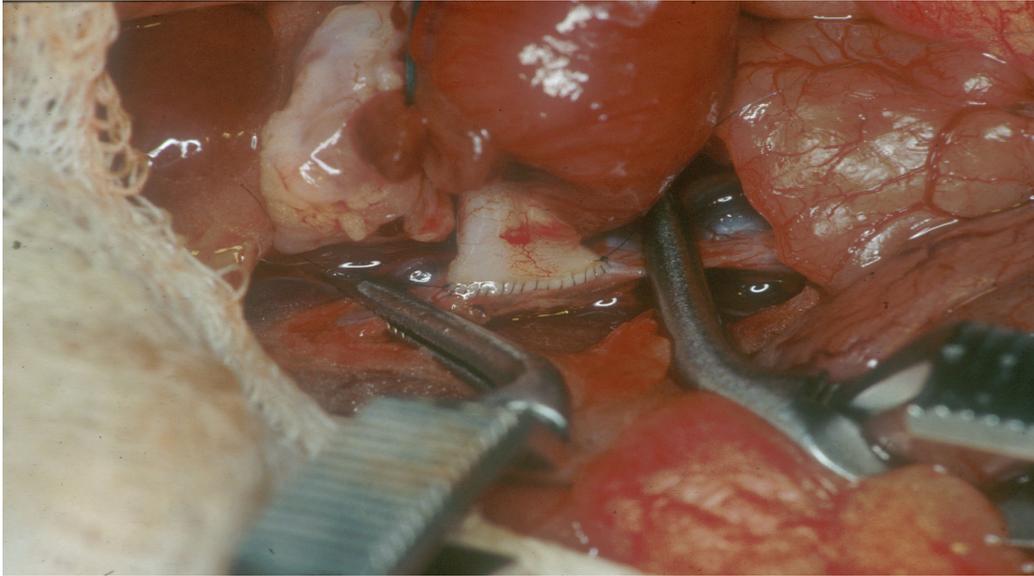


**Abb.5** Darstellung der Technik der aorto-aortalen Anastomose ( K.Ono, ES Lindsey , 55;225-9)



**Abb.6** Darstellung der Technik der Anastomose zwischen Vena cava inferior des Empfängers und Arteria pulmonalis des Spenderherzens (K Ono, ES Lindsey ,55;225-9).

Nach Vollendung der Anastomosen wurde zunächst die distale Biemer-Klemme, anschließend die proximale Biemer-Klemme, geöffnet und damit die Reperfusion des transplantierten Herzens begonnen, was in einer deutlichen Rotfärbung des zuvor blassen Herzmuskels zu erkennen war. Nach anfänglichem Kammerflimmern begann der Herzmuskel nach kurzer Zeit, sich zu kontrahieren. Nach Blutstillung wurde der zuvor nach extraperitoneal verlagerte Darm erneut mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet und danach in das Abdomen zurückverlagert. Der Wundverschluss erfolgte zunächst durch Muskelnäht mit resorbierbarem Faden der Stärke 4-0 (Vicryl 4-0 geflochten, Best.Nr. NL 75 400 1A, Ethicon GmbH Norderstedt/Germany) in fortlaufender Nahttechnik. Die Haut des VT wurde dann mit 4-0 Ethilon (Ethilon schwarz monofil 4-0, Best.Nr. 662 H, Ethicon GmbH) in fortlaufender Hautnahttechnik oder in Einzelknopftechnik verschlossen.



**Abb.7** Intraoperativer Situs nach Anastomose der Aorta abdominalis des Empfängers mit der Aorta des Spenderherzens.

#### ***2.5.4 Organentnahme zur histologischen/ immunhistochemischen Untersuchung***

Nach Diagnose der Transplantatabstoßung, bzw. an festgelegten Zeitpunkten nach DXTx (6,12 und 24h post DXTx), wurden die VT in Äthernarkose relaparotomiert. Das heterotop transplantierte Herz wurde zur Bestimmung und Quantifizierung des zellulären Infiltrates entnommen und das VT geopfert. Ein Teil des Organs wurde zur späteren RNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren, ein Teil zur histologischen Aufbereitung in Histo-Lösung (Sigma, Taufkirchen/Germany) überführt, ein weiterer in Tissue-Tec (Sakara Finetec Europe BV/Netherlands) eingebettet und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Organprobe in Histo-Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert, die schockgefrorenen Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### ***2.5.5 Intraperitoneale Injektion von Fucoidin und Busulfan***

Als selektiver Inhibitor der Granulopoese, wurde Busulfan (Sigma) in 2,5% Carboxymethylcellulose (Sigma) gelöst und dem VT in Ätherkurznarkose i.p. appliziert (Konzentration 30mg/kg KG). Die Konzentration und der Applikationszeitpunkt wurden den Angaben aus der Literatur angepasst. Diese bezogen sich auf die Verwendung von Busulfan bei Knochenmarktransplantationen im Rattenmodell (77; 101-6).

Der Selektinhemmer Fucoidin (Sigma) inhibiert in vitro die Adhäsion von Leukozyten am Endothel. Fucoidin wurde in PBS (Biochrom KG, Berlin/Germany) gelöst, und in einer Konzentration von 15mg/ kg KG, 7,5mg/kg KG oder 3,75mg/kg KG, dem VT in Ätherkurznarkose i.p. appliziert (50,51,71). Die Injektion erfolgte im Anschluss an die Transplantation.

### **2.6 Anfertigung von Knochenmark-Ausstrichen**

Um den Effekt von Busulfan auf die Hämatopoese und damit den optimalen Zeitpunkt für die Transplantation Busulfan-vorbehandelter PVG C- Ratten zu bestimmen, wurden VT mit Busulfan in einer Konzentration von 30mg/kg Körpergewicht (Busulfan gelöst in 2,5% Carboxymethylcellulose) vorbehandelt (53,21,42,76), und nach drei, sieben, bzw. vierzehn Tagen (jeweils n=2 ) in CO<sub>2</sub>-Asphyxie geopfert.

Das Knochenmark wurde aus beiden Femur und Tibiae entnommen, und für jedes VT vier Knochenmark-Ausstriche angefertigt, die nach Pappenheim gefärbt wurden. Als Vergleich diente Nativknochenmark nicht vorbehandelter PVG C- Ratten (n=2).

## **2.7 In Vitro Techniken**

### **2.7.1 Lichtmikroskopie**

Abhängig von der jeweiligen Fragestellung, wurden die Transplantate nach Transplantatabstoßung oder zu festgelegten Zeitpunkten nach DXTx entnommen, in formalinhaltiger Fixierlösung für histologische Präparate (Histolösung, Sigma) fixiert, in Paraffin eingebettet, am Mikrotom in 5µm dicke Präparate geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Herztransplantate wurden nach Ausmaß des perivaskulären Ödems, der zellulären Infiltration, interstitieller Einblutung und Myokardnekrose untersucht.

### **2.7.2 Immunperoxidase-Färbung**

Organproben für die Immunperoxidasefärbung wurden nach Organentnahme in Tissue-Tec (Sakara Finetec Europe BV/Netherlands) eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefrohren und bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

Zur Immunperoxidasefärbung wurden von den Organen 5µm dicke Kryostatschnitte hergestellt, die dann zunächst 15min in -20°C kaltem Aceton (Sigma) fixiert wurden. Nach Lufttrocknung und kurzem Waschen in PBS (Biochrom KG, Berlin/Germany), wurde 5%iges fetales Kälberserum (FKS, Biochrom) auf die Schnitte gegeben und diese 20min inkubiert. Die Präinkubation mit fetalem Kälberserum diente der Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung, die anschließende 15minütige Inkubation mit 0,1%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> der Blockade endogener Peroxidaseaktivität. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Schnitte in PBS, wurden diese für 45min mit je 100µl des jeweiligen Primär-mAk (Pharmingen, St.Louis/USA oder Serotec Ltd., Oxford/UK) inkubiert. Die verwendeten Antikörper (Ak), sowie deren Verdünnung, sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Auswahl der verwendeten Ak stützte sich auf die Tatsache, dass bei der Aktivierung der Komplementkaskade (PVG C-) die Anaphylatoxine C3a und C5a abgespalten werden, und auf die lichtmikroskopische Analyse von HE-gefärbten Präparaten, die eine Transplantatinfiltration vor allem mit polymorph-nukleären Zellen (PMN) aufwiesen. Die Anaphylatoxine sind chemotaktische Faktoren für neutrophile Granulozyten und andere Leukozytensubpopulationen. Im beobachteten Zeitraum nach DXTx ist vor allem mit einer Infiltration durch diese PMN zu rechnen (6,11,12,13,37). Daher wurden die Präparate zunächst mit Maus-anti-Ratte CD11b-mAk gefärbt, der vor allem

neutrophile Granulozyten, aber auch Monozyten und NK-Zellen anfärbt. Um die angefärbten Zellen weiter zu spezifizieren und deren Anteil am zellulären Infiltrat zu quantifizieren, wurden die Präparate auch mit mAk gegen ED1, CD3 und CD161 gefärbt. Für weitere Subspezifizierungen des zellulären Infiltrates standen zum Zeitpunkt der Versuche noch keine geeigneten anti-Ratte-Ak für Immunperoxidasefärbung zur Verfügung.

Ak	Spezifität	Art	Verdünnung	Hersteller
<b>CD 11b</b>	neutrophile Granulozyten	mAk Maus anti-Ratte ( IgG ),purified	1:100	PharMingen, St.Louis,USA
<b>ED 1</b>	Monozyten / Makrophagen	mAk Maus anti-Ratte ( IgG ),purified	1:100/1:200	Serotec Ltd. Oxford,UK
<b>CD 161</b>	NK-Zellen	mAk Maus anti-Ratte ( IgG ),purified	1:100	Serotec Ltd. Oxford,UK
<b>CD 3</b>	T-Lymphozyten	mAk Maus anti-Ratte ( IgG ),purified	1:100	PharMingen St.Louis,USA

**Tabelle 1** Verwendete Antikörper zur Differenzierung des zellulären Infiltrates im diskordanten Herzenotransplantationsmodell in Abwesenheit des MAC.

Im Anschluss wurden die Präparate dreimal (für die Dauer von 1, 3 und 5 Minuten) in PBS gewaschen und anschließend für weitere 45min mit je 100µl des Peroxidase-konjugierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragment von Ratte-anti-Maus IgG (Pharmingen,USA) gegengefärbt. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers betrug 1: 150.

Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und unter ständiger Kontrolle der Farbentwicklung für 9-12 min in Peroxidase-Substrat inkubiert. Das Peroxidase-Substrat war wie folgt zusammengesetzt:

Zunächst erfolgte die Herstellung des 50 mM Acetat- Puffers. Hierzu wurden 14,8ml 0,2 M Ameisensäure (Acetic Acid, 0,2 M ; Sigma) mit 35,2ml 0,2 M Na-Acetat (Sigma) gemischt und mit Aqua destillata auf 200ml verdünnt. Der Puffer hatte einen pH-Wert von 5,2.

Danach wurden 200ml des Acetat-Puffers mit 10ml AEC-Lösung (Sigma) und 30 $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt. Dieses Peroxidase-Substrat musste unmittelbar vor der Inkubation der Schnitte hergestellt werden.

Nach Inkubation wurden die Schnitte zweimal kurz in Aqua destillata gespült, um dann für 3-5 min in 25%igem Hämalan (Merck AG, Darmstadt/Germany) unter ständiger Farbkontrolle (zur Vermeidung einer zu starken Hintergrundfärbung) gegengefärbt zu werden. Abschließend wurden die Schnitte unter fließendem H<sub>2</sub>O gebläut und bei Raumtemperatur getrocknet. Um die Präparate haltbar zu machen, wurden diese mit Glycerogelatine (Sigma) eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Sämtliche Inkubationen erfolgten in einer feuchten, lichtgeschützten Kammer bei Raumtemperatur.

Die Auswertung der Präparate erfolgte durch Auszählung der angefärbten infiltrierenden Zellen. Um valide Ergebnisse zu erhalten, wurden bei je drei Schnitten desselben Präparates in jedem Schnitt zehn High Power Fields (Vergrößerung x400) von drei unterschiedlichen Personen ausgezählt. Die Präparate wurden vor der Auswertung mit vierstelligen Zahlen codiert, sodass den auswertenden Personen die genaue Bezeichnung der Präparate nicht bekannt war. Die Anzahl der infiltrierenden Zellen wurde aus den drei Schnitten, die bei jedem der einzelnen Präparate ausgewertet wurden, gemittelt und mit  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### 2.7.3 RNase Protection Assay

Die Organproben für die RNA-Isolierung zur späteren Zytokinbestimmung durch RNase Protection Assay wurden nach Organentnahme in 5ml-Cups (Eppendorf GmbH, Hamburg/Germany) gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie wurden bis zur Auswertung bei -80°C gelagert.

Zunächst wurde die Organprobe in 1ml Tri-Reagenz (Sigma) überführt und zerkleinert. Tri-Reagenz ist eine homogene einphasige Lösung aus Guanidin-Thiocyanat und Phenol, die effektiv RNA, DNA und Proteine in homogenisierten Organ- und Gewebeproben voneinander trennt. Nach 5min Inkubation wurden dem in Tri-Reagenz homogenisierten Organ 200µl Chloroform (Sigma) zugegeben und das Gemisch weitere 15min inkubiert. Nach 15min Zentrifugation mit 10000U/min (Zentrifuge: Biofuge 13, Haereus instruments, Bitterfeld/Germany) war das Gemisch in 3 Phasen aufgetrennt:

- wässrige Phase: farblos, RNA enthaltend
- Interphase : DNA enthaltend
- Organphase : rot , Proteine enthaltend

Der farblose RNA-enthaltende Überstand wurde abpipettiert und mit 500µl Isopropanol (Sigma) vermischt. Dann folgten eine weitere 10minütige Inkubationsphase und Zentrifugation der Probe bei 10000U/min (Dauer: 10min). Nach Zentrifugation war am Boden des Cups ein RNA-Pellet zu sehen, das nach Abpipettieren des Überstandes in 1ml 75%igem Ethanol (Sigma) gewaschen wurde. Danach wurde die Probe erneut zentrifugiert (5min bei 7500 U/min) und das überstehende Ethanol vorsichtig abpipettiert. Nach Lufttrocknung unter dem Abzug wurde der Probe 100µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Sigma) zugegeben und das RNA-Pellet bei 55-60°C aufgelöst.

Nachdem das Pellet sich aufgelöst hatte, wurden in einem neuen Cup 990µl Aqua destillata vorgelegt und 10µl aus der Probe zugegeben. Dieses Gemisch wurde in eine Quarz-Kuvette überführt, und die Extinctionen der Probe bei 260 und 280nm mit Hilfe eines Photometers (Spectronic Genesys 5, Thermo Electron Co./USA) gemessen, um den RNA-Gehalt der Proben zu ermitteln.

Aufgrund des Quotienten aus beiden gemessenen Extinctionen wurde die RNA-Konzentration ( $c_{\text{RNA}}$ ) der Probe berechnet, sowie das für die Herstellung der für das Assay notwendigen 10 $\mu\text{g}$ -Aliquots benötigte Volumen aus der Probe (Probe: RNA gelöst in DEPC-  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Sämtliche Arbeiten im Zusammenhang mit der RNA-Isolierung wurden unter keimarmen Bedingungen unter dem Steril-Abzug durchgeführt. Um eine Kontamination der Proben mit hauteigener RNase zu verhindern, wurden bei der Isolierung und beim Hantieren mit Reagenzien für die RNA-Isolierung stets Einmalhandschuhe getragen.

Die 10 $\mu\text{g}$ -Aliquots wurden bis zur Durchführung des Assays bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Der Assay wurde zur Bestimmung und Quantifizierung der Zytokinspiegel (IL1  $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL6 und TNF $\alpha$ ) im diskordanten Herzxenotransplantat herangezogen.

Zur Quantifizierung dieser Zytokinspiegel wurde der RiboQuant RNase Protection Assay (rCK-1, PharMingen, St.Louis/USA), wie vom Hersteller angegeben, durchgeführt.

Zunächst wurden die mit einem Primer versehenen einsträngigen DNA-Sequenzen aus dem Template-Set, die für die gesuchten Zytokine codieren, mit einem GACU-Pool und radioaktiv markiertem UTP [ $\alpha^{33}\text{P}^*$ ] versetzt, und in Gegenwart der T7 RNA-Polymerase (DNA-abhängige RNA-Polymerase) RNA-Antisense-Sequenzen hybridisiert.

Die aus den Herzxenotransplantaten extrahierte RNA (Sense-RNA-Sequenz) wurde dann mit der radioaktiv markierten Antisense-RNA-Sequenz zu einer doppelsträngigen RNA-Sequenz hybridisiert. Nichthybridisierte RNA wurde durch Zugabe von RNase A Digestion entfernt und diese Reaktion durch Proteinase K beendet. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion wurden die Proben zusammen mit einer Verdünnung der Eichproben (Templates), die als Größenmarker dienten, auf ein Polyacrylamidgel aufgebracht. Nach Trocknung der Gele wurden diese mit einem Phosphorimager ausgewertet. Um die Identität der Banden in den experimentellen Proben zu ermitteln, wurde mittels der unverbrauchten Markerproben aus dem Template-Set eine Standardkurve gezeichnet.

## 2.8 Statistik

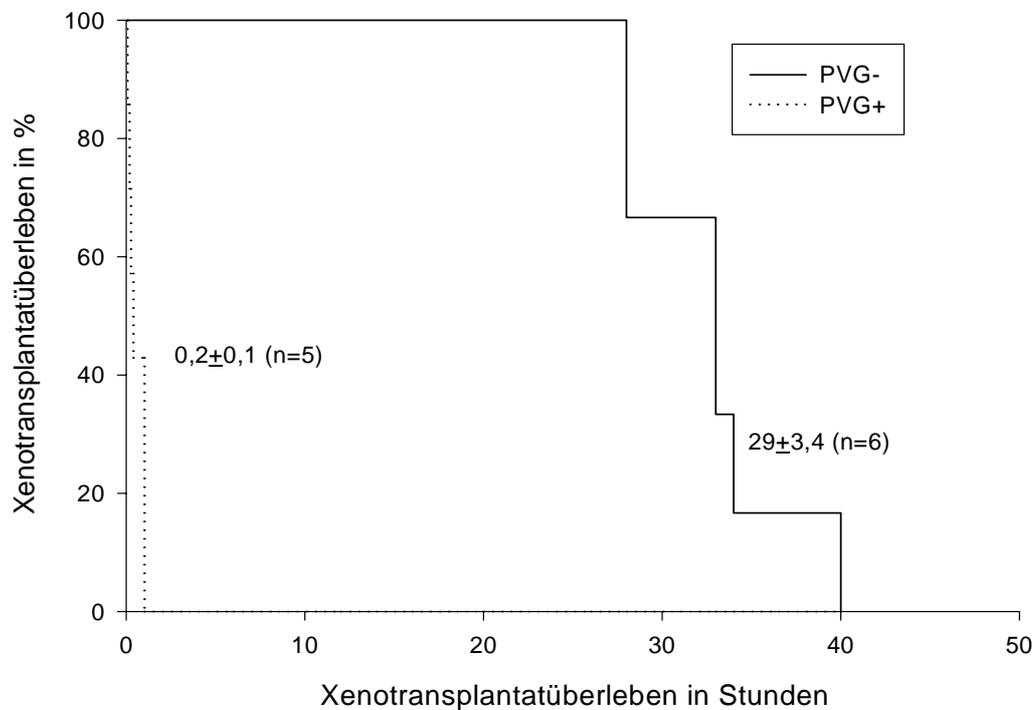
Die Transplantat-infiltrierenden Zellen in den Immunperoxidase-gefärbten Schnitten wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden jeweils dieselben zehn „High-power-fields“ in jedem Präparat von drei Personen ausgezählt, und die Anzahl der infiltrierenden Zellen als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Um zufällige und systematische Fehler zu vermeiden, wurden die Präparate vor der Untersuchung von einer Person codiert, die selbst nicht an der Auswertung der Präparate teilnahm. Demnach erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung blind.

Das Signifikanzniveau lag bei allen Untersuchungen bei  $> 95\%$ . Bei der vergleichenden Darstellung der zellulären Infiltration kam der t-Test zur Anwendung. Hierbei wurde die statistische Signifikanz definiert als  $p < 0,01$ .

Die Auswertung der mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparate erfolgte rein qualitativ-vergleichend nach den Kriterien zelluläre Infiltration, Ausmaß des perivaskulären Ödems und Ausmaß der Gewebedestruktion.

### 3 Ergebnisse

Durch die Verwendung von Ratten mit einem isolierten Defekt des Komplementproteins C6 (PVG C-) als Organempfänger, konnte die bei Xenotransplantationen zu erwartende hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) verhindert werden. Diskordante Herzxenotransplantate mit phänotypisch identischen PVG C+ -Ratten (n=5) als Organempfänger wurden nach  $0,2 \pm 0,1$  h hyperakut abgestoßen. Im Gegensatz dazu verlängerte sich das Überleben diskordanter Herzxenotransplantate, die heterotop den PVG C- Ratten transplantiert wurden (n=6), auf  $29 \pm 3,4$  Stunden (Abb.8).



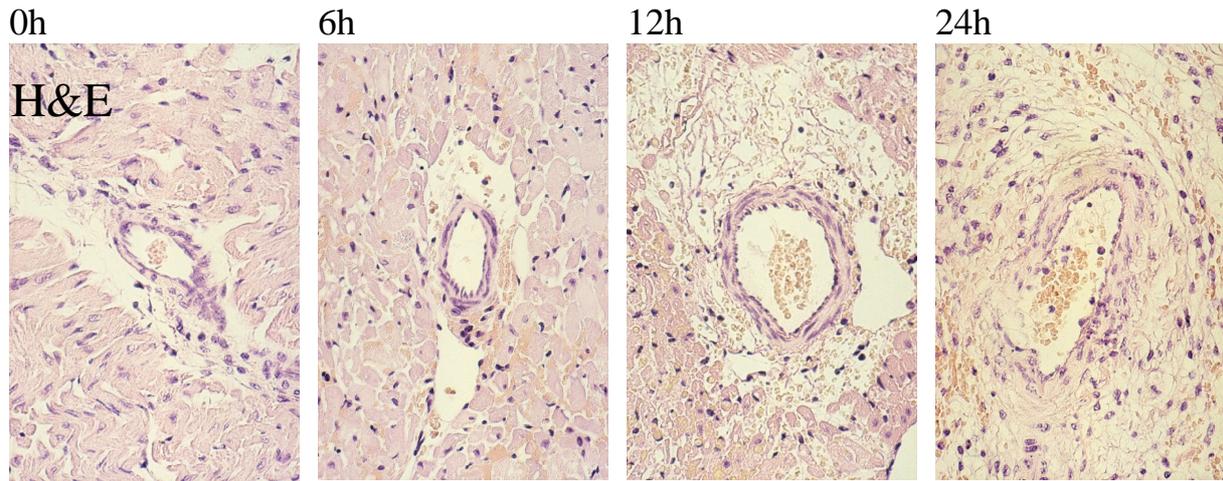
**Abb.8** Überleben diskordanter Xenotransplantate vom Meerschweinchen in PVG C- Ratten (n=6) vs. dem Überleben in PVG C+ -Ratten (n=5)

### 3.1 Kinetik des zellulären Infiltrates

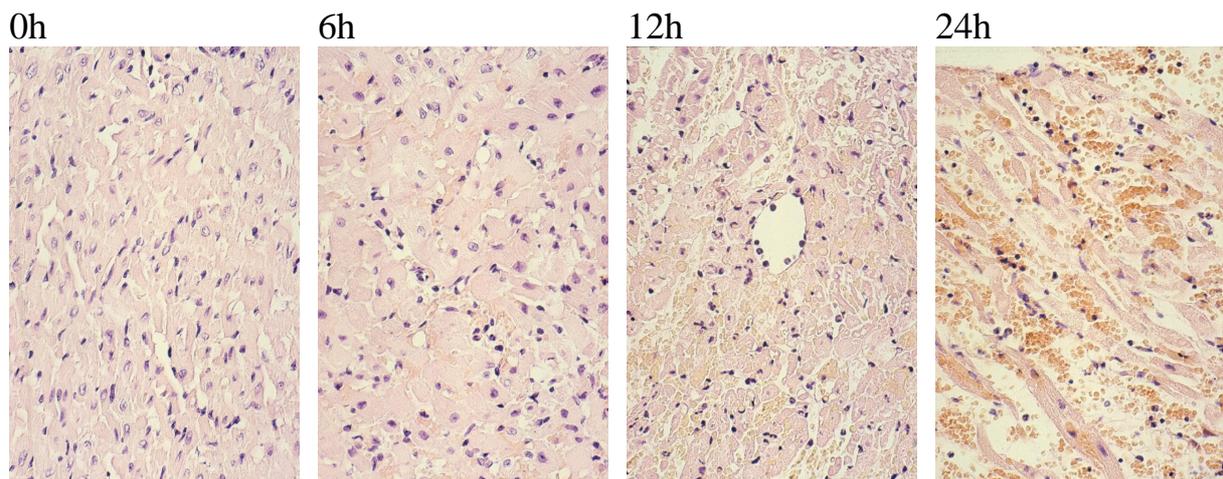
Zur weiteren Analyse des Abstoßungsmechanismus von diskordanten Xenotransplantaten nach Überwindung der HAR, wurden die Kinetik der zellulären Infiltration und die Phänotypen des zellulären Infiltrates untersucht. Zur Erstellung einer Kinetik der zellulären Infiltration und der konsekutiven Gewebsdestruktion wurden Meerschweinchenherzen heterotop in PVG C- Ratten transplantiert und nach 6 (n=6), 12 (n=6) und 24 (n=6) Stunden wieder entnommen. Als Vergleich wurden nicht transplantierte Meerschweinchenherzen (n=4) untersucht. Zum Zeitpunkt der Transplantatentnahme waren alle untersuchten Herzxenotransplantate vital und kontrahierten sich.

Die für die Untersuchung der Kinetik der zellulären Infiltration verwendeten Herzxenotransplantate wurden nach Herstellung von Mikrotomschnitten mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Hierbei konnte bereits 6h nach DXTx in allen Xenotransplantaten (n=6) ein gering ausgeprägtes perivaskuläres Ödem beobachtet werden, wobei ein beginnendes zelluläres Infiltrat hauptsächlich granulözytärer Zellen nachgewiesen werden konnte. Eine perivaskuläre Hämorrhagie war nur vereinzelt zu sehen. Im Gegensatz dazu konnten 6h nach Transplantation weder in Arterien noch in Venen des Transplantats intravaskuläre Thromben oder eine lichtmikroskopisch zu erkennende Myokardschädigung nachgewiesen werden (Abb.9/10).

In allen Xenotransplantaten, die 12h nach DXTx entnommen wurden (n=6), war eine deutlich Zunahme der granulözytären Myokardinfiltration, des perivaskulären Ödems, der interstitiellen Hämorrhagie und eine beginnende Myokarddestruktion zu erkennen. Erstmals 12h nach DXTx konnten intravaskuläre Thromben in Venen und Arterien des Xenotransplantates nachgewiesen werden. Eine deutliche Zunahme dieser interstitiellen und intravaskulären Veränderungen, einhergehend mit einer deutlichen konsekutiven Myokarddestruktion, war in den HE-gefärbten Schnitten aller Xenotransplantate (n=6) zu erkennen, die 24h nach DXTx entnommen wurden (Abb.9/10). Als Vergleich dienten HE-gefärbte Mikrotomschnitte nicht transplantierte Meerschweinchenherzen (in Abb.9 und 10 mit „0 h“ bezeichnet).

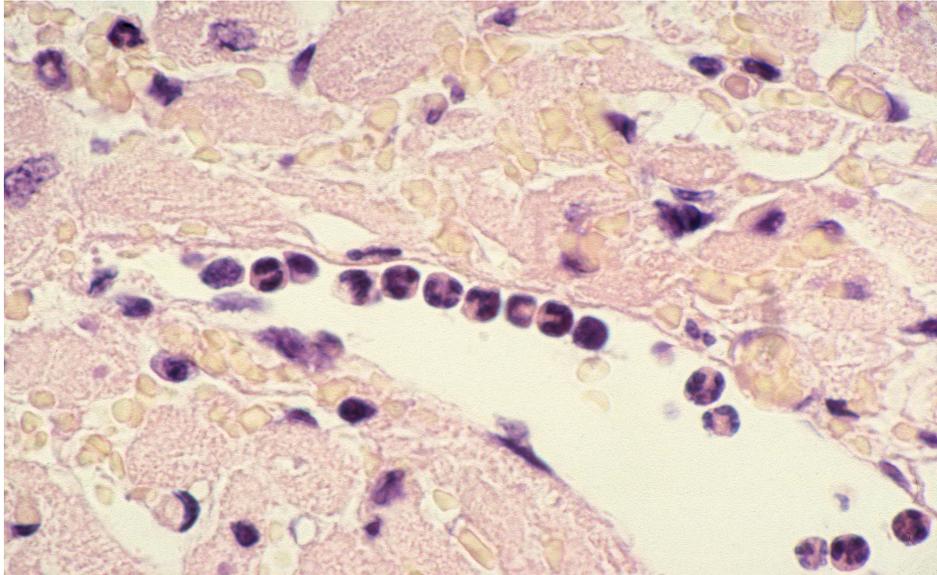


**Abb.9** Repräsentative Beispiele von Xenotransplantaten, die nach 0,6,12,24h entnommen wurden. In dieser Abbildung ist die perivaskuläre Destruktion nach DXTx dargestellt (HE x 400).



**Abb.10** Repräsentative Beispiele von Xenotransplantaten, die nach 0,6,12,24h entnommen wurden. In dieser Abbildung ist die granulozytäre Infiltration des Myokard und die interstitielle Hämorrhagie nach 0,6,12,24h nach DXTx im Vergleich dargestellt (HE x 400).

HE-Färbungen von Xenotransplantaten, die 12h nach DXTx entnommen wurden, wiesen vor allem an den Endothelien der venösen Gefäße ein sog. „Sticking“ granulozytärer Zellen auf, die zum Teil bereits das perivaskuläre Gewebe und Myokard infiltrierten (Abb.11). Außerdem war die perivaskuläre Hämorrhagie 12h nach DXTx deutlich ausgeprägter und ließ sich auch interstitiell im Myokard nachweisen (Abb.9 und 10).



**Abb.11** Perlschnurartiges „Sticking“ von Granulozyten am Endothel und konsekutiver perivaskulär-Interstitieller Infiltration 12h nach DXTx (HE x 1000)

Die deutlichsten histomorphologischen Veränderungen waren 24h nach DXTx zu erkennen (Abb.9 und 10). Es zeigten sich eine deutliche perivaskuläre Infiltration des Myokard mit stab- und segmentkernigen Granulozyten und eine erhebliche Auflockerung des Myokard durch eine massive interstitielle Hämorrhagie.

### **3.2 Differenzierung des zellulären Infiltrats durch Immunperoxidase-Färbung**

Durch die Immunperoxidase-Färbung konnte das vor allem perivaskulär in der HE-Färbung beobachtete zelluläre Infiltrat in Granulozyten (Ak: CD11b) und Makrophagen (Ak: ED1) weiter differenziert werden.

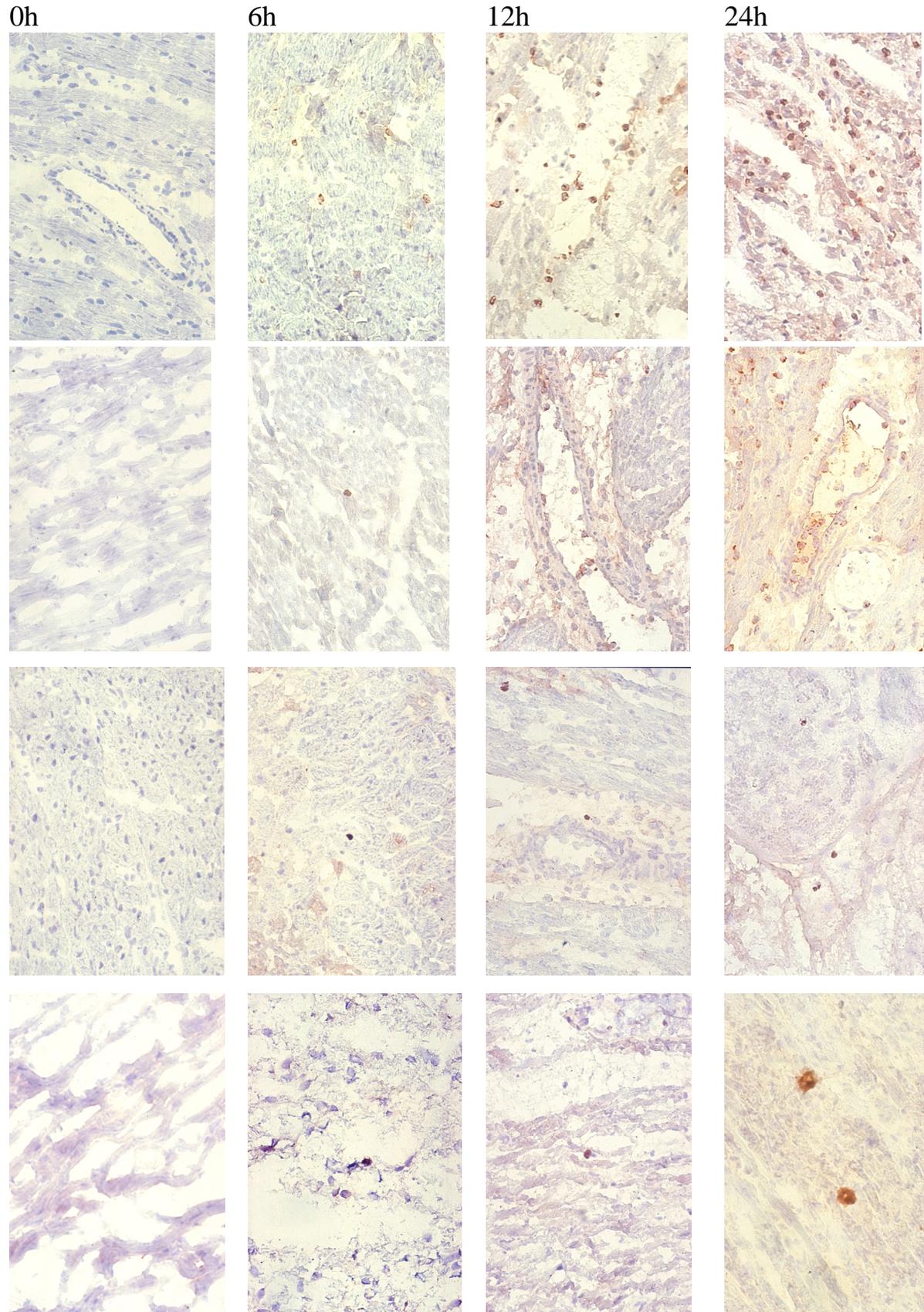
Bereits 6h nach DXTx konnten CD11b-positive und ED1-positive Zellen, vor allem perivaskulär, dargestellt werden (Abb.12). Vereinzelt konnten schon zu diesem Zeitpunkt NK-Zellen, die sowohl CD11b- als auch CD161-positiv sind, identifiziert werden (Abb.12).

Der Großteil des zellulären Infiltrates, welches 12h nach DXTx beobachtet wurde, war CD 11b-positiv, d.h. granulozytären Ursprungs. ED1-positive Makrophagen waren zu diesem Zeitpunkt die zweitgrößte infiltrierende Zellpopulation (Abb.13). Im Gegensatz dazu blieb die Transplantatinfiltration mit NK-Zellen (CD11b- und CD161-positiv) nahezu in der Größenordnung der 6h nach DXTx beobachteten NK-Zellen-Infiltration (Abb.12). NK-Zellen waren auch 12h nach DXTx nur sehr vereinzelt zu identifizieren.

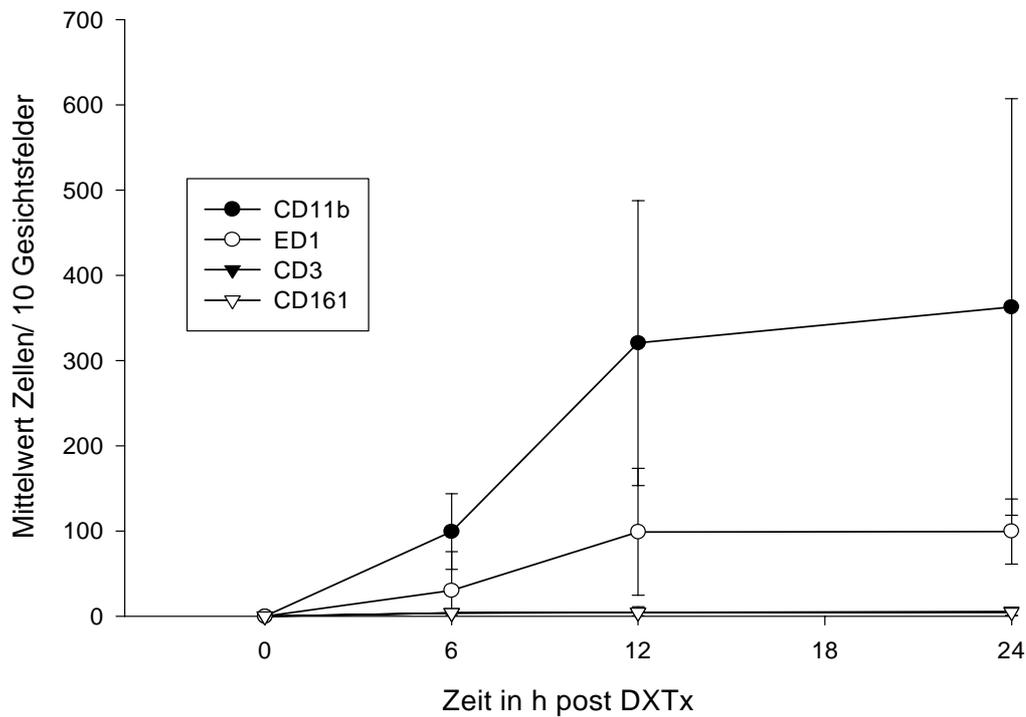
Die Immunperoxidase-Färbung zeigte 24h nach DXTx eine massenhafte Infiltration des Myokards mit Granulozyten und Makrophagen (Abb.12 und 13). Die Infiltration der Xenotransplantate mit NK-Zellen nahm auch 24h nach DXTx nicht signifikant zu. Offensichtlich spielt diese Zellpopulation bei der Abstoßungsreaktion in Abwesenheit des MAC nur eine untergeordnete Rolle. Die signifikante Zunahme des CD11b- und ED1-positiven Zellinfiltrates von 6h bis 24h nach DXTx, mit gleichzeitiger Zerstörung und Funktionseinschränkung des Transplantates über diesen Zeitraum, spricht für eine maßgebliche Beteiligung von Granulozyten und Makrophagen am xenogenen Abstoßungsmechanismus nach Überwindung der HAR.

Die Anzahl der infiltrierenden Zellen 6, 12 und 24h nach DXTx wurde in Abb.13 als Mittelwert aus der Anzahl der in zehn „High-power-fields“ ausgezählten Zellen  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die Erstellung der Kinetik der Transplantatabstoßung nach Überwindung der HAR und die Differenzierung des zellulären Infiltrates wurden je 6 Tiere pro Versuchsgruppe transplantiert

**Myokarddestruktion und Infiltration versch. Zellen 0,6,12,24h post DXTx im Vergleich:**



**Abb.12** Repräsentative Schnitte von Meerschweinchenherzen, die zur Phänotypisierung des zellulären Infiltrates nach 0,6,12,24h entnommen wurden (Immunperoxidase x400).



**Abb. 13** Graphische Darstellung der Kinetik des zellulären Infiltrats 6, 12, 24h nach DXTx. Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl der infiltrierenden Zellen  $\pm$  Standardabweichung, der durch Auszählen von 10 Gesichtsfeldern pro Schnitt ermittelt wurde.

Die quantitative Auswertung der Immunperoxidase-Färbungen zeigte, dass sich der wesentliche Anteil des zellulären Infiltrates nach DXTx aus polymorph-nukleären Zellen (PMN), wie Makrophagen und Granulozyten, zusammensetzt. Eine zu vernachlässigende Rolle scheint hingegen die Infiltration des Xenotransplantates durch NK-Zellen zu spielen. Wie zu erwarten war, ist auch der Anteil der CD 3-positiven T-Lymphozyten an der Transplantatinfiltration (in diesem frühen Stadium der Transplantatabstoßung) zu vernachlässigen. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die xenogene Transplantatabstoßung im beobachteten Zeitraum zwischen 6 und 24 post DXTx, nach Überwindung der HAR, wesentlich durch granulozytäre Zellen und Makrophagen vermittelt wird.

### **3.3 Auswirkungen auf die Überlebenszeit diskordanter Xenotransplantate durch Vorbehandlung der Empfängertiere mit Fucoidin /Busulfan**

#### **3.3.1 Fucoidin**

Fucoidin ist ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid (poly-Fucose-4-Sulfat), das an L- und P-Selektine bindet und diese damit blockiert. Die blockierende Wirkung auf E-Selektine ist nur gering ausgeprägt. Aufgrund dieser Selektin-Hemmung konnte in verschiedenen in-vitro-Versuchen gezeigt werden, dass Fucoidin die Adhäsion aktivierter Leukozyten am Endothel der postkapillären Venolen inhibiert (53,21,42,76).

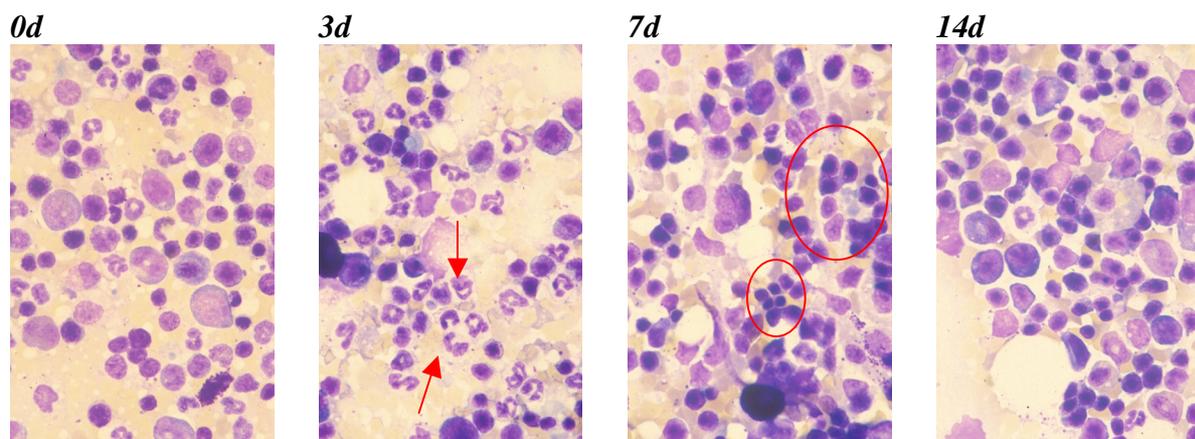
Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Xenotransplantationen mit Fucoidin-vorbehandelten PVG C- Ratten als Transplantatempfänger führten sowohl in hoher als auch in niedriger Fucoidin-Dosierung (Konzentration 50mg/kg, 25mg/kg und 12,5mg/kg gelöst in 0,9% NaCl) zu toxischen Kreislaufstörungen der Transplantatempfänger und Nachblutungen aus den Gefäßanastomosen. Außerdem lag die Überlebenszeit von Xenotransplantaten, die heterotop in mit Fucoidin vorbehandelte Ratten transplantiert wurden, bei  $29 \pm 17$  h (n=5) und damit nicht signifikant über dem der Versuchsgruppe mit nicht vorbehandelten PVG C- Ratten. Wegen dieser Ergebnisse und der hohen Letalität in der Versuchsgruppe wurden die Versuche mit Fucoidin abgebrochen.

#### **3.3.2 Busulfan**

Das alkylierende Chemotherapeutikum Busulfan spielt bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie des Erwachsenen eine wichtige Rolle, da es selektiv die Myelopoese im Knochenmark inhibiert und nur geringe Wirkung auf lymphoide Zell-Linien und die Erythropoese hat (71,51).

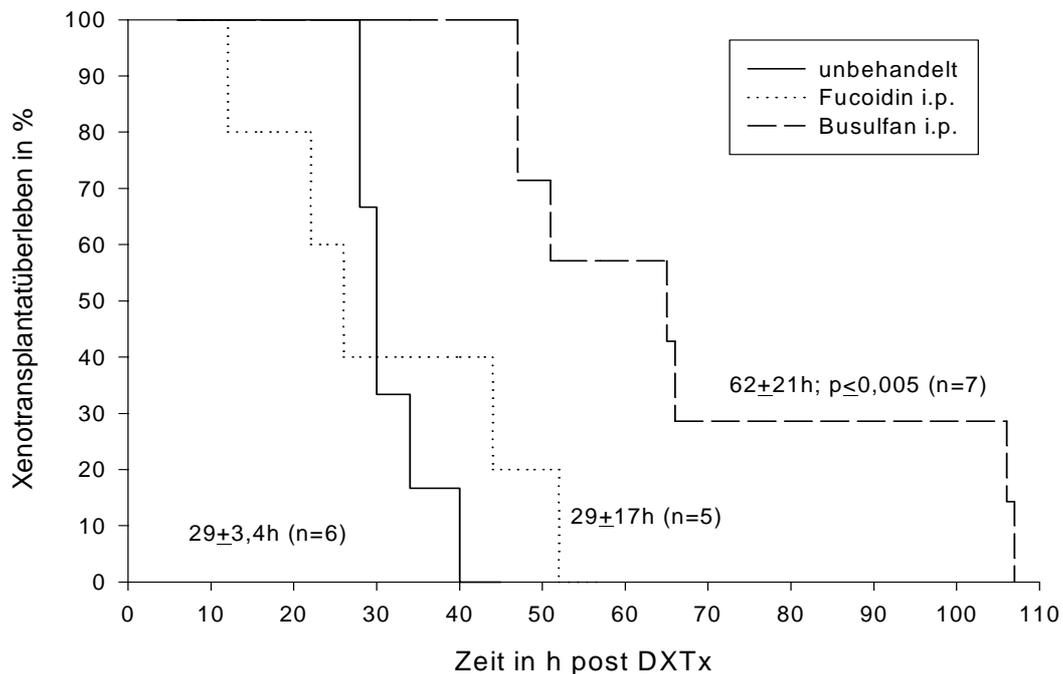
Den Empfängertieren wurde am Tag-3 vor DXTx Busulfan gelöst in Carboxymethylcellulose in einer Dosierung von 30mg/kg KG i.p. appliziert. Die Busulfan-Dosierung wurde den Angaben in der Literatur angepasst (77). Die Wirkung von Busulfan auf das Knochenmark der Ratten wurde mittels Knochenmarkausstrichen untersucht, die nach 3,7 und 14 Tagen (je n=2) nach i.p.-Applikation von Busulfan gewonnen wurden. Als Vergleichspräparate wurden Knochenmarkausstriche von nicht behandelten PVG C- Ratten (n=2) herangezogen (im

Abb.14 mit „0 d“ bezeichnet). Die nach Pappenheim gefärbten Ausstrich-Präparate zeigten bereits 3 Tage nach Busulfan-Injektion eine deutliche Schädigung der Myelopoese mit einer Rechtsverschiebung der Granulopoese, d.h. vermehrtem Auftreten hypersegmentierter neutrophiler Granulozyten im Knochenmark. 7 Tage post injectionem konnte ein nahezu vollständiger Rückgang der Myelopoese mit einem deutlichen Überwiegen der Erythropoese beobachtet werden. Knochenmarksausstriche, die 14 Tage nach Busulfan-Injektion gewonnen wurden, zeigten eine Regeneration der Myelopoese (Abb.14).



**Abb.14** Repräsentative Knochenmarksausstriche (Pappenheim x400), die 3,7 und 14 Tage nach i.p.- Injektion von Busulfan gewonnen wurden. Im Vergleich zum Nativknochenmark (0d) sieht man drei Tage nach Injektion einen Rückgang der Myelopoese mit einer Rechtsverschiebung der Granulopoese (siehe Pfeile). 7 Tage nach Injektion ist die Myelopoese nahezu erloschen, wobei im Ausstrichpräparat die Erythropoese dominiert (siehe Kreise). 14 Tage post injectionem zeigt das Ausstrichpräparat eine Regeneration der Myelopoese.

Das Überleben heterotop transplanteder diskordanter Xenotransplantate vom Meerschweinchen verlängerte sich bei mit Busulfan vorbehandelten PVG C- Ratten als Empfänger von  $29 \pm 3,4$ h (n=6) auf  $62 \pm 21$ h (n=7). Der Unterschied im Transplantatüberleben zwischen nicht vorbehandelten PVG C- Ratten als Empfänger und am Tag -3 vor DXTx mit Busulfan vorbehandelten PVG C- Ratten war mit  $p \leq 0,005$  signifikant (Abb.15).

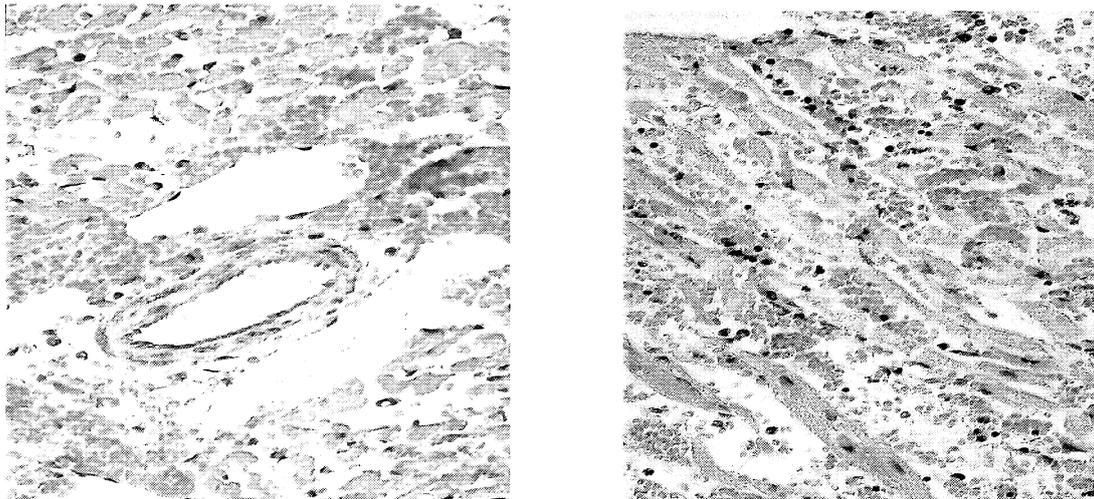


**Abb.15** Darstellung der Überlebenskurven diskordanter Xenotransplantate mit nicht vorbehandelten PVG C-Ratten als Empfänger im Vergleich zu den Überlebenskurven mit Fucoidin-bzw. Busulfan-Vorbehandelten PVG C- Ratten als Empfänger.

Um auch histologisch den Beweis erbringen zu können, dass die einmalige Injektion von Busulfan in einer Dosierung von 30mg/kg KG durch die Inhibierung der Myelopoese zu einer verminderten granulozytären Infiltration des Herzxenotransplantates und damit zu einer verminderten Schädigung des Transplantates führt, wurden diskordante Herzxenotransplantate vom Meerschweinchen 24h nach DXTx aus mit Busulfan vorbehandelten Ratten entnommen (n=5). Als Vergleich dienten Herzxenotransplantate vom Meerschweinchen, die 24h nach diskordanter Xenotransplantation aus nicht-vorbehandelten PVG C- Ratten entnommen wurden (n=6). Es zeigte sich, dass die Xenotransplantate, die 24h post DXTx aus vorbehandelten Ratten entnommen wurden, makroskopisch wesentlich weniger durch den Abstoßungsprozess geschädigt waren, als die Xenotransplantate aus nicht-vorbehandelten Ratten 24h nach DXTx. Mikroskopisch zeigten sich eine deutlich verminderte Ausprägung des perivaskulären Ödems und der perivaskulären und interstitiellen Hämorrhagie (Abb.17). Die interstitielle Infiltration mit granulozytären Zellen und Makrophagen war ebenfalls deutlich geringer ausgeprägt als in der Vergleichsgruppe mit nicht-vorbehandelten Ratten als Transplantatempfänger.

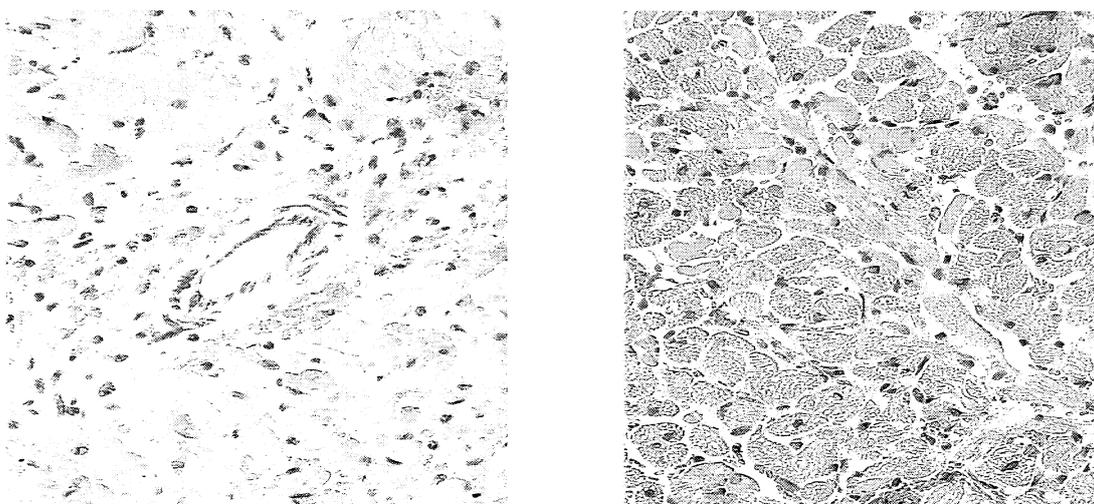
Durch die Immuperoxidasefärbungen konnte gezeigt werden, dass der Großteil des zellulären Infiltrates granulozytären Ursprungs ist. Durch die selektive Inhibierung der Myelopoese mittels Busulfan sollte dieses zelluläre Infiltrat minimiert, und somit das Transplantatüberleben verlängert werden.

***24h post DXTx unbehandelt***



**Abb. 16** Repräsentative Beispiele von Herzxenotransplantaten vom Meerschweinchen, die 24h post DXTx aus nicht vorbehandelten PVG C6- Ratten entnommen wurden. Man erkennt ein deutliches perivaskuläres Ödem, massive interstitielle und perivaskuläre Hämorrhagie, sowie ein erhebliches zelluläres Infiltrat (HE x 400).

***24h post DXTx vorbehandelt (Busulfan 30mg/kg KG i.p.)***



**Abb. 17** Repräsentative Beispiele von Herzxenotransplantaten vom Meerschweinchen, die 24h post DXTx aus Mit Busulfan vorbehandelten PVG C6- Ratten entnommen wurden. Im Vergleich zu Abb. 16 ist das Perivaskuläre Ödem deutlich geringer ausgeprägt. Die interstitielle Hämorrhagie und das zelluläre Infiltrat sind ebenfalls erheblich schwächer ausgeprägt als in Abb. 16 (HE x 400).

Durch die signifikante Verlängerung der Überlebenszeit diskordanter Xenotransplantate nach Busulfangabe und der histologisch nachgewiesenen (Abb.16 und 17) deutlich geringeren Myokardschädigung durch zelluläre Infiltration, interstitieller Hämorrhagie und perivaskulärem Ödem, konnte eine maßgebliche Beteiligung polymorph-nukleärer Zellen (PMN) am Transplantatabstoßungsprozess nach Überwindung der HAR nachgewiesen werden.

### **3.4 Auswertung des RNase –Protection-Assay**

Das RNase-Protection-Assay wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Nach Auswertung des Assays mittels Phosphorimager wurden die aufgetretenen Banden mit der aus den unverbrauchten Markerproben des Template-Sets erstellten Standardkurve verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die gewonnenen Banden des Assays nicht den Banden der aufgetrennten Eichproben zuzuordnen waren. Zwei Wiederholungen des RNase- Protection – Assays erbrachten ebenfalls nicht zuzuordnende Banden. Als Ursache für diese fehlerhafte Auftrennung der RNA aus den Organproben ist eine Verunreinigung der RNA-Proben durch RNase anzunehmen, die zu einem frühzeitigen Verdau der RNA geführt hat. Eine weitere Erklärung für das Scheitern des Assays kann auch ein fehlerhaftes Template-Set oder die Verwendung verunreinigter Reagenzien gewesen sein.

Durch die umfangreichen histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen waren für weitere RNA-Isolierungen nicht mehr ausreichende Mengen der Organproben vorhanden, sodass keine weiteren RNase-Protection-Assays durchgeführt werden konnten.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Allgemeine Diskussion**

#### ***4.1.1 Xenotransplantation und hyperakute Transplantatabstoßung***

Die Schwierigkeiten einer erfolgreichen Transplantation nehmen zu mit dem Ausmaß des genetischen Unterschieds zwischen Spender und Empfänger. Man kann dabei die Transplantate in vier Hauptgruppen einteilen: Autotransplantate, Isotransplantate, Allotransplantate und Xenotransplantate. Autotransplantate, d.h. Transplantate, die von einem Körperteil auf das andere transplantiert werden (z.B. Spalthauttransplantate) oder Isotransplantate, Transplantate von isogenetischen Individuen (z.B. Transplantate von einem eineiigen Zwilling auf den anderen), lösen im Empfängerorganismus keine Abstoßungsreaktion aus, da das Transplantat keine für den Empfängerorganismus fremden Antigene exprimiert.

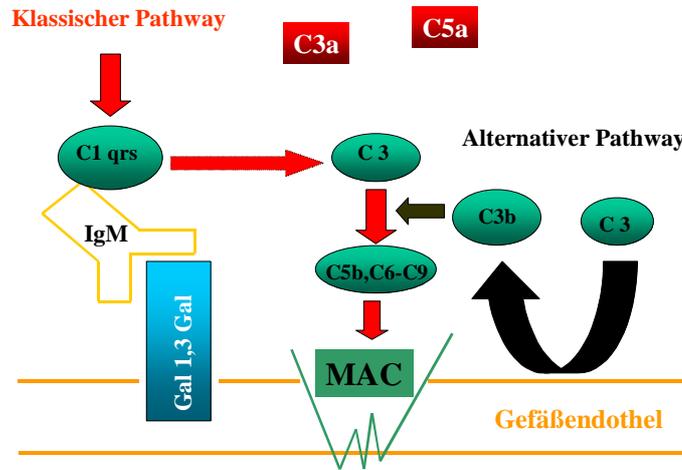
Die Allotransplantation (Spender und Empfänger gehören derselben Spezies an) stellt in der klinischen Praxis die übliche Form der Transplantation dar. Das Spenderorgan wird dabei einem sich genetisch vom Empfänger unterscheidenden Individuum implantiert. Dabei erkennt der Empfängerorganismus die vom Transplantat exprimierten Antigene als fremd. Folge ist eine hyperakute (vor allem bei Transfusionszwischenfällen zu beobachten, da bei jedem Menschen präformierte Ak gegen fremde Blutgruppenantigene zu finden sind), akzellerierte (durch Reaktivierung sensitivierter T-Zellen), akute (durch primäre Aktivierung von T-Zellen nach Tagen bis Wochen) oder chronische (Ursache bisher unbekannt; Auftreten nach Monaten bis Jahren) Abstoßungsreaktion, die es durch Immunsuppression des Empfängers zu verhindern gilt (37). Die größte immunologische Barriere beinhaltet die Xenotransplantation, d.h. die Transplantation zwischen verschiedenen Spezies.

Der Mangel an geeigneten allogenen Spenderorganen in der Transplantationsmedizin hat in den vergangenen Jahren zu verstärkten Bemühungen geführt, die mögliche Verwendung von Xenotransplantaten wissenschaftlich genauer zu untersuchen. Besonders die Verwendung von Schweinen als Spendertiere ist dabei von Interesse. Gründe hierfür sind zum einen der schnellere Generationenwechsel und die damit schnellere Verfügbarkeit einer großen Anzahl geeigneter Spenderorgane, zum anderen die geringeren ethischen Bedenken im Gegensatz zum konkordanten Modell mit Schimpanse oder Pavian als Spendertiere. Die diskordante

Kombination Schwein-Mensch beinhaltet jedoch komplexere immunologische Reaktionsmuster, da es hier zur hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) kommt, die im konkordanten Modell in der Regel nicht beobachtet wird. Primär vaskularisierte Xenotransplantate wie Leber, Herz, Niere und Lunge, die für ihre Funktion den direkten Anschluss an den Blutkreislauf des Empfängers benötigen, stehen, im Gegensatz zu den sekundär vaskularisierten Xenotransplantaten (wie z.B. Inselzellen des Pankreas), im Mittelpunkt des Interesses.

Ein primär vaskularisiertes diskordantes Xenotransplantat wird unmittelbar nach Beginn der Reperfusion durch die hyperakute Transplantatabstoßung (HAR) irreversibel geschädigt. Eingeleitet wird die HAR durch die Bindung präformierter Ak, sogenannter natürlicher Ak (NAk oder xenoreaktive NAk: XNA) vorwiegend vom IgM-Isotyp (und variablen Mengen von IgG-Ak), an Galactose  $\alpha$ 1-3-Galactose Strukturen der Endothelzellen des Spenderorgans. Dieser Mechanismus wird als „klassischer Weg“ der Komplementaktivierung bezeichnet (2). Zusätzlich wird die Komplementkaskade durch den „alternativen Weg“ der Komplementaktivierung aktiviert. Die Fc-Anteile der IgM-Ak dienen als Bindungsstellen des Komplementfaktors C1qrs. Diese Bindung führt zur Aktivierung der Komplementkaskade, an deren Ende der Membran Attack Complex (MAC) steht, der nach wenigen Minuten zur erheblichen Endothelschädigung und zur Entstehung von Mikrothromben führt. Interstitielle Hämorrhagie und die Thrombosierung kleiner und später auch größerer Transplantatgefäße bewirken letztlich die Zerstörung des Xenotransplantates (5). Die xenoreaktiven nAk vom IgM- und IgG-Typ stellen somit das Haupthindernis für ein Funktionieren der Xenotransplantation dar (43).

Die Faktoren C3a und C5a, die als Spaltprodukte beim Ablauf der Komplementkaskade freigesetzt werden, sind zum einen chemotaktische Faktoren für neutrophile Granulozyten und andere Leukozytensubpopulationen, zum anderen klassische Anaphylatoxine der akuten Entzündung und tragen damit zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität bei. C3a und C5a sind also maßgeblich für die zelluläre Infiltration des Transplantates verantwortlich. Die Bildung des MAC interferiert ferner mit Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. Die Komplementaktivierung trägt demnach über direkte und indirekte Mechanismen zur Entstehung des perivaskulären Ödems, der interstitiellen Hämorrhagie, der Bildung von Thromben sowie zur Endothelzellaktivierung und damit zur zellulären Infiltration des Xenotransplantates bei (6,36).



**Abb.18** Schematische Darstellung der Komplementaktivierung am Endothel des Xenotransplantates. Die Bindung präformierter Ak (hauptsächlich IgM) an Gal-1,3-Gal des Gefäßendothels führt zur Anlagerung von C1qrs und damit zur Auslösung der Komplementkaskade über den klassischen Pathway, an dessen Ende die Bildung des MAC steht.

Die Freisetzung von löslichen Faktoren wie Zytokinen, Chemokinen und aktivierten Komplementfaktoren führt zu einer lokalen Ansammlung und zur Aktivierung von Entzündungszellen. Folge dieser Aktivierung ist die lokale Sekretion von Histamin durch Mastzellen, welches, in Kombination mit dem MAC (C5b-C9) und anderen Faktoren zur Degranulation von Thrombozyten führt. Dadurch werden große Mengen Gerinnungsfaktoren, Adenosindiphosphat (ADP) und Serotonin freigesetzt.

Durch die Retraktion der aktivierten Endothelzellen werden zu diesem Zeitpunkt der HAR subendotheliale Strukturen exponiert, die weitere gerinnungsaktivierende Substanzen enthalten. Stase, Thrombosierung und die erhöhte Gefäßpermeabilität führen irreversibel zum Transplantatversagen, was wegen des fulminanten zeitlichen Verlaufs als hyperakute Transplantatabstoßung (HAR) bezeichnet wird und als rasche Endothelzellaktivierung verstanden werden muss. Da die Zeit bis zur Transplantatabstoßung zu kurz ist, kommt es zu keiner Gentranskription und Proteinneusynthese (4,22). Stattdessen reagieren aktivierte Endothelzellen mit der Sekretion gespeicherter Mediatoren, Retraktion und dem Verlust antikoagulanter Schutzmechanismen (56,62).

#### **4.1.2 Therapeutische Strategien zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßung**

Verschiedene Ansätze zur Verhinderung der HAR werden im Augenblick diskutiert, wobei die modernen gentechnischen Methoden neue Perspektiven für eine klinisch erfolgreiche Xenotransplantation eröffnen. Die Xenotransplantation bietet im Gegensatz zur Allotransplantation den Vorteil, dass Spenderorgane bezüglich bestimmter Eigenschaften verändert werden können. Immunologische Hindernisse könnten durch genetische Manipulation des Spendertieres umgangen werden, was den Vorteil bieten würde, dass der Transplantatempfänger zumindest theoretisch nicht mit systemischen Nebenwirkungen, zum Beispiel durch Immunsuppressiva, belastet werden müsste. Während es jedoch bei Mäusen möglich ist, bestimmte Gene einzuführen (transgene Mäuse), aber auch zu entfernen (Knockout-Mäuse), sind genetische Manipulationen bei größeren Säugetieren (z.B. Schweinen) wegen der bisher limitierten Stammzelltechnologie auf die Züchtung transgener Tiere beschränkt (23). Dabei ist es entscheidend, diejenigen Gene zu modifizieren, die für die maßgeblichen pathogenetischen Vorgänge bei der hyperakuten Abstoßung codieren. Auchincloss et al (2) zeigten, dass die Aktivierung von Komplement der entscheidende Schritt bei der hyperakuten Abstoßung darstellt:

Das Komplementsystem wird von einer Reihe löslicher und membranständiger Regulatorproteine kontrolliert, die eine überschießende Komplementaktivierung verhindern sollen. Ein naheliegender Ansatz war es daher, menschliche Regulatoren von Komplement (RCA) membranständig auf xenogenen Endothelzellen zu exprimieren, um so die Aktivierung von menschlichem Komplement durch das Spenderorgan zu verhindern (3,26). Bisher wurden verschiedene RCA, wie der „decay accelerating factor“ (DAF: CD55), CD46 oder CD59 erfolgreich in transgenen Schweinen exprimiert (19,48). Bei verschiedenen Experimenten mit Primaten als Transplantatempfänger wurden durch diesen Ansatz Transplantatüberlebenszeiten bis zu 60 Tagen erreicht (48,80), wobei aber anzumerken ist, dass die Empfängertiere in sämtlichen vorliegenden Arbeiten zusätzlich mit erheblicher Immunsuppression behandelt wurden.

Eine weitere Möglichkeit der Manipulation von xenogenen Spenderorganen ist die Modifikation der Synthese von Gal $\alpha$ 1-3Gal am Endothel des Spenderorgans, da ein beträchtlicher Teil der xenoreaktiven Antikörper (XNA) gegen diese antigenen Strukturen gerichtet ist und durch die Bindung der XNA an diese Zucker die Komplementaktivierung eingeleitet wird (29). Durch Eliminierung der entsprechenden Galaktosyltransferase in einem

Knock-out-Mäusemodell konnte gezeigt werden, dass zwar die Synthese von Gal $\alpha$ 1-3Gal verhindert werden kann, in diesem Fall jedoch die natürlichen xenoreaktiven Antikörper die subterminalen Zucker (N-Acetyl-Lactosamine) als antigene Strukturen erkennen (73).

Ein attraktives Konzept scheint der Ansatz, Faktor H auf Spenderzellen zu exprimieren, da die Neusynthese von Faktor H ein gemeinsames Substrat mit der Synthese von Gal $\alpha$ 1-3Gal benutzt. Faktor H ist ein Regulator des alternativen Weges der Komplementaktivierung und fördert zusammen mit anderen Faktoren den Abbau von gebundenem C3b durch Faktor I. Hintergrund dieses Ansatzes ist es, durch eine transgene Überexpression von H-Transferase das Substrat für die Gal $\alpha$ 1-3Gal kompetitiv für die Neusynthese von Faktor H aufzubrauchen. In einer Arbeit mit transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass damit keine wesentliche anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal-Aktivität des menschlichen Serums mehr nachzuweisen war (65). Ferner ist Faktor H ein humaner Blutgruppenfaktor, gegen den die meisten Menschen keine Antikörper besitzen. Ein weiteres Beispiel, das diesem prinzipiellen Ansatz folgt, ist die Expression menschlicher MHC-Klasse-I-Moleküle auf Schweineendothelzellen (68) oder die Modulation der Endothelzellaktivierung, um noch zwei weitere Beispiele zu nennen.

### **Zusammenfassung der aktuellen therapeutischen Strategien zur Überwindung der hyperakuten Xenotransplantatabstoßung**

#### **Limitierung der Komplementaktivierung**

- Applikation menschlicher RCA (z.B. sCR1)
- Expression menschlicher RCA auf Schweineendothelzellen (z.B. DAF, MIRL)
- Reduktion zirkulierender XNA durch Kolumnenabsorption, Plasmapherese oder monoklonale anti-XNA-Ak
- Applikation von Cobra Venom Faktor (CVF) im Tierexperiment
- Applikation von Immunsuppressiva usw.

#### **Veränderung antigener Epitope auf den Endothelzellen**

- Maskierung von Gal $\alpha$ 1-3Gal-Epitopen durch Infusion „klebender“ Zucker
- Modifikation der  $\alpha$ 1-3 Galactosyltransferase
- Transgene Überexpression von Faktor H auf den Endothelzellen usw.

---

**Tabelle 2** Einige Therapieoptionen zur Verhinderung der HAR im Überblick

Was eine immunsuppressive medikamentöse Therapie anbelangt, so ist anzumerken, dass im Gegensatz zur Allotransplantation bislang keine Medikamente existieren, die in der Lage wären, in für den Transplantatempfänger tolerierbaren Dosierungen diejenigen Mechanismen zu beeinflussen, die zur Transplantatabstoßung führen. Experimentell wurde gezeigt, dass ein Cocktail verschiedener immunsuppressiver Maßnahmen (z.B. Bestrahlung, Cyclophosphamid, Steroide, FK 506, Cyclosporin, Leflunomide, Deoxyspergualin, Rapamycin und neuere Substanzen wie anti-CD25-Ak und Inhibitoren der T-Zell-Kostimulation) das Xenotransplantatüberleben zwar verlängern, diese Maßnahmen jedoch, vor allem in Kombination, für den Transplantatempfänger potentiell toxisch sind (68).

Eine weitere Möglichkeit der Verhinderung der HAR besteht in der Eliminierung der XNA aus dem Serum der Transplantatempfänger durch Plasmapherese (78), was zwar zu einer Verminderung der XNA für wenige Stunden, nicht jedoch zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der Xenotransplantate führte. Die selektive Ausschaltung von IgM-XNA durch die Applikation monoklonaler anti-IgM-Ak senkte die Konzentration der XNA unter die Nachweisgrenze, jedoch ebenfalls ohne eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der Xenotransplantate. Offensichtlich reichen geringste Mengen von IgM-XNA aus, um den Abstoßungsprozess zu initiieren (60).

Eine im Tierexperiment häufig eingesetzte Möglichkeit, die hyperakute Transplantatabstoßung zu überwinden, ist die Applikation des Schlangengiftes Cobra Venom Factor (CVF), der zu einem überschießenden Verbrauch von Komplementfaktoren führt und damit die Komplementkaskade zum Erliegen bringt. Durch die Injektion von CVF konnten im Tierexperiment deutlich längere Überlebenszeiten von mehreren Stunden bis zu zwei Tagen erreicht werden. Dies jedoch um den Preis einer erheblichen Morbidität und einer unkontrollierten Aktivierung von Entzündungsparametern (74,40,33). Die einmalige Injektion des Komplementregulatorproteins sCR1, das die C3-Konvertase hemmt, führte zur signifikanten Überlebenszeit-Verlängerung von diskordanten Xenotransplantaten in Nagetieren (57) und Primaten (58,59).

### ***4.1.3 Die verzögerte Transplantatabstoßung***

Nach erfolgreicher Überwindung der HAR durch die unter 4.1.2 abgehandelten Maßnahmen oder durch Verwendung Komplement-defekter Empfängertiere, wie in dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Xenotransplantationsmodell (siehe 4.2.1), kommt es dennoch zu einer Transplantatabstoßung nach einigen Tagen. Dieser Prozess wird als verzögerte Xenotransplantatabstoßung, oder akut vaskuläre Abstoßung bezeichnet. Die verzögerte Abstoßung stellt bezüglich Pathogenese und histologischem Bild eine eigene Entität dar und kann als Konsequenz einer kontinuierlichen Aktivierung von Transplantatendothelzellen verstanden werden. Im Gegensatz zur HAR sind hier jedoch auch Schritte beteiligt, die von einer de novo Proteinsynthese abhängen.

Die Endothelzellaktivierung ist charakterisiert durch die Synthese von Proteinen, die mit einem aktivierten Phänotyp einhergehen. Daran beteiligt sind unter anderem Gene, die als Regulatoren der Gerinnungsaktivierung eine wichtige Rolle spielen, wie Gewebefaktor (tissue factor, TF) und PAI-1 (plasminogen-activator-inhibitor 1) (46). Ebenso kommt es zu einer Induktion von Adhäsionsmolekülen, wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1, welche die Adhäsion von Leukozyten am Endothel vermitteln und damit die Infiltration des Transplantates fördern (63). Vermehrte Expression von MHC I-, MHC II-Molekülen und Kostimulationsmolekülen aus der B7-Familie, führen zu einer verstärkten Präsentation von Xeno-Antigenen und zur T-Zell-Stimulation. IL-1b, IL-6, IL-8 und MCP-1 werden ebenfalls im Sinne einer entzündlichen Reaktion als proinflammatorische und chemotaktische Zytokine vermehrt gebildet (9).

Der genaue Pathomechanismus der verzögerten Abstoßung ist noch nicht geklärt. Verschiedene Modelle werden diskutiert, wobei zusammenfassend anzunehmen ist, dass es sich um komplexe kumulative Interaktionen zwischen Endothelzellen, humoralen Faktoren, mononukleären Zellen und Thromozyten handelt. Diese Faktoren scheinen zudem durch die molekulare Inkompatibilität zwischen Spender- und Empfängereiweißen verstärkt zu werden.

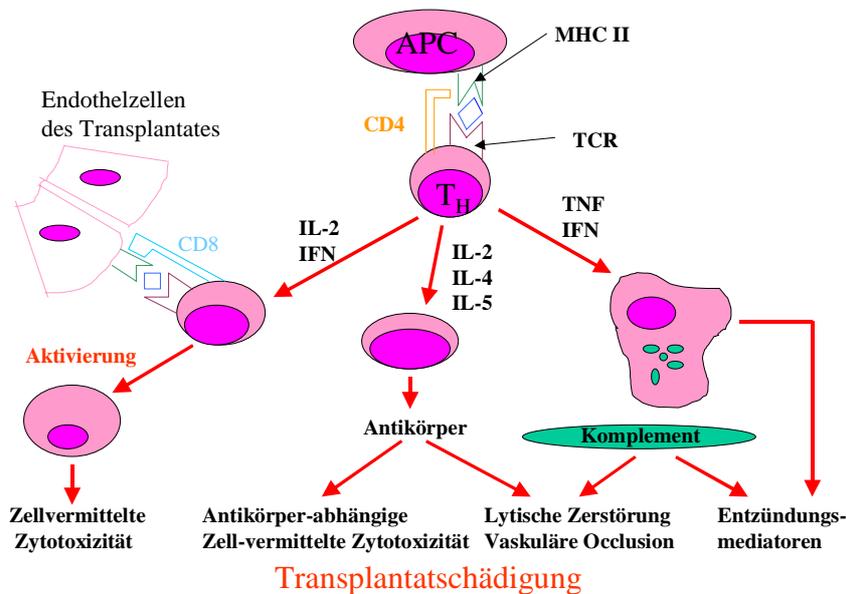
#### ***4.1.4 Die akute Transplantatabstoßung (T-Zell-vermittelte Abstoßung)***

Die Folgen der akuten Transplantatabstoßung werden frühestens ab dem dritten Tag, in der Regel aber in der ersten Woche nach Transplantation manifest. Diese Form der Transplantatschädigung ist Folge einer primären Aktivierung von T-Zellen und der nachhaltigen Triggerung einer Reihe von Effektor-Mechanismen, die insgesamt zu einem sehr heterogenen immunologischen und histologischen Bild der Transplantatdestruktion führen. Die akute Abstoßung ist in der Klinik die Hauptursache des frühen Allotransplantatverlustes (52).

Über ihren T-Zellrezeptor (TCR) erkennen die T-Zellen an das MHC-Molekül (Major Histocompatibility Complex) gebundene Fremdpeptide (z.B. Fremdpeptid, das durch eine virale Infektion von einer Zelle exprimiert und an MHC gebunden wird). In der normalen, d.h. physiologischen Situation, ist die Peptidbindungsstelle der MHC durch Eigenpeptid besetzt. Im Thymus werden die T-Zellen zum einen durch positive Selektion für die Interaktion mit Eigen-MHC, zum anderen durch Kontakt mit den Eigenpeptid-präsentierenden Dendritischen Zellen des kortikomedullären Übergangs geprägt. Positive und negative Selektion im Thymus verhindern, dass T-Zellen die Kombination Eigen-MHC /Eigen-Peptid erkennen und dadurch autoimmun mit körpereigenen antigenen Strukturen reagieren (31,37).

Wird nun im Rahmen einer Organtransplantation körperfremdes Gewebe implantiert, kommt es zu einer T-Zell vermittelten Reaktion des Immunsystems. Zum einen unterscheiden sich die MHC von Spenderorgan und Empfänger (z.B. durch unterschiedliche Varianten des HLA-A Antigens und differierende Ladung und Struktur der Peptidbindungsstelle), zum anderen auch die Peptide, die von den körpereigenen Zellen und den Zellen des Transplantates präsentiert werden. Diese Peptide werden als Minor Histocompatibility Complex bezeichnet (47). Das führt zu einer massiven Präsentation körperfremder antigener Strukturen, die von den T-Zellen des Empfängerorganismus erkannt werden. Bis zu 10% der T-Zellen reagieren auf diese Weise mit dem allogenen Spendergewebe. Die T-Zellen, die für die gegen das Spenderorgan gerichtete zelluläre Immunantwort verantwortlich sind, sind CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. Auch B-Lymphozyten und Entzündungszellen, wie Granulozyten und Makrophagen, sind an der akuten Abstoßung beteiligt (72).

Die Zellen des Transplantat-Parenchyms exprimieren vor allem MHC Klasse I-Moleküle, die Endothelzellen der Blutgefäße MHC Klasse I und II-Moleküle, sowie Adhäsionsmoleküle. Die  $T_H$ -Zellen werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aktiviert. Diese APC exprimieren MHC II und können sowohl vom Spender (passager transplantierte Leukozyten, interstitielle dendritische Zellen aus dem Transplantat), als auch vom Empfänger stammen. Die APC, die passager mit dem Transplantat in den Empfängerorganismus gelangen, führen zu einer direkten Aktivierung der  $T_H$ -Zellen des Empfängers. Die APC des Empfängers sind im drainierenden lymphatischen Gewebe lokalisiert, phagozytieren Spender-Antigen, präsentieren diese Fremdpeptide gebunden an MHC II und aktivieren auf diese Weise indirekt die  $T_H$ -Zellen. Die direkte Aktivierung scheint jedoch der massivere Stimulus für die Abstoßung zu sein (35,8).



**Abb.19** Immunologische Vorgänge bei der Aktivierung der T-Zell-vermittelten akuten Abstoßungsreaktion im Überblick.

Aktivierte  $T_H$ -Zellen sezernieren eine Reihe für die akute Abstoßung maßgeblicher Zytokine: Interleukin-2 (IL-2), das zu einer Aktivierung  $CD8^+$  zytotoxischer T-Zellen führt, und Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), das zu einer vermehrten Expression von MHC, zu einer gesteigerten Aktivität der APC, zu einer Aktivierung großer granulierter Lymphozyten und, zusammen mit TNF- $\beta$ , zu einer Aktivierung von Makrophagen führt. Die Zytokine IL-4, -5 und -6 stimulieren B-Lymphozyten und regen diese zur Produktion von Anti-Transplantat-Antikörpern an, die an antigene Strukturen der Zelloberflächen des Transplantates binden und so wiederum

Komplement fixieren können, das über eine Aktivierung der Komplementkaskade zur Bildung des MAC führt (25). Die Folgen sind lytische Zerstörung von Endothelzellen, Thrombosierung, interstitielle Hämorrhagie und die Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a, die wiederum maßgeblich für die zelluläre Infiltration des Transplantates mit inflammatorischen Zellen verantwortlich sind. IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$  stimulieren zudem die Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel und fördern damit zusätzlich die Migration von Leukozyten in das Parenchym des Transplantates (2,6,9,36,63). Besonders empfindlich für eine Schädigung im Rahmen einer akuten Abstoßungsreaktion sind die Endothelzellen und spezialisierte parenchymatöse Zellen, wie Inselzellen des Pankreas, Kardiomyozyten oder Tubulus-Zellen der Niere.

Die Rolle der T-Zell vermittelten Abstoßung bei der Xenotransplantation wird kontrovers diskutiert, da die komplexen Interaktionen zwischen TCR, APC und den verschiedenen T-Zellpopulationen stark von der Spezieskombination abhängig sind. Für die potentiell relevante Spezieskombination Schwein-Mensch konnte in verschiedenen in vitro- Studien gezeigt werden, dass porcine Antigene sowohl direkt (Antigen-Präsentation durch xenogene MHC-Moleküle auf xenogenen Zellen), als auch indirekt (Antigen-Präsentation durch eigene MHC-Moleküle auf eigenen APC) von menschlichen T-Lymphozyten erkannt werden, und dass es zu proliferativen und zytotoxischen T-Zell-Reaktionen kommt (2,49). Die xenogene T-Zell-Erkennung scheint der allogenen daher nahezu gleichwertig zu sein.

#### ***4.1.5 Die chronische Transplantatabstoßung***

Abhängig von der genetischen Verschiedenheit von Spender und Empfänger und abhängig von der immunsuppressiven Therapie (Steroide, Cyclosporin A, Tacrolimus, antiproliferative Wirkstoffe wie Azathioprin oder Mycophenolat Mofetil (MMF)), kann die Transplantatabstoßung ein sehr langsamer Prozeß sein, der sich über Monate bis Jahre erstreckt (52).

Die chronische Abstoßung wird definiert als eine progrediente Transplantatdysfunktion in Abwesenheit anderer Erkrankungen. Sie tritt frühestens nach 6-12 Wochen nach Transplantation auf und ist durch eine Reihe von morphologischen Veränderungen am Gefäßendothel, aber auch an anderen Geweben gekennzeichnet.

Die chronische Abstoßung scheint mehrere verschiedene Ursachen zu haben, wie eine latent ablaufende zelluläre Abstoßungsreaktionen oder die Ablagerung von Antikörpern oder Antigen-Antikörperkomplexen am Gefäßendothel mit konsekutiver Schädigung oder Aktivierung des Endothels (Freisetzung  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$ ). Auch physikalische (Hypertension) und virale (CMV-Infektion) Faktoren, sowie Reperfusionsschäden oder eine früher abgelaufene akute Abstoßungsreaktion können auslösend sein. Was aber letztlich die Ursache der chronischen Abstoßung ist, ist bisher unbekannt (81,34).

Histopathologisch kommt es zu einer luminalen Einengung von Arterien und Arteriolen durch die Proliferation glatter Muskelzellen, die von der Gefäßwand in das Endothel eingewandert sind und dort Matrixproteine einlagern. Zudem kommt es zu einer progredienten interstitiellen Fibrose des Transplantates. Beide Prozesse werden von einer Reihe verschiedener Wachstumsfaktoren, wie  $\text{TGF}\beta$ , unterhalten, die vermutlich als Folge immunologischer oder anderer Läsionen des Transplantates exprimiert werden.

Auch die Verwendung von Cyclosporin A kann die chronische Abstoßung eines Nierentransplantates nicht verhindern. Die chronische Abstoßung bleibt daher ein Problem der Transplantationsmedizin, was die Entwicklung neuer immunsuppressiver Medikamente notwendig macht. Im Bereich der Lebertransplantation scheint der Einsatz von FK 506 (Tacrolimus) vielversprechende Erfolge zu erzielen (44,27).

Da Xenotransplantate durch hyperakute oder verzögerte Abstoßung geschädigt werden, liegen nur wenige Daten zum Langzeitverlauf nach Xenotransplantation vor. Zunächst gilt es diese unmittelbaren immunologischen Barrieren zu verstehen und zu bezwingen, bevor Xenotransplantate tatsächlich längerfristig funktionstüchtig sein werden. Bei konkordanten Xenotransplantaten gibt es jedoch Anzeichen dafür, dass auch hier die chronische Abstoßung ein ernstzunehmendes Problem darstellen könnte (32). So findet sich bereits bei den ersten klinisch erfolgreich von Reemtsma durchgeführten konkordanten Xenotransplantationen die Fallbeschreibung einer Patientin, bei der 9 Monate nach Transplantation einer Schimpansenniere ausgeprägte subintimale Hyperplasien der Arteriolen des Transplantates nachgewiesen werden konnten. Diese Veränderungen sind mit der pathologisch-morphologischen Beschreibung einer chronischen Abstoßung vereinbar (61). In zahlreichen experimentellen Modellen der konkordanten und diskordanten Xenotransplantation fanden

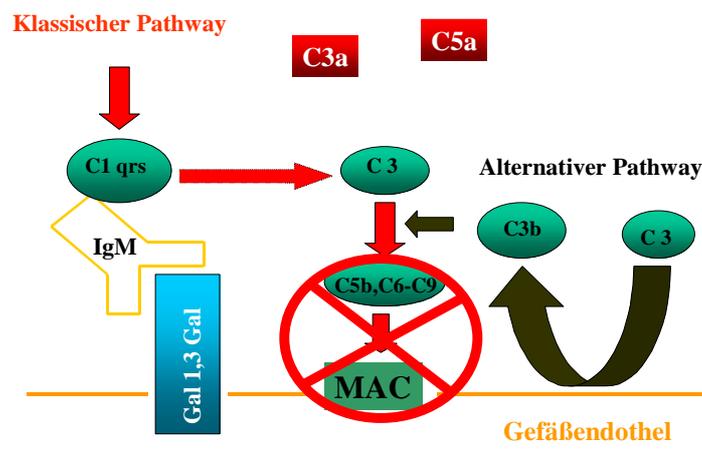
sich ähnliche Befunde einer zum Teil ausgeprägten Artherosklerose von Transplantatgefäßen (54,67).

Zusammenfassend kann also als angenommen werden, dass im hypothetischen Fall einer erfolgreichen klinischen Xenotransplantation auch hier mit der chronischen Abstoßung und ihren Folgen zu rechnen sein wird.

## 4.2 Spezielle Diskussion

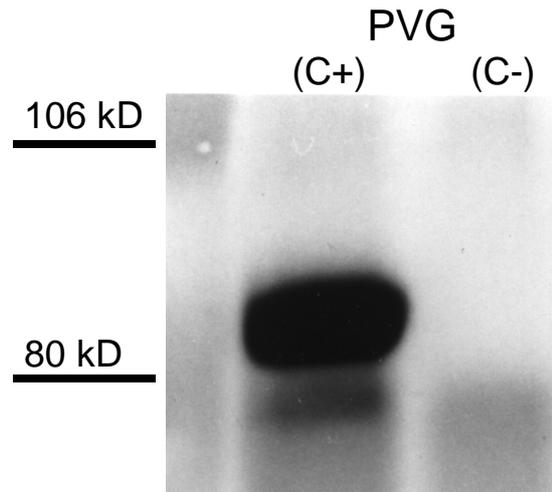
### 4.2.1 PVG C- Ratten als Transplantatempfänger

Die Entdeckung einer Rattenpopulation mit einem isolierten Defekt des Komplementfaktors C6 (PVG C-) ermöglicht eine diskordante Xenotransplantation ohne hyperakute Transplantatabstoßung, da die Komplementkaskade nicht vollständig aktiviert werden kann. Die Bildung des Membran Attack Complex (MAC), der aus C5b bis C9 besteht, wird durch das Fehlen von C6 verhindert. Der Vergleich mit der kongenen Rattenpopulation mit normalen C6-Spiegeln und ungestörter Komplementaktivierung bis zum MAC ermöglichte es, eine genaue Aussage über die Rolle eines einzelnen Komplementfaktors bei akuten Entzündungsreaktionen, wie der Allo- und der Xenotransplantatabstoßung und der akuten Infektion, zu treffen (7,11).



**Abb.20** Durch den isolierten Defekt des Komplementfaktors C6 in PVG C- Ratten wird die Bildung des MAC verhindert. Die Anaphylatoxine C3a und C5a werden weiterhin gebildet.

PVG C+ Ratten mit normaler hämolytischer Komplementaktivität stießen Herzxenotransplantate vom Meerschweinchen in  $0,2 \pm 0,1$ h (n=5) hyperakut ab, PVG C- Ratten mit einem isolierten Defekt des Komplementfaktors C6 hingegen stießen die Xenotransplantate erst nach  $29 \pm 3,4$ h (n=6) ab. Diese Überlebenszeiten diskordanter Xenotransplantate wurden ohne jede weitere Immunsuppression des Empfängertieres erreicht.



**Abb.21** Nachweis des hämolytischen Komplementdefektes auf Proteinebene mittels Western-Blot. In Western-Blots der Seren von PVG C+ Ratten konnte durch Verwendung eines monoklonalen Ak **Maus-anti-Ratte C6** eine doppelte Bande für C6 zwischen 80 und 90 kD identifiziert werden. Diese Bande war im Western-Blot der Seren von PVG C- Ratten nicht nachweisbar (Brauer RB et al, Xenotransplantation 1994; 1-3; mit freundl Genehmigung).

Die Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse früherer Arbeiten, die zeigten, dass die Beeinflussung des Komplementsystems der entscheidende Schritt ist, die HAR erfolgreich zu verhindern (57,41,40). Die charakteristischen makroskopischen und lichtmikroskopischen Veränderungen der Xenotransplantate, wie sie in der frühen Phase nach Reperfusion bei PVG C+ Ratten als Empfänger auftraten, waren bei den Xenotransplantaten, die in PVG C- Ratten transplantiert wurden, nicht zu beobachten. Arterielle Mikrothromben, Endothelzerstörung und interstitielle Hämorrhagie waren nach 5min nicht nachweisbar und nach 30min deutlich geringer ausgeprägt als bei den Xenotransplantaten, die nach 5min und 30min aus PVG C+ Ratten entnommen wurden (11).

Durch den isolierten Defekt des Komplementfaktors C6 wird ein später Schritt des klassischen und alternativen Reaktionsweges der Komplementkaskade blockiert. Die Formierung des MAC, der die osmotische Integrität der Endothelzellmembran durch die Bildung von Löchern zerstört, findet nicht mehr statt. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die endotheliale Bindung von IgM-XNAs und von C3 bei PVG C+ und bei PVG C- Ratten dieselbe Intensität hatte (11).

Die Tatsache, dass dennoch sowohl mittels Immunperoxidase als auch in den HE-gefärbten Organschnitten eine zunehmende Zerstörung des Xenotransplantates über den Zeitraum von 6 bis 24h post DXTx nachzuweisen war, legt den Schluss nahe, dass die bekannten,

sogenannten „frühen Mechanismen“, bis zur Aktivierung von C5b auch in den PVG C- Ratten funktionieren. Die Komplementkaskade läuft bis zu dem Schritt der Formierung des MAC ungestört ab. Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen bezüglich einer Zunahme des perivaskulären Ödems, der Zunahme der interstitiellen Hämorrhagie und der Zunahme einer zellulären Infiltration des Xenotransplantates mit hauptsächlich polymorph-nukleären Zellen (PMN) über den Beobachtungszeitraum bis 24h post DXTx, unterstützen diese Annahme. Die Abspaltung der potenten Mediatoren der akuten Entzündung, C3a und C5a, vermitteln die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulozyten und führen zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität (79). Zusätzlich vermitteln diese Anaphylatoxine eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel der Transplantate, was zu einem „Sticking and Rolling“ von PMNs entlang des Gefäßendothels der Xenotransplantate führt. Besonders deutlich war dieser Effekt nach 12h post DXTx zu sehen. Hier kam es zu einem perlschnurartigen „Sticking“ von PMNs entlang des Endothels mit nachfolgender Infiltration des Interstitiums und konsekutiver Freisetzung von Lysozymgranula (siehe Abb. 11).

Die Verwendung von PVG C- Ratten als Xenotransplantatempfänger ermöglicht also eine Überwindung der HAR und damit eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit diskordanter Xenotransplantate. Die Aktivierung der Komplementkaskade durch die Bindung von XNA wird jedoch nicht verhindert. Damit kommt es auch zur Freisetzung potenter Spaltprodukte der Kaskade, die eine progrediente Transplantatschädigung auslösen. Dennoch bietet dieser Ansatz der Überwindung der HAR den entscheidenden Vorteil, dass keine weitere Immunsuppression, mit ihren zum Teil noch unbekanntem Nebenwirkungen, verwendet werden muss. Somit können die zellulären und humoralen Vorgänge im Rahmen der Transplantatabstoßung nach Überwindung der HAR unbeeinflusst untersucht werden.

#### **4.2.2 Kinetik der zellulären Infiltration und morphologische Differenzierung**

Wie bereits beschrieben, ist die Verwendung von PVG C- Ratten als Xenotransplantatempfänger ein suffizienter Ansatz zur Verhinderung der HAR in der diskordanten Xenotransplantation. Da aber dennoch eine Aktivierung der Komplementkaskade stattfindet und diese auch bis kurz vor der Formierung des MAC abläuft, kommt es zur Bildung von Spaltprodukten, wie C3a und C5a, die letztlich die Transplantatabstoßung verursachen (11,12,13).

Herz xenotransplantate vom Meerschweinchen, die 6h nach DXTx entnommen wurden (n=6), wiesen bereits ein geringgradiges perivaskuläres Ödem und eine beginnende zelluläre Infiltration auf. In der HE-Färbung zeigten diese Zellen eine zytoplasmatische Granulierung. Die Phänotypisierung der Zellen mittels Immunperoxidase-Färbung zeigte, dass es sich hierbei hauptsächlich um CD11b-positive Granulozyten und ED1-positive Makrophagen handelt, die zu diesem Zeitpunkt der Abstoßung das Transplantat schädigen. Interstitielle Hämorrhagie ist zu diesem Zeitpunkt der Abstoßung nur vereinzelt zu sehen, intravaskuläre Thrombosierung hingegen ist nicht zu beobachten.

Während das perivaskuläre Ödem, die interstitielle Hämorrhagie und damit die Myokarddestruktion im Verlauf von 24h post DXTx kontinuierlich zunehmen, erreicht die Infiltration des Xenotransplantates mit CD11b- und ED1-positiven Zellen 12h post DXTx ihren Höhepunkt und nimmt auch im Verlauf weiterer 12h nicht mehr wesentlich zu. Auch in den HE-gefärbten Präparaten sind die deutlichsten morphologischen Veränderungen während der ersten 12h nach DXTx zu beobachten: erhebliche Zunahme des perivaskulären Ödems, der zellulären Infiltration, der interstitiellen Hämorrhagie und erstmals das Auftreten intravaskulärer Thromben in den Venen und Arterien des Xenotransplantates. Auch das perlschnurartige „Sticking“ von Granulozyten am Endothel zeigt sich 12h nach Xenotransplantation. Letztlich wird die Zerstörung des Transplantates durch das Ausmaß der interstitiellen Hämorrhagie bestimmt. Jedoch fehlen gefäßokkludierende Thromben, wie sie sich bei der HAR innerhalb kurzer Zeit formieren, bis zur endgültigen Transplantatabstoßung. Ursächlich hierfür könnte das Fehlen des MAC sein, der, neben anderen Faktoren, für die Degranulation von Thrombozyten bei der HAR verantwortlich ist. Dadurch kommt es zur Freisetzung großer Mengen von Gerinnungsfaktoren, ADP und Serotonin und damit zur Formierung von multiplen Gefäßthromben im Transplantat (69).

Weitere immunhistochemische Untersuchungen zur genauen Differenzierung des zellulären Infiltrates zeigten, dass es nur vereinzelt zu einer Infiltration des Xenotransplantates durch CD161-positive (NK-Zellen) und CD3-positive Zellen (T-Zellen) kommt. Im Verlauf von 24h post DXTx blieb diese Zellpopulation konstant, was den Rückschluss zulässt, dass sowohl NK-Zellen, als auch T-Zellen bei der Transplantatabstoßung nach Überwindung der HAR im beobachteten Zeitraum eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese spielen.

Xia G et al (83) zeigten, dass bei gleichzeitiger Absorption von XNA und Depletion von Komplementfaktoren durch Applikation von CVF (bei Verwendung von athymischen Nacktratten als Xenotransplantatempfänger) die NK-Zellen eine bedeutende Rolle bei der verzögerten Xenotransplantatabstoßung spielen. Wobei aber anzumerken ist, dass die einmalige Depletion von NK-Zellen zu keiner signifikanten Verlängerung des Transplantatüberlebens geführt hat, da bei NK-Zell-Suppression Makrophagen die Transplantatabstoßung entscheidend beeinflussten. Mit der aggressiven Kombination aus immuninkompetentem Empfänger, CVF-Applikation und der Entfernung von XNA vor Transplantation, konnten Überlebenszeiten von  $3,7 \pm 0,6$  Tagen erreicht werden (83). Eine maßgebliche Beteiligung von NK-Zellen am Abstoßungsprozess, selbst zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt, bleibt dennoch fraglich. Eine weitere Arbeitsgruppe, die mit splenektomierten, athymischen Nacktratten als Transplantatempfänger arbeitete, behandelte diese Tiere ebenfalls mit CVF vor, wobei auch hier Transplantatüberlebenszeiten zwischen 3 und 4 Tagen erreicht werden konnten. Drei Tage post DXTx bestand der Großteil des zellulären Infiltrates aus Makrophagen (> 75%). Der Anteil der NK-Zellen war mit 10-20% eher gering (17).

Im untersuchten Zeitraum bis 24h post DXTx scheint die maßgebliche zelluläre Infiltration durch CD11b-positive und ED1-positive Zellen stattzufinden. Die PMN sind offensichtlich für die direkte Schädigung des Xenotransplantates verantwortlich. NK-Zellen und T-Lymphozyten spielen keine Rolle. Auch bei Verlängerung des Transplantatüberlebens auf 3 bis 4 Tage scheinen eher die PMN als die NK-Zellen maßgeblichen Anteil am Abstoßungsprozess zu haben.

### 4.2.3 *Busulfan und Fucoidin*

Aufgrund der Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen galt es nun, ein therapeutisches Konzept zu finden, das zum einen durch selektive Depletion der Hauptpopulation von infiltrierenden Zellen das Transplantatüberleben verlängert und damit zum anderen beweist, dass eben diese Zellpopulation von PMN für die Transplantatschädigung innerhalb der ersten 24h post DXTx verantwortlich ist.

Busulfan ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches durch kovalente Bindung von Alkylresten an nukleophile Strukturen der DNS zytotoxische, aber auch mutagene und karzinogene Wirkung entfaltet. Eine typische Nebenwirkung beim Menschen ist die Busulfan-induzierte Lungenfibrose (50). Busulfan wirkt nicht nur auf sich teilende, sondern auch auf ruhende Zellen und schädigt sehr selektiv primitive Stammzellen der Myelopoese. Verschiedene Experimente zeigten, dass Busulfan einen starken Langzeiteffekt bezüglich der Suppression der Hämatopoese besitzt. Mit Busulfan behandelte Versuchstiere waren, im Gegensatz zu Versuchstieren, die mit anderen Chemotherapeutika behandelt wurden, am häufigsten von einer lang anhaltenden Reduzierung der Zellzahl im Blut, einer deutlichen Reduzierung der Zellzahl im Knochenmark, einer Verringerung des Stammzelleingehaltes im Knochenmark und einer Schwächung der Regenerationsfähigkeit der Hämatopoese betroffen (71,51).

Angestrebtes Ziel war es, durch selektive Suppression der Myelopoese eine Verlängerung des Transplantatüberlebens zu erreichen. Daher wurden die Angaben aus der Literatur zur Dosierung und Applikationsfrequenz von Busulfan dieser Zielsetzung angepasst. Wie auch bei der Vorbehandlung vor Knochenmarktransplantation im Rattenmodell, wurden 30mg Busulfan/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Busulfan lag dabei gelöst in 2,5%iger Carboxymethylcellulose vor (77). Auf eine Mehrfachapplikation vor DXTx wurde, im Gegensatz zu anderen in der Literatur beschriebenen Modellen, verzichtet, da ein therapeutischer Ansatz verfolgt wurde.

Zur Evaluierung des optimalen Applikationszeitpunktes von Busulfan vor DXTx wurden Knochenmarkausstriche mit Busulfan vorbehandelter PVG C- Ratten nach 3, 7 und 14 Tagen (je n=2) gewonnen und untersucht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Zeitpunkt für die Applikation von Busulfan am Tag -3 vor Herzxenotransplantation gewählt, da innerhalb der ersten 7 Tage nach Busulfan-Gabe die maximale Schädigung der Myelopoese zu erwarten

war. Dabei ist anzumerken, dass sämtliche Versuchstiere die Vorbehandlung mit Busulfan in der angegebenen Konzentration gut vertrugen. Das Xenotransplantatüberleben in dieser Versuchsgruppe lag bei  $62 \pm 21$ h (n=7) und damit signifikant über der Überlebenszeit der Herzxenotransplantate, die in unbehandelte PVG C-Ratten transplantiert wurden. Im Vergleich der histologischen Präparate von Herzxenotransplantaten, die 24h post DXTx aus vorbehandelten und nicht vorbehandelten Ratten entnommen wurden, zeigte sich eine deutlich geringere Schädigung des Herzxenotransplantates und eine erheblich geringere Infiltration durch polymorph-nukleäre Zellen. Das bedeutet, dass für die Schädigung des Transplantates innerhalb von 24h post DXTx diese polymorph-nukleären Zellen (Makrophagen und Granulozyten) verantwortlich sind und eine Vorbehandlung der Empfängertiere mit Busulfan in der angegebenen Konzentration ein therapeutischer Ansatz zur Verlängerung des Transplantatüberlebens ist. Um diesen Ansatz zu verfolgen, wären weitere Transplantationsexperimente mit Busulfan- vorbehandelten Empfängertieren notwendig. Dabei könnten längere Überlebenszeiten, zum Beispiel durch eine Mehrfachapplikation von Busulfan in therapeutischen Dosierungen, möglich werden.

Zusätzlich wurden vergleichende RNase-Protection-Assays durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit die Ausschüttung von Zytokinen über den Verlauf von 24h post DXTx variiert und wie sich deren Konzentration über die Vorbehandlung mit alkylierenden Chemotherapeutika beeinflussen lässt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assays erbrachten jedoch keine auswertbaren Ergebnisse. Da aufgrund der umfangreichen histologischen Untersuchungen von jedem Herzxenotransplantat sehr viel Gewebe benötigt wurde, stand für eine beliebige Wiederholung der RNase –Protection –Assays nicht mehr ausreichend Gewebe zur Verfügung.

Die Endothelzellaktivierung im Rahmen der Transplantatabstoßung führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen an den Endothelzellen (63). Daher war eine Überlegung, diese Adhäsionsmoleküle medikamentös zu blockieren, um eine weitere Verlängerung des Xenotransplantatüberlebens zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden PVG C- Ratten nach vollendeter Herzxenotransplantation mit dem Selektinhemmer Fucoidin (Fucose-4 Sulfat), zunächst in einer Konzentration von 50mg/kg Körpergewicht i.p. (gelöst in 0,9% Kochsalzlösung), behandelt. Die Konzentrationsangaben wurden aus der Literatur entnommen, wobei aber anzumerken ist, dass sich die Verwendung von Fucoidin in den

recherchierten Arbeiten auf die Verwendung bei in vitro Experimenten oder in der Intravitalmikroskopie beschränkte (53,21,42,76). Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass Fucoidin in vitro effektiv L- und P-Selektine bindet und damit die L-Selektin abhängige Zellantwort hemmt. Die systemische Gabe von Fucoidin hemmt das „Rolling and Sticking“ ruhender und aktivierter Leukozyten in postkapillären Venolen von Kaninchen und die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in Entzündungsherden der Haut und des zentralen Nervensystems (75,76). Außerdem besitzen Fucane heparin-ähnliches antikoagulatives Potential und hemmen, abhängig von ihrem Molekulargewicht, den klassischen und alternativen Reaktionsweg der Komplementkaskade, ohne jedoch die späten Schritte zu hemmen. Zur Verhinderung der Thrombozytenaktivierung als einen der maßgeblichen Faktoren der HAR, wurde in vivo Fucoidin (in Kombination mit einem Inhibitor des von Willebrand-Faktors) getestet, wobei eine massive Thrombozytenaggregationshemmung und eine effektive Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch Fucoidin bewiesen werden konnte (1,10). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit Fucoidin war eine nicht akzeptable Letalität der Versuchstiere zu beobachten. Die Hauptursache hierfür waren vor allem starke Blutungen aus den Gefäßanastomosen, die meist mit einer Latenz von 3 bis 4h post DXTx auftraten und zum Tod der Versuchstiere führten. Diese Blutungen waren auch nicht durch eine Reduzierung der Fucoidindosis auf  $\frac{1}{4}$  der ursprünglichen Konzentration unter Kontrolle zu bringen, sodass die Versuche mit Fucoidin eingestellt wurden. Die überlebenden Tiere (n=5) wiesen zudem keine signifikante Verlängerung des Transplantatüberlebens auf. Die beobachtete Komplikation der massiven Nachblutung ist mit der heparin-ähnlichen Wirkung von Fucoidin zu erklären, nicht jedoch die ebenfalls beobachteten toxischen Kreislaufreaktionen einiger Versuchstiere.

Die Transplantationsmedizin ist im Augenblick noch weit von der Möglichkeit entfernt, primär vaskularisierte Organe vom Schwein auf den Menschen zu transplantieren, da die immunologischen Barrieren noch nicht überwunden werden können. Ein Xenotransplantatüberleben ist nur im Tierexperiment, und dort meist unter Zuhilfenahme einer Kombination sehr aggressiver immunsupprimierender Maßnahmen, möglich.

Eine erfolgreiche Xenotransplantation (vor allem Schwein-Mensch) wäre eine hoffnungsvolle Chance, den Mangel an geeigneten allogenen Spenderorganen zu beheben. Tissue-Engineering und die Möglichkeiten der modernen Stammzellforschung sind ernsthafte Konkurrenten der Xenotransplantation, da sie die Erschaffung von passenden „Ersatzorganen“

im Reagenzglas, ohne die gefürchteten antigenen Eigenschaften, versprechen. Aber auch hier hätte die Xenotransplantation ihren Platz, da sie die Überbrückung („Bridging“) zwischen drohendem klinischen Organversagen und der endgültigen Implantation oder Transplantation eines geeigneten Organs leisten könnte- als Maßnahme auf Zeit.

Sollten die immunologischen Barrieren in absehbarer Zeit überwunden werden können, tauchen verschiedene neue Probleme auf:

So ist es zum Beispiel unklar, welches Wachstumspotential Schweineherzen im menschlichen Thorax nach DXTx entwickeln, oder ob ein Schweineherz, dessen Klappenebene auf einen horizontalen Pumpmechanismus ausgelegt ist, den hämodynamischen Anforderungen des menschlichen Körpers gewachsen wäre. Außerdem besitzen verschiedene Peptide des Schweins, wie Erythropoetin und Parathormon, für das menschliche Immunsystem antigene Eigenschaften. Das Potential der Übertragung xenogener Infektionen vom Tier auf den Menschen ist ein weiterer wesentlicher Punkt, der so ernst genommen wird, dass schon heute verschiedene Forschungsgruppen und Behörden weltweit an deren Erforschung und an der Erstellung von Richtlinien und Empfehlungen arbeiten. Ein wichtiges Beispiel sind die „endogenen Retroviren (ERV)“, für die in vitro nachgewiesen werden konnte, dass sie menschliche Endothelzellen infizieren. Über die Folgen einer solchen Infektion ist bisher aber wenig bekannt (20).

Die Suche nach Auswegen aus dem Dilemma der modernen Transplantationsmedizin und die Erforschung potentieller bedarfsgerechter Lösungen zur Behebung des Organmangels werden daher noch über viele Jahre Inhalt umfassender Forschungsvorhaben sein.

## **5 Zusammenfassung**

Die maßgebliche Beteiligung des Komplementsystems an der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) und an anderen akut inflammatorischen Vorgängen ist allgemein akzeptiert. Daher greifen auch viele Strategien anderer Arbeiten an diesem Mechanismus an, um eine Verlängerung des Überlebens von Xenotransplantaten zu erreichen (3,19,26,33,40,48,74,80).

Die Mechanismen der HAR in der diskordanten Xenotransplantation (DXTx) wurden in der vorliegenden Arbeit in einem neu eingeführten Modell der C6-defekten Ratte (PVG C-) untersucht. Durch einen isolierten Defekt des Komplementfaktors C6 wird bei diesem Rattenstamm eine vollständige Aktivierung der Komplementkaskade und die Formierung des MAC verhindert, ohne die Aktivierung früher Komplementfaktoren zu beeinträchtigen. Der isolierte C6-Defekt verhindert die Formierung des MAC und damit die HAR, nicht jedoch die Bildung der Splitprodukte C3a und C5a, die durch ihre potente chemotaktische Wirkung für die Schädigung und letztlich Abstoßung von Xenotransplantaten, auch nach Überwindung der HAR, verantwortlich sind (7,11,12,13,14). Diskordante Herzxenotransplantate vom Meerschweinchen wurden von PVG C- Ratten nach  $29 \pm 3,4$ h (n=6) abgestoßen, von Ratten ohne Komplementdefekt jedoch bereits nach  $0,2 \pm 0,1$ h (n=5) hyperakut abgestoßen (eigene Ergebnisse).

Die genaue Untersuchung der Vorgänge nach Überwindung der HAR, insbesondere die Phänotypisierung und Quantifizierung des zellulären Infiltrates, sowie die Untersuchung der von den infiltrierenden Zellen exprimierten Zytokine mittels RNase-Protection Assay, waren Ziel dieser Arbeit.

Zu diesem Zweck wurden Meerschweinchenherzen heterotop in PVG C- Ratten transplantiert, die Herzxenotransplantate nach 6, 12 und 24h (je n=6) entnommen und histologisch und immunhistochemisch untersucht. Als Vergleich dienten Präparate nicht transplanterter Meerschweinchenherzen (n=4). Durch die Färbung der Präparate mit Hämatoxilin-Eosin (HE) konnte eine Kinetik der Xenotransplantatschädigung, die unabhängig vom MAC stattfand, im Verlauf von 24h nach DXTx erstellt werden. Hier zeigte sich im Verlauf ein zunehmendes perivaskuläres Ödem, zunehmende zelluläre Infiltration des Transplantates, eine Zunahme der interstitiellen Hämorrhagie und vereinzelt intravaskuläre Thromben. Im Gegensatz zur HAR

war diese Thrombosierung bis zur endgültigen Transplantatabstoßung nur vereinzelt zu sehen, was vermutlich auf das Fehlen des MAC zurückzuführen ist.

Die HE-Färbung zeigte, dass der Großteil der zellulären Infiltration innerhalb der ersten 12h post DXTx stattfand. Die immunhistochemische Differenzierung des Infiltrates mittels Immunperoxidase-Färbung zeigte, dass der größte Anteil dieser Zellen aus CD11b-positiven Granulozyten und ED1-positiven Makrophagen besteht (sog. polymorph-nukleäre Zellen; PMN). CD3-positiv T-Zellen und CD161-positiv Natural Killer Cells (NK-Zellen) spielen bei der Xenotransplantatabstoßung nach Überwindung der HAR offensichtlich keine Rolle, da ihr Anteil am zellulären Infiltrat verschwindend gering war und auch im Verlauf von 24h nach DXTx konstant blieb.

Um die maßgebliche Rolle des beobachteten zellulären Infiltrates an der verzögerten Abstoßung im beobachteten Zeitraum zu beweisen, wurden PVG C- Ratten am Tag -3 vor Xenotransplantation mit Busulfan vorbehandelt. Busulfan schädigt sehr selektiv primitive Stammzellen der Myelopoese (50,51,71). Durch die Vorbehandlung mit Busulfan konnte die Überlebenszeit diskordanter Xenotransplantate auf  $62 \pm 21$ h (n=7) verlängert werden. Die vergleichende histologische Untersuchung diskordanter Herzxenotransplantate, die 24h post DXTx aus vorbehandelten (n=5) und nicht vorbehandelten (n=6) Ratten entnommen wurden, zeigte eine deutlich geringere Schädigung der Herzxenotransplantate, die aus Busulfan-vorbehandelten Ratten entnommen wurden. Das perivaskuläre Ödem, die interstitielle Hämorrhagie und das zelluläre Infiltrat waren erheblich geringer ausgeprägt. Das beweist, dass die Schädigung diskordanter Xenotransplantate innerhalb der ersten 24h nach Überwindung der HAR auf die Infiltration mit PMN zurückzuführen ist, und dass deren Ausschaltung zu einer signifikanten Verlängerung des Transplantatüberlebens führt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Hauptschädigung des Transplantates innerhalb der ersten 12h post DXTx stattfindet.

Da vor allem 12h nach DXTx lichtmikroskopisch ein „Sticking“ von PMN am Gefäßendothel des Transplantates beobachtet werden konnte, war eine weitere Überlegung, die Adhäsion von PMN am Gefäßendothel zu blockieren (63). Dadurch sollte die zelluläre Infiltration minimiert, und das Transplantatüberleben verlängert werden. Zu diesem Zweck wurde PVG C- Ratten unmittelbar nach DXTx der Selektinhemmer Fucoidin i.p. appliziert (21,42,53,76).

Es zeigte sich jedoch keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit diskordanter Herzxenotransplantate. Außerdem waren die Versuche mit Fucoidin mit einer unverträglich hohen Letalität der Empfängertiere assoziiert, so dass diese Versuche eingestellt werden mussten.

## **6 Literaturverzeichnis**

1. **Alwayn IP**, Appel JZ, Goepfert C, Buhler L, Cooper DK, Robson SC: Inhibition of platelet aggregation in baboons: therapeutic implications for xenotransplantation. *Xeno* 7 (2000) 247-57
2. **Auchincloss H**: Xenogeneic Transplantation, a review. *Transplantation* 46 (1988) 1-20
3. **Bach FH**, Turman MA, Vercellotti GM, Platt JL, Dalmaso AP: Accomodation: A Working Paradigm for Progressing Toward Clinical Discordant Xenografting. *Transplant Proc* 23 (1991) 205-207
4. **Bach FH**, Soares M, Lin Y, Ferran C: Barriers to Xenotransplantation. *Transplant Proc* 31 (1999) 1819-1820
5. **Bach FH**, Vanhove B: Human Xenoreactive Natural Antibodies- Avidity and Targets on Porcine Endothelial Cells. *Transplantation* 56 (1993) 1251-1292
6. **Bach FH**, Robson SC, Ferran C, Winkler H, Millan MT, Stuhlmeier KM, Vanhove B, Blakely ML, van der Werf WJ, Hofer E, De Martin R, Hancock WW: Endothelial Cell Activation and Thromboregulation during Xenograft Rejection. *Immunol Rev (Denmark)* 141 (1994) 5-30
7. **Baldwin WM**, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F: Complement in Organ Transplantation, Contribution to Inflammation, Injury and Rejection. *Transplantation* 59 (1995) 797-808
8. **Bjorkman PJ**, Saper Martin E, Samaroui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329 (1987) 512-8
9. **Blakely ML**, van der Werf WJ, Berndt MC, Dalmaso AP, Bach FH, Hancock WW: Activation of Intragraft Endothelial and Mononuclear Cells During Discordant Xenograft Rejection. *Transplantation* 58 (1994) 1059-1066
10. **Blondin C**, Chaubet F, Nardella A, Sinquin C, Jozefonvicz J: Relationships between chemical characteristics and anticomplementary activity of fucans. *Biomaterials (England)* 17 (1996) 597-603
11. **Brauer RB**, Baldwin WM, Daha MR, Pruitt SK, Sanfilippo F: Use of C6-deficient rats to evaluate the mechanism of hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts. *J Immunol* 151 (1993) 7240-7248
12. **Brauer RB**, Baldwin WM, Sanfilippo F: The use of C deficient animals to evaluate the mechanism of hyperacute rejection in discordant xenografting. *Xeno* 2 (1994) 1-3
13. **Brauer RB**, Baldwin WM, Pruitt SK, Sanfilippo F: Rat strain differences in complement activation correlating with hyperacute rejection of guinea-pig cardiac xenografts. *Transpl Proc* 25 (1993) 2848-9

14. **Breimer ME:** Physiologic Incompatibilities in Discordant Xenotransplantation. *Transplant Proc* 31 (1999) 905-908
15. **Buckley TA:** The shortage of solid organs for transplantation in Hong Kong: part of a worldwide problem. *Hong Kong Med J* 6 (2000) 399-408
16. **Calne RY:** Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc* 2 (1970) 550-556
17. **Candinas D,** Belliveau S, Koyamada N, Miyatake T, Hechenleitner P, Mark W, Bach FH, Hancock WW: T Cell Independence of Macrophage and Natural Killer Cell Infiltration, Cytokine Production and Endothelial Activation during delayed Xenograft Rejection. *Transplantation* 62 (1996) 1920-1927
18. **Candinas D,** Seebach JD: Mechanismen der Xenotransplantatabstoßung. *Zentralblatt für Chirurgie* 124 (1999) 591-599
19. **Cary N,** Moody J, Yannoutsos N, Wallwork J, White D: Tissue Expression of Human Decay Accelerating Factor, a Regulator of Complement Activation Expressed in Mice: A potential Approach to Inhibition of Hyperacute Xenograft Rejection. *Transplant Proc* 25 (1993) 400-401
20. **Chapman LE,** Heneine W, Switzer W, Sandstrom P, Folks TM: Xenotransplantation: The Potential for Xenogeneic Infections. *Transplant Proc* 31 (1999) 909-910
21. **Charreau B,** Blondin C, Boisson-Vidal C, Souillou J-P, Anegon I: Efficiency of Fucans in Protecting Porcine Endothelial Cells against Complement Activation and Lysis by Human Serum. *Transplant Proc* 29 (1997) 889-890
22. **Cotran RS,** Pober JS: Endothelial Activation and Inflammation. *Prog Immunol* 8 (1989) 747-754
23. **Cozzi E,** Tucker AW, Langford GA, Pino-Chavez G, Wright L, O'Connell MJ, Young VJ, Lancaster R, McLaughlin M, Hunt K, Bordin MC, White DJ: Characterization of pigs transgenic for human decay-accelerating factor. *Transplantation* 64 (1997) 1383-92
24. **Daar AS:** Ethics of Xenotransplantation: animal issues, consent and likely Transformation of Transplant Ethics. *World J Surg* 21 (1997) 975-982
25. **Dallman MJ,** Clark GJ: Cytokines and their receptors in transplantation. *Curr Opin Immunol* 3 (1991) 729-34
26. **Dalmasso AP,** Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH: Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 52 (1991) 530-533
27. **Demetris AJ,** Lasky S, Van Thiel DH, Starzl TE, Dekker A: Pathology of hepatic transplantation: A review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine/ steroid regimen. *Am J Pathol* 118 (1985) 151-161

28. **Edwards JM**, Hasz RD, Robertson VM: Non-heart-beating organ donation: process and review. *AACN Clin Issues* 10 (1999) 293-300
29. **Galili U**: Interaction of the natural anti-Gal antibody with  $\alpha$ -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today (England)* 14 (1993) 480-482
30. **Garcia-Valdecasas Salgado JC**: Non beating heart donors as a possible source for liver transplantation. *Acta Chir Belg* 100 (2000) 286-71
31. **Halloran PF**, Broski AP, Batiuk TD : The molecular immunology of acute rejection : a review. *Transplant Immunol* 1 (1993) 3-27
32. **Hammer C**: Fundamental problems of xenotransplantation. *Pathol Biol (Paris)* 42 (1994) 203-207
33. **Hayashi S**, Ito M, Yokoyama I, Uchida K, Takagi H : Effectiveness of combination therapy using cobra venom factor, splenectomy and desoxyspergualin in guinea pig-to rat cardiac xenografts. *Transplant Proc* 25 (1993) 405-406
34. **Hayry P**, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemstrom A, Raisanen-Sokolowski, Koskinen P, Ustinov J, Lautenschlager I, Taskinen E: Chronic allograft rejection. *Immunol Rev* 134 (1993) 33-81
35. **Hood C**, Steinmetz M, Malissen B: Genes of the Major Histocompatibility Complex of the mouse. *Annu Rev Immunol* 1 (1983) 529-568
36. **Hunt BJ**, Rosenberg RD: The essential role of haemostasis in hyperacute rejection. *Xeno* 1 (1993) 16-20
37. **Hutchinson IV**: Cellular mechanisms of allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 3 (1991) 722-8
38. **Kievit JK**, Oomen AP, Heinemann E, Kootstra G: The importance of non-heart-beating donor kidneys in reducing the organ shortage. *EDTNA ERCA J* 23 (1997) 11-3
39. **Kootstra G**, Kievit JK, Heinemann E: The non heart-beating donor. *Br Med Bull* 53 (1997) 844-853
40. **Leventhal JR**, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RD, Matas AJ: Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 55 (1993) 857-865
41. **Leventhal JR**, Dalmaso AP, Cromwell JW, Manivel CJ, Bolman III RM, Matas AJ : Complement depletion prolongs discordant cardiac xenograft survival in rodents and non-human primates. *Transplant Proc* 25 (1993) 398-399
42. **Linke R**, Wagner F, Terajima H, Thiery J, Teupser D, Leiderer R, Hammer C: Prevention of initial perfusion failure during xenogeneic ex vivo liver perfusion by selectin inhibition. *Transplantation* 66 (1998) 1265-1272

43. **Lu CY**, Khair-el-Din TA, Dawidson IA, Butler TM, Brasky KM, Vazquez MA, Sicher SC: Xenotransplantation. *FASEB J* 8 (1994) 1122-1130
44. **Ludwig J**, Wiesner RH, Batts KP, Perkins JD, Krom RA: The acute vanishing bile duct syndrome (acute irreversible rejection) after orthoptic liver transplantation. *Hepatology* 7 (1987) 476-83
45. **Lysaght MJ**, Reyes J: The growth of tissue engineering. *Tissue Eng* 7 (2001) 485-493
46. **Mackman N**, Fowler BJ, Edgington TS, Morrissey JH: Functional analyses of the human tissue factor promoter and induction by serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 2254-2258
47. **Mason DW**, Morris PJ: Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu Rev Immunol* 4 (1986) 119- 45
48. **McCurry KR**, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, Platt JL: Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* 1 (1995) 423-45
49. **Murphy B**, Auchincloss H, Carpenter CB, Sayegh MH: T cell recognition of xenom-MHC peptides during concordant xenograft rejection. *Transplantation* 61 (1996) 1133-1137
50. **Mycek JM**, Harvey RA (Hrsg.), Champe PC (Hrsg.), Fisher BD, Cooper M: *Anticancer Drugs*, aus: Lippincott's Illustrated Reviews in Pharmacology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Second Edition (1997) 374, 387-90
51. **Neben S**, Hemman S, Montgomery M, Ferrara J, Mauch P: Hematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents. *Exp Hematol* 21 (1993) 156-162
52. **Neuberger J** : Incidence, timing, and risk factors for acute and chronic rejection. *Liver Transpl Surg* 5 (1999) 30-36
53. **Omata M**, Matsui N, Inomata N, Ohno T: Protective Effects of Polysaccharide Fucoidin on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 30 (1997) 717-724
54. **O'Hair DP**, Mc Morus RP, Komorowski R: Inhibition of chronic vascular rejection in primate cardiac xenografts using mycophenolate mofetil. *Ann Thorac Surg* 58 (1994) 1311-1315
55. **Ono K**, Lindsey ES: Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 57 (1969) 225-229
56. **Pober JS**, Cotran RS: The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50 (1990) 537-544

57. **Pruitt SK**, Baldwin III WM, Marsh Jr HC, Lin SS, Yeh CG, Bollinger RR: The effect of soluble complement receptor Type 1 on hyperacute xenograft rejection. *Transplantation* 52 (1991) 868-873
58. **Pruitt SK**, Bollinger RR, Collins BH, Marsh HC, Jr., Levin JL, Rudolph AR, Baldwin III WM, Sanfilippo F: Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation* 63 (1997) 900-902
59. **Pruitt SK**, Bollinger RR, Collins BH, Marsh HC, Levin JL, Rudolph AR, Baldwin III WM, Sanfilippo F: Continuous complement (C) inhibition using soluble C receptor type 1 (sCR1): effect on hyperacute rejection (HAR) of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplant Proc* 28 (1996) 756
60. **Pruitt SK**, Baldwin III WM, Barth RN, Sanfilippo F: The effect of xenoreactive antibody and B cell depletion on hyperacute rejection of guinea pig-to-rat cardiac Xenografts. *Transplantation* 56 (1993) 1318-1324
61. **Reemtsma K**, Mc Cracken BH, Schlegel JY, Pearl Martin E, Pearce CW, De Witt CW, Smith PE, Herwitt RL, Creech OJ: Renal heterotransplantation in man. *Ann Surg* 160 (1964) 384-410
62. **Robson SC**, Kaczmarek E, Siegel JB, Candinas D, Koziak K, Millan M, Hancock WW, Bach FH: Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med* 185 (1997) 153-163
63. **Robson SC**, Candinas D, Hancock WW, Wrighton C, Winkler H, Bach FH: Role of endothelial cells in transplantation. *Int Arch Allergy Immunol* 106 (1995) 305-322
64. **Saadi S**, Takahashi T, Nagayasu T, Holzknacht RA, Platt JL: The Role of Cytokines in Rejection of Discordant Xenotransplants. *Transplant Proc* 31 (1999) 911-912
65. **Sandrin MS**, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohn S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, McKenzie IFC: Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nat Med* 1 (1995) 1261-1267
66. **Scarpatti EM**, Sadler JE: Regulation of endothelial cell coagulant properties. Modulation of tissue factor, plasminogen activator inhibitors and thrombomodulin by phorbol 12-myristate 13-acetate and tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 264 (1989) 20705-20713
67. **Scheringa M**, Buchner M, Geerling RA, de Bruin RW, Schraa EO, Bouwman E, Ijzermans JN, Marquet RL: Chronic rejection after concordant xenografting. *Transplant Proc* 26 (1994) 1346-7
68. **Seebach JD**, Comrack C, Germana S, Le Guern C, Sachs DH, Der Simonian H: HLA-Cw3 expression on porcine endothelial cells protects against xenogeneic cytotoxicity mediated by a subset human NK cells. *J Immunol* 159 (1997) 3655-3661

69. **Sims PJ**, Wiedmer T: The response of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol Today* 12 (1991) 338-342
70. **Smit H**, Sasse R, Molzahn M, Schulin B: Organspende und Transplantation in Deutschland. *Deutsche Stiftung Organtransplantation* 4 (2001) 1-17
71. **Soots A**, Häyry P: Prolongation of rat cardiac allograft survival by donor pretreatment. *Transplantation* 25 (1978) 259-263
72. **Steinmuller D**: Which T cells mediate allograft rejection? *Transplantation* 40 (1985) 229-33
73. **Tange MJ**, Katerelos M, Crawford RJ, Robins AJ, Shinkel T, Pearse MJ, D'Apice AJF: Analysis of a 1,3 galactosyltransferase knockout mice. The third international Congress for Xenotransplantation, Boston (1995)
74. **Tavakoli R**, Michel A, Cardoso J, Ayani E, Maillet F, Fontaliran F, Crougneau S, Weill B, Houssin D: Prolonged survival of Guinea Pig-to-rat Xenografts using repeated low doses of Cobra Venom Factor. *Transplant Proc* 25 (1993) 407-409
75. **Teixeira MM**, Rossi AG, Hellewell PG: Adhesion mechanisms involved in C5a-induced eosinophil homotypic aggregation. *J Leukoc Biol* 59 (1996) 389-395
76. **Teixeira MM**, Hellewell PG: The effect of the selectin binding polysaccharide fucoidin on eosinophil recruitment in vivo. *Br J Pharmacol* 120 (1997) 1059-1066
77. **Tutschka PJ**, Santos GW: Bone Marrow Transplantation in the Busulfan-treated Rat. *Transplantation* 20 (1975) 101-106
78. **Van de Stadt J**, Vendeville B, Weill B, Crougneau S, Michel A, Filipponi F, Icard P, Renoux M, Louvel A, Houssin D: Discordant heart xenografts in the rat. *Transplantation* 45 (1988) 514-518
79. **Vercelotti GM**, Platt JL, Bach FH, Dalmaso AP: Neutrophil adhesion to xenogeneic endothelium via iC3b. *J Immunol* 146 (1991) 730-734
80. **White DJG**: Hearts from pigs transgenic for human Decay-accelerating Factor are not rejected when xenografted to primates. The third international Congress for Xenotransplantation, Boston (1995)
81. **Williams GM**, ter Haar A, Parks LC, Krajewski CA: Endothelial changes associated with hyperacute, acute, and chronic renal allograft rejection in man. *Transplant Proc* 5 (1973) 819-22
82. **Wolf P**: Which graft for which patient?and when? I. Graft shortage: causes and solutions. *Rev Prat* 47 (1997) 18-21
83. **Xia G**, Ji P, Rutgeerts O, Waer M: Natural Killer Cell- and Macrophage mediated discordant Guinea Pig-to Rat Xenograft Rejection in the absence of Complement, Xenoantibody and T Cell Immunity. *Transplantation* 70 (2000) 86-93

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1** OP-Arbeitsplatz für die heterotop Herzxenotransplantation im Meerschweinchen-Ratte-Modell.
- Abb.2** PVG C- Ratte in Äthernarkose vor Herzxenotransplantation.
- Abb.3** Schematische Darstellung des Blutflusses im heterotop transplantierten Herzxenotransplantat unter Umgehung des linken Ventrikels.
- Abb.4** Schematische Darstellung der Präparation des Spenderherzens in situ für die heterotop Herztransplantation.
- Abb.5** Darstellung der Technik der aorto-aortalen Anastomose (K Ono, ES Lindsey,54).
- Abb.6** Darstellung der Technik der Anastomose zwischen V.cava inf. des Empfängers und A.pulmonalis des Empfängerherzens (K Ono, ES Lindsey, 54).
- Abb.7** Intraoperativer Situs nach Anastomose der Aorta abdominalis des Empfängers mit der Aorta des Spenderherzens.
- Abb.8** Überleben diskordanter Xenotransplantate vom Meerschweinchen in PVG C- Ratten Vs. dem Überleben in PVG C+ Ratten.
- Abb.9** Repräsentative Beispiele von Xenotransplantaten. Perivaskuläre Destruktion im Vergleich.
- Abb.10** Repräsentative Beispiele von Xenotransplantaten. Granulozytäre Infiltration und interstitielle Hämorrhagie im Vergleich.
- Abb.11** Perlschnurartiges „Sticking“ von Granulozyten am Endothel.
- Abb.12** Repräsentative Schnitte von Meerschweinchenherzen. Phänotypisierung des Zellulären Infiltrates durch Immunperoxidase-Färbung.
- Abb.13** Graphische Darstellung der Kinetik des zellulären Infiltrates.
- Abb.14** Repräsentative Knochenmarkausstriche, die 3,7 und 14 Tage nach i.p.-Injektion von Busulfan, entnommen wurden.
- Abb.15** Darstellung der Überlebenskurven diskordanter Xenotransplantate mit nicht vorbehandelten PVG C- Ratten als Empfänger im Vergleich zu den Überlebenskurven Fucoidin-bzw.Busulfan-vorbehandelter PVG C- Ratten als Empfänger.
- Abb.16** Repräsentative Beispiele von Herzxenotransplantaten vom Meerschweinchen, die 24h post DXTx aus nicht-vorbehandelten PVG C- Ratten entnommen wurden.
- Abb.17** Repräsentative Beispiele von Herzxenotransplantaten vom Meerschweinchen, die 24h post DXTx aus mit Busulfan vorbehandelten PVG C- Ratten entnommen wurden.

- Abb.18** Schematische Darstellung der Komplementaktivierung am Endothel des Xenotransplantates.
- Abb.19** Immunologische Vorgänge bei der Aktivierung der T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion im Überblick.
- Abb.20** Durch den isolierten Defekt des Komplementfaktors C6 in PVG C- Ratten, wird die Formierung des MAC verhindert. Die Anaphylatoxine C3a und C5a werden weiterhin gebildet.
- Abb.21** Nachweis des hämolytischen Komplementdefektes auf Proteinebene mittels Western-Blot (Brauer RB, mit freundlicher Genehmigung).

## **8 Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1** Verwendete Ak zur Differenzierung des zellulären Infiltrates im diskordanten Herzxenotransplantationsmodell in Abwesenheit des MAC

**Tabelle 2** Einige Therapieoptionen zur Verhinderung der HAR im Überblick.

## **9 Danksagung**

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. J.R. Siewert für die Bereitstellung der Forschungsgelder und des Laborarbeitsplatzes und die Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. R. B. Brauer für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei den zahlreichen Problemen und Fragen im Zusammenhang mit dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Fr. T. Walsh und Fr. T. Rossmann für die freundliche Integration in das Labor der Chirurgischen Forschungsgruppe und Ihre umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung der Immunhistologie und des RNase-Protection-Assay.

Ferner möchte ich mich besonders bei Herrn Ingo Stehle für dessen Hilfe bei der Durchführung der immunhistologischen Färbungen bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, insbesondere dem Direktor des Institutes Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Gänsbacher für die freundliche Bereitstellung des OP-Arbeitsplatzes. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Erhard und den OP-Pflegekräften Fr. Pichotka, Fr. Polheimer und Fr. Hartl für die unmittelbare Unterstützung meiner Arbeit.

Besonderer Dank geht an Fr. R. Bergmair und allen Mitarbeitern der Instituts-Tierhaltung für die überaus liebenswürdige Unterstützung während der gesamten Dauer meiner Experimente.

Herrn Prof. Dr. Daha vom Academish Ziekenhuis in Leiden/Holland danke ich für die Bereitstellung der PVG C- Ratten, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Mein Dank gilt auch dem Direktor des Instituts für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Werner und allen Mitarbeitern dieses Institutes, die mich bei der Durchführung der konventionellen Färbungen und der Auswertung der Histologie unterstützt haben.