

Aus der Klinik für Anaesthesiologie

Klinikum der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Untersuchungen zur perioperativen kardialen
Xenograft-Dysfunktion im ex-vivo Modell sowie
nach heterotop thorakaler und orthotoper
Xenotransplantation**

vorgelegt von

Dr. med. Jan-Michael Abicht

(2018)

Zusammenfassung

Aufgrund des bestehenden Spenderorganmangels gewinnt das Forschungsfeld der Xenotransplantation zunehmend an Bedeutung. Eine von mehreren Hürden für die orthotope kardiale Xenotransplantation ist eine primäre Insuffizienz des Spenderorgans, die nicht in direktem Zusammenhang mit einer antikörpervermittelten hyperakuten Abstoßung steht. Diese wird als perioperative kardiale Xenograft-Dysfunktion (PCXD) bezeichnet und ist aus herzchirurgischer aber insbesondere auch anästhesiologischer und intensivmedizinischer Sicht von Bedeutung.

Als Modell für die initiale Phase nach xenogener kardialer Transplantation wurde ein ex-vivo Perfusionssystem entwickelt, mit dem Konzepte zur Therapie der PCXD untersucht wurden: Mittels Inhibition des Komplements C3 konnten der Myokardschaden reduziert und die Herzfunktion während xenogener Perfusion verbessert werden. Durch die Kombination der genetischen Modifikationen GGTA1-KO, hCD46 und HLA-E des Spenderorgans reduzierte sich die initiale xenogene Reaktion, insbesondere jene der NK-Zellen.

Präklinische Untersuchungen wurden in zwei Großtiermodellen durchgeführt: Im heterotop thorakalen Transplantationsmodell trat eine PCXD ebenfalls auf. In keinem Fall führte diese jedoch zum Abbruch des Versuchs, da das Empfängerherz das Transplant hämodynamisch unterstützen konnte. Es gelang der Nachweis, dass die primäre Dysfunktion des Grafts bei diesen Versuchen vollständig reversibel war.

Im orthotopen Transplantationsmodell war die PCXD maßgeblich für Versuchsabbrüche innerhalb der ersten 48 Stunden verantwortlich. Das Auftreten dieser war jedoch abhängig von der kardioplegischen Lösung, die zur Präservierung der Herzen während der Transplantation verwendet wurde. Ein Zusammenhang mit einer viralen Infektion des Spenderherzens, insbesondere durch das Hepatitis E Virus, konnte nicht nachgewiesen werden.

Aus den durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnissen können Strategien zur Verbesserung der primären Graftfunktion abgeleitet werden, die ein Langzeitüberleben auch im orthotopen Transplantationsmodell möglich erscheinen lassen.

Hintergrund

Eine Herztransplantation war lange Zeit die einzige Therapieoption für Patienten mit progredienter terminaler Herzinsuffizienz. Als Alternative stehen mittlerweile mechanische Herzunterstützungssysteme der fünften Generation zur Verfügung, doch die allogene Transplantation wird aufgrund der hohen Lebensqualität und der niedrigen Komplikationsrate weiterhin als therapeutischer Goldstandard angesehen.

Der weltweite Mangel an Spenderorganen begrenzt jedoch die Anzahl durchgeführter Herztransplantationen. Eine Lösung dieses Problems ist nicht zu erwarten; ganz im Gegenteil ging in den letzten zwei Jahren die Spendebereitschaft in Deutschland aufgrund des sogenannten „Transplantationsskandals“ weiter zurück [1].

Ein möglicher Ausweg aus diesem Dilemma ist die Xenotransplantation, die Transplantation von Organen einer Spezies auf eine andere. Als grundsätzlich geeignete Spendertiere für den Menschen werden Schweine angesehen, aufgrund des evolutionsgeschichtlichen Abstands existieren jedoch viele biologische Barrieren, die überwunden werden müssen. Während beispielsweise die hyperakute Abstoßung regelhaft verhindert werden kann, konnte eine verzögerte humorale Abstoßung solider Organe bisher nicht langfristig abgewendet werden. Durch die Kombination von genetischen Modifikationen der Spendertiere mit kontinuierlicher Blockade der T-Zell-Kostimulation und konventioneller Immunsuppression (Mycophenolat + Steroide) gelang im heterotop-abdominellen Modell jedoch kürzlich ein Überleben eines kardialen Xenografts von über 900 Tagen [2].

In lebenserhaltenden Modellen konnte dieser Langzeiterfolg bisher nicht erreicht werden, die genauen Gründe hierfür sind nicht bekannt, stehen aber möglicherweise im Zusammenhang mit der sogenannten perioperativen kardialen Xenograft-Dysfunktion (perioperative cardiac xenograft dysfunction, PCXD) [3, 4]. PCXD bezeichnet eine Insuffizienz des Spenderorgans unmittelbar nach orthotoper kardialer Xenotransplantation (xHTx), welche ohne histologische Zeichen einer akuten Abstoßung auftritt. Sie entwickelt sich häufig unmittelbar nach Entwöhnung von der Herzlungenmaschine und führt innerhalb der ersten Woche nach Transplantation zu einem Pumpversagen des Grafts [5, 6]. Somit kommt der Xenoreaktion während der initialen Phase der Reperfusion eine entscheidende Bedeutung hinsichtlich des längerfristigen postoperativen Verlaufs zu.

Die Untersuchung und Verbesserung der Herzfunktion des Transplantats unmittelbar nach xenogener Transplantation sind Gegenstand dieser Arbeit und werden im Folgenden beschrieben. Letztlich ist das übergeordnete Ziel, so ein konsistentes dreimonatiges Überleben nach präklinischer kardialer Xenotransplantation zu ermöglichen.

Ex-vivo Perfusionsmodell

Aus ethischer, finanzieller und technischer Sicht werden genetisch modifizierte Schweine als geeignete Organspender für den Menschen angesehen. Da xenogene Reaktionen auf interspezies-spezifischen Unterschieden beruhen, ist insbesondere das System Schwein-Primat von Interesse. Eine Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse anderer Spezieskombinationen, beispielsweise Ratte-Hamster, ist nur bedingt möglich. In in-vitro Modellen (z.B. Zellkultur oder endothelisierte Flusskammer-Versuche) kann das System Schwein-Primat an den einzelnen Zelltypen und Blutbestandteilen untersucht werden, für Untersuchungen am gesamten Spenderorgan sind Transplantationsversuche mit nicht-menschlichen Primaten am besten geeignet. Aus finanzieller und ethischer Sicht sind diese nur in sehr begrenztem Umfang möglich.

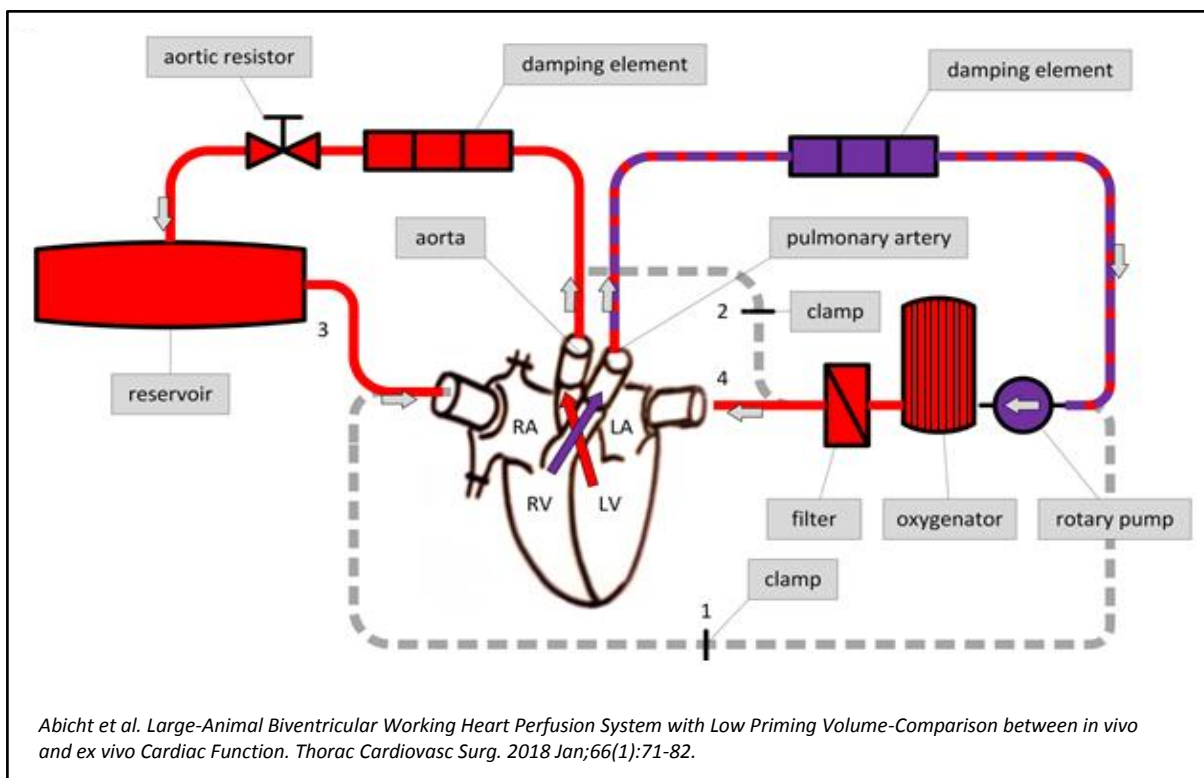
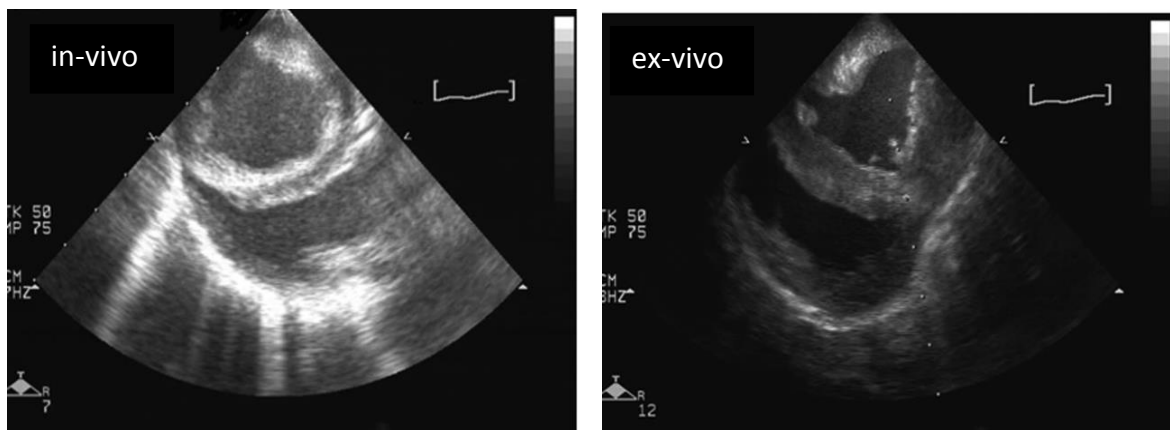


Abbildung 1: Schematische Darstellung des neu entwickelten ex-vivo Perfusionsmodells. In diesem kann das Herz unter physiologischer Vor- sowie Nachlast beider Ventrikel arbeiten (biventrikuläres Working Heart Modell). Aufgrund der Rezirkulation des Perfusates erlaubt dieses Modell eine mehrstündige Perfusion von juvenilen Schweineherzen mit einem minimalen Füllvolumen von 350 ml: Das Perfusat fließt von einem geschlossenen Reservoir über den rechten Vorhof (rot) in den rechten Ventrikel. Dieser wirft es aktiv aus (blau/rot), woraufhin es mit Unterstützung einer Zentrifugalpumpe weiter durch Oxygenator und Filter zum linken Vorhof fließt. Der linke Ventrikel pumpt das Perfusat über die Aorta zurück in das Reservoir. Gestrichelt dargestellt ist der Weg des Blutes zur initial notwendigen Reperfusion des Herzens (Langendorff-Perfusion).

In Perfusionsmodellen ist es grundsätzlich möglich xenogene Reaktionen ex-vivo zu untersuchen. Kardiale Perfusionsmodelle sind seit langer Zeit etabliert und wurden unter Verwendung moderner medizintechnischer Komponenten wie Hohlfaser-Oxygenatoren und Zentrifugalpumpen kontinuierlich verbessert [7-10]. Zur systematischen Untersuchung der initialen xenogenen Reaktion am arbeitenden Herzen musste jedoch ein neues ex-vivo Perfusionsmodell entwickelt werden, da bekannte Modelle nicht die hierfür erforderlichen Kriterien erfüllen konnten. Hervorzuheben sind insbesondere drei Kriterien: 1) Die Möglichkeit beide Ventrikel funktionell zu belasten, um sowohl Rechts- als auch Linksherzinsuffizienz untersuchen zu können. 2) Die Eignung für Schweineherzen von ca. 50-175g Gewicht. Diese Größe entspricht den in den präklinischen Versuchen verwendeten Herzen. 3) Eine minimale Perfusatsmenge von nur 350ml, um eine autologe Perfusion sowie die Perfusion mit humanem Blut einer einzelnen Blutspende (maximal 500ml) zu ermöglichen. Abbildung 1 zeigt ein Schema des nach diesen Vorgaben entwickelten Perfusionsmodells.

Zur Evaluation des Systems wurden Schweineherzen explantiert und anschließend autolog perfundiert. Die Reperfusion erfolgte bei Volumenentlastung beider Ventrikel (Langendorff-Modus), bevor die Ventrikelfüllung langsam erhöht und so in den Arbeitsmodus gewechselt wurde. Das System ermöglichte die Entnahmen von seriellen Myokardbiopsien und koronarvenösen Blutproben sowie die Durchführung standardisierter echokardiographischer Untersuchungen (Abb. 2).



Abicht et al. Large-Animal Biventricular Working Heart Perfusion System with Low Priming Volume-Comparison between in vivo and ex vivo Cardiac Function.. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2018 Jan;66(1):71-82.

Abbildung 2: Epikardiale Echokardiographie des Spenderherzens nach Thorakotomie (links), sowie während biventrikulärer ex-vivo-Perfusion im Arbeitsmodus (rechts), jeweils in kurzer Achse. Aus den Echosequenzen wurden offline die end-systolischen und end-diastolischen Ventrikelvolumina berechnet.

Funktion und Metabolismus der Herzen blieben für drei Stunden erhalten. In diesem Zeitraum leisteten linker und rechter Ventrikel unter vorgegebener Vor- sowie Nachlast eine konstante Pumparbeit (Abb. 3). Histologische Untersuchungen zeigten nach Beendigung der dreistündigen Perfusion keine Gewebeschäden (Abb. 4).

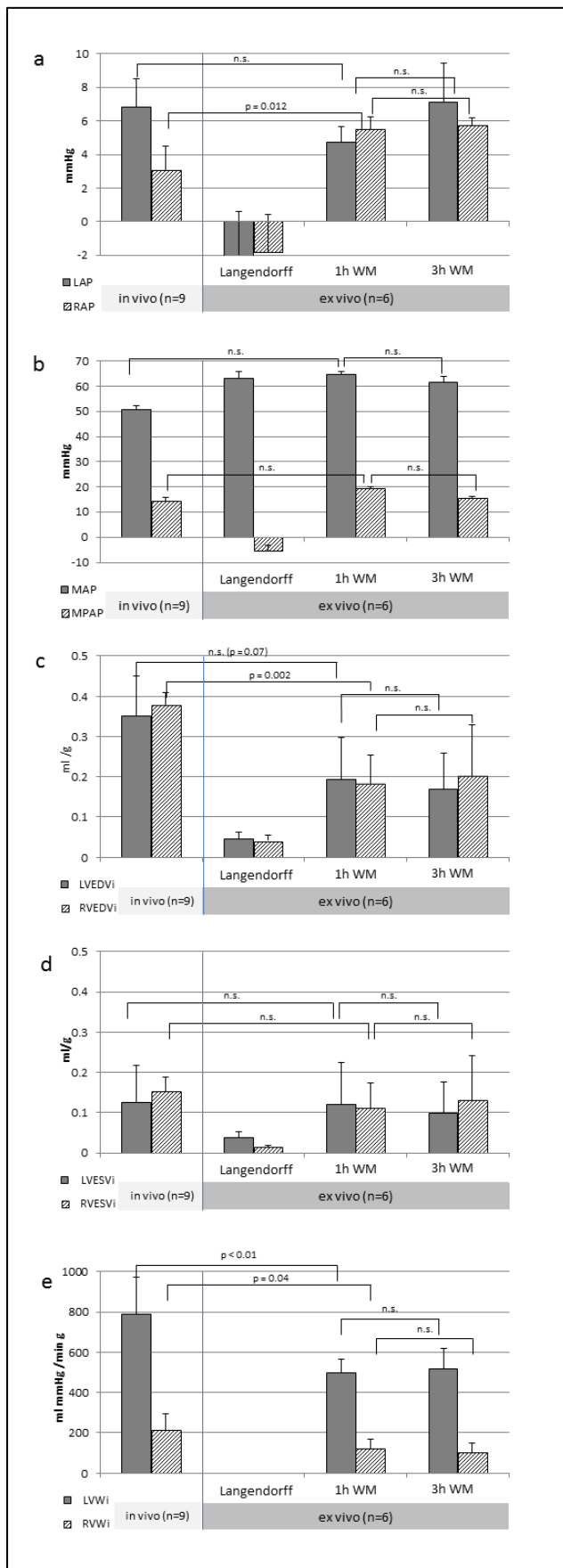


Abbildung 3:

Hämodynamische Messungen in-vivo (n=9) und im Perfusionsmodell (ex-vivo, n=6) zu drei Zeitpunkten: Langendorff-Perfusion (Reperfusion, Herz entlastet) sowie nach 1h bzw. 3h Arbeitsmodus (working mode, WM).

a) Druck im linken (LAP) und rechten (RAP) Atrium.

b) Mittlerer aortaler Druck (MAP) und mittlerer pulmonalarterieller Druck (MPAP). Während der Reperfusion erzeugt die Zentrifugalpumpe zur Entlastung des rechten Herzens einen negativen Druck in der Pulmonalarterie. Im Arbeitsmodus waren MAP und MPAP über drei Stunden stabil.

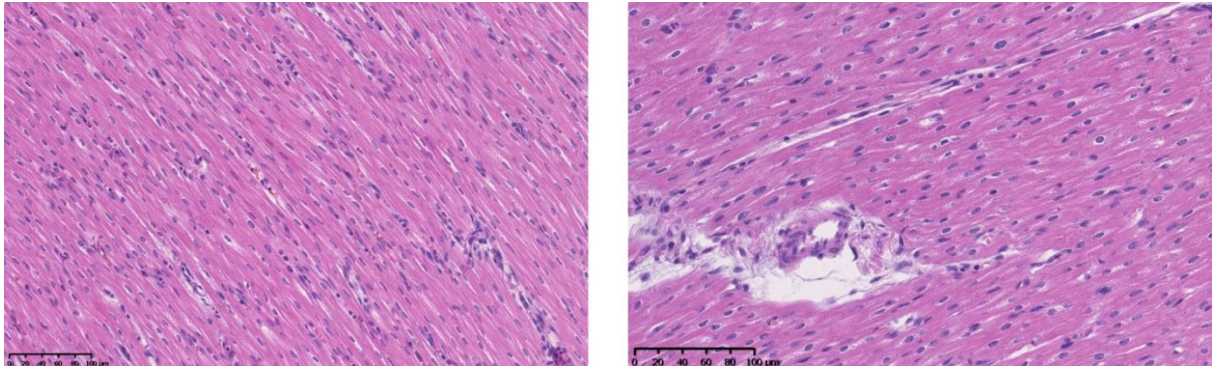
c) End-diastolischer Volumenindex des linken (LVEDVi) und rechten (RVEDVi) Ventrikels als Maß der diastolischen Füllung waren während der ex-vivo Perfusion gegenüber in-vivo reduziert.

d) End-systolischer Volumenindex des linken (LVESVi) und rechten (RVESVi) Ventrikels als Parameter der systolischen Funktion waren im Beobachtungszeitraum des Arbeitsmodus stabil und gegenüber in-vivo Messungen nicht vermindert.

e) Links- (LVWi) und rechtsventrikulärer (RVWi) Arbeitsindex. Während der Reperfusion leisteten die Ventrikel keine externe Arbeit. Im Arbeitsmodus war diese aufgrund der reduzierten Füllung gegenüber in-vivo vermindert, jedoch über drei Stunden konstant.

Abicht et al. Large-Animal Biventricular Working Heart Perfusion System with Low Priming Volume-Comparison between in vivo and ex vivo Cardiac Function. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2018 Jan;66(1):71-82.

In diesem Modell können sowohl systemische Therapien als auch genetische Veränderungen an Schweineherzen untersucht werden. Das System dient insbesondere der Evaluierung von potentiellen Spenderherzen vor Versuchen an nicht-menschlichen Primaten.



Abicht et al. Large-Animal Biventricular Working Heart Perfusion System with Low Priming Volume-Comparison between in vivo and ex vivo Cardiac Function. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2018 Jan;66(1):71-82.

Abbildung 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von formalinfixiertem, paraffineingebettetem Myokard linker Ventrikel. Nach dreistündiger ex-vivo Perfusion (links) sind im Vergleich zu nicht-perfundiertem Kontrollgewebe (rechts) keine morphologischen Veränderungen erkennbar.

Minimierung der xenogenen Reaktion mittels C3-Komplementinhibierung

Das neu entworfene Perfusionssystem konnte nun als Modell für die initiale Phase der kardialen Xenotransplantation eingesetzt werden. Dazu wurde humanes Vollblut als Perfusat verwendet, welches unmittelbar zuvor von gesunden Probanden gespendet worden war.

Bei xenogener Perfusion führt die Bindung von präformierten Antikörpern im Blut an Antigene auf der Endotheloberfläche zu einer sofortigen Aktivierung des klassischen Wegs der Komplementkaskade (Abb. 5). Aber auch die anderen beiden Aktivierungswege sind an der initialen xenogenen Reaktion beteiligt. Alle drei Wege führen zu einer Spaltung von C3 in C3b und C3a, dem zentralen Schritt der Aktivierungskaskade. Diesem nachgeschaltet sind die Produktion von Anaphylatoxinen (C3a und C5a), sowie die Bildung terminaler Komplementkomplexe (C5b-9), potenziert durch zusätzliche Verstärkungskreisläufe. Anaphylatoxine und der terminale Komplementkomplex führen im Rahmen einer hyperakuten, aber auch humoral vermittelten verzögerten xenogenen Abstoßung, zu Zelloptionierung und -lyisierung [11, 12].

In bisherigen experimentellen oder präklinischen Studien wurde vor xenogener Transplantation oftmals das gesamte Komplement mittels Cobravenom Faktor depletiert. Erhebliche Nebenwirkungen schließen jedoch eine klinische Anwendung aus.

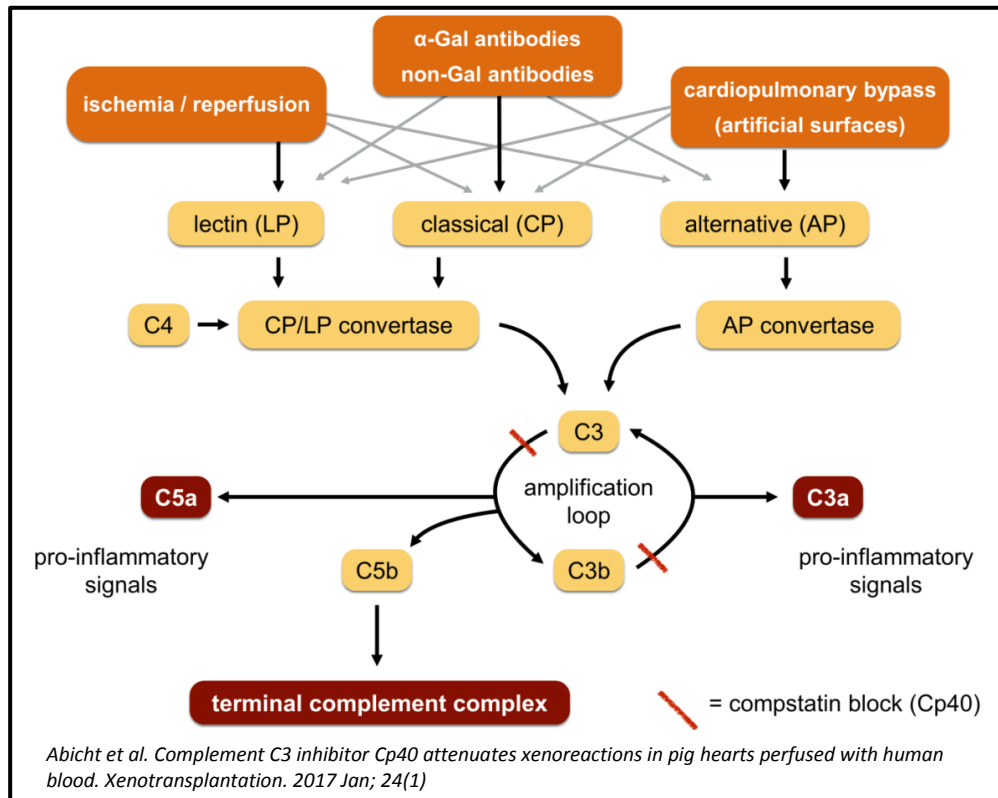


Abbildung 5: Komplementaktivierungswege nach präklinischer kardialer Xenotransplantation. Die Aktivierung wird durch künstliche Oberflächen der Herzlungenmaschine, durch einen intraoperativen Ischämie-/Reperfusionsschaden, sowie Endothelzellopsonierung durch Xeno-Antikörper ausgelöst. Cp40 bindet reversibel an C3 und C3b und blockiert damit die weitere Komplementkaskade und Organschädigung.

Aus diesem Grund wurde die Unterdrückung der Komplementaktivierung im Rahmen der xenogenen Reaktion mittels des Compstatin-Analogons Cp40 untersucht. Dieses ist ein Lipid, das alle drei Aktivierungswege des Komplementsystems auf Ebene des Faktors C3 blockiert und damit zu einer Inhibierung der gesamten komplementvermittelten Antwort des angeborenen Immunsystems führen sollte. In den mit Cp40 behandelten Herzen wurde der Gewebeschaden erheblich reduziert und die Pumpfunktion verbessert (Abb. 6).

Auch wenn für präklinische Xenotransplantationen ausschließlich Organe mit einem Knockout für das wichtigste Xenoantigen (1,3 α Gal) verwendet werden, und diese Herzen überdies durch einen transgenen Komplementregulator (hCD46) gegenüber Komplementaktivierung durch non-Gal Antikörper geschützt sind, erscheint eine zusätzliche systemische Komplementinhibierung sinnvoll. Die auf das Transplantat begrenzten Komplementregulatoren können bei massiver systemischer Komplementaktivierung, keine ausreichende Protektion des Organs gewährleisten. Insbesondere in der perioperativen Phase könnte Cp40 Schutz vor Aktivierung an den Fremdoberflächen der Herzlungenmaschine bieten.

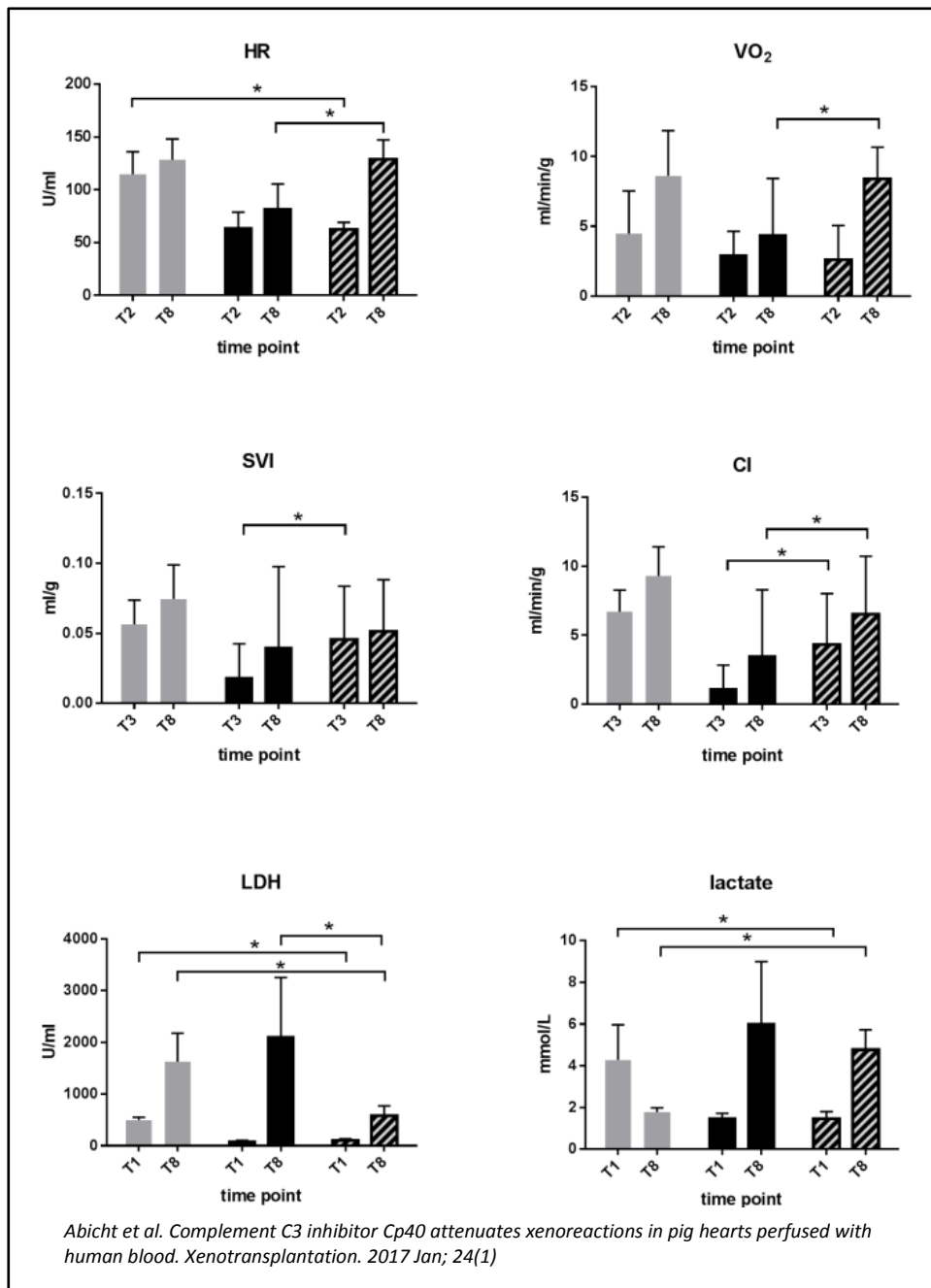


Abbildung 6: Einfluss der Komplementblockade mittels des Compstatin-Analogons Cp40 (gestreift) auf die folgenden Parameter während xenogener Perfusion (Cp40) porciner Herzen: Herzfrequenz (HR), Sauerstoffverbrauch (VO₂), Schlagvolumenindex (SVI), Herzindex (CI) sowie Laktatdehydrogenase (LDH) und Laktatkonzentration im Perfusat. Als Kontrollen wurden Schweineherzen autolog (auto), sowie unbehandelt xenogen perfundiert (xeno). Parameter zu Hämodynamik und Metabolismus wurden an je zwei Zeitpunkten bestimmt: vor Beginn der Reperfusion (T1), nach Reperfusion (T2) bzw. mit Beginn des Arbeitsmodus (T3) und nach 180 Minuten Perfusion (T8). * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied (p < 0,05).

Xenogene Perfusion von dreifach genetisch modifizierten Schweineherzen

Wie erwähnt, sind präformierte Antikörper gegen Xenoantigene verantwortlich für einen Großteil der unmittelbaren, Komplement vermittelten, xenogenen Reaktion. Aber auch der zelluläre Anteil des Immunsystems ist beteiligt: Verschiedene Untergruppen der Leukozyten, insbesondere Natürliche Killer (NK) Zellen, attackieren die nicht als körpereigen erkannten Zellen des Spenderorgans.

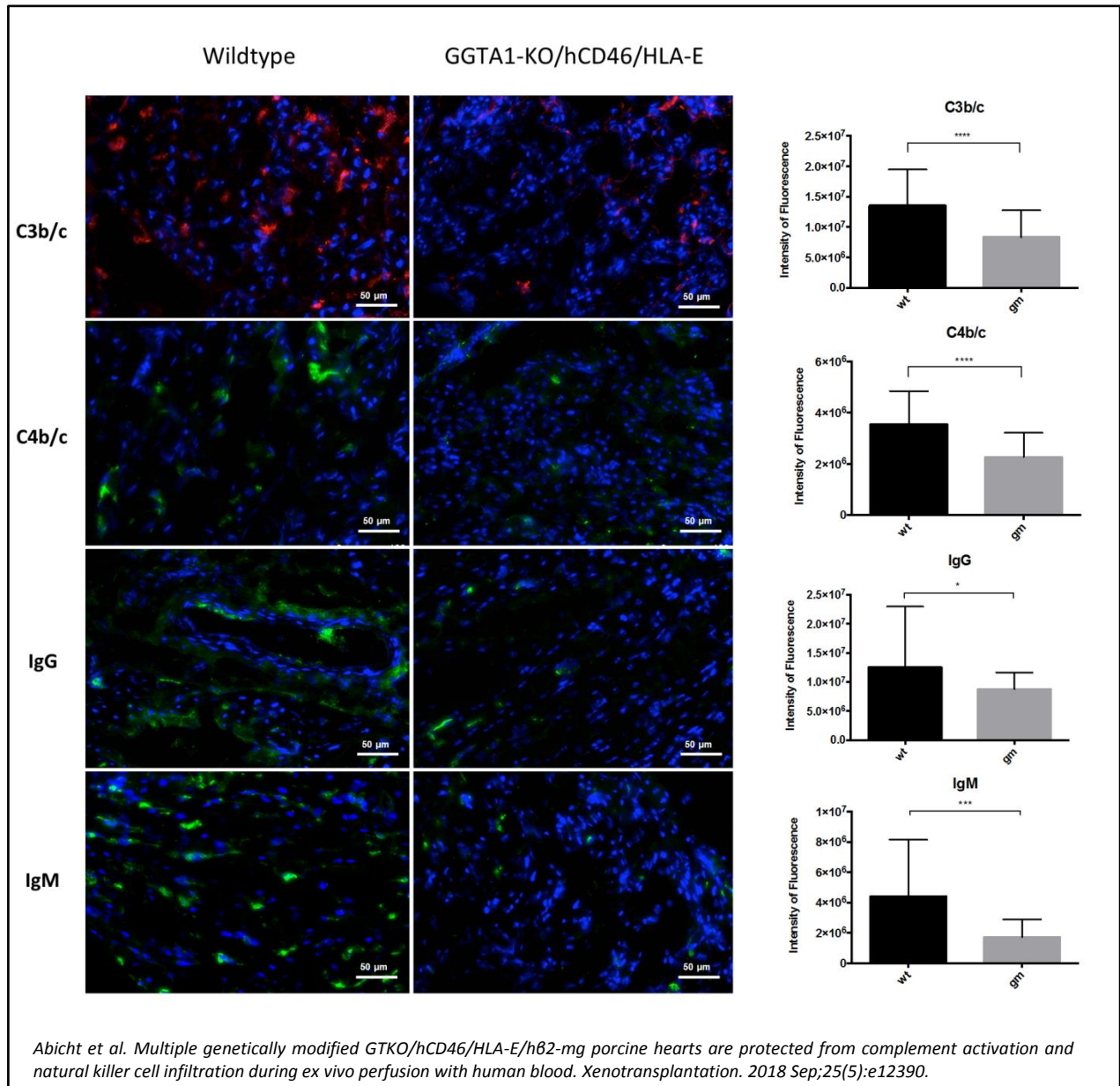


Abbildung 7: Immunfluoreszenz-Analyse des Myokards nach Perfusion porciner Herzen mit humanem Blut. Komplementablagerungen der Fragmente C3b/c (rot) sowie C4b/c (grün) waren in den genetisch modifizierten Herzen (GGTA1-KO/hCD46/HLA-E) verglichen mit Wildtypherzen geringer. Ebenso waren weniger IgM und IgG Antikörper (grün) in diesen Herzen nachweisbar. blau: DAPI (Kernfärbung), **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

NK-Zellen sind in der Lage, porcine Endothelzellen sowohl antikörpervermittelt, als auch direkt zu lysieren [13, 14]. Die NK-Zellaktivität wird von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren eng reguliert [15]. Der wichtigste Ligand für den inhibierenden NK-Zellrezeptor CD94/NKG2a ist das Klasse I Histokompatibilitätsantigen der alpha Kette E (HLA-E), das von fast allen gesunden humanen Zellen exprimiert wird [16]. Dieser Mechanismus befähigt NK-Zellen zur direkten Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Zellen.

Für die Untersuchungen standen genetisch modifizierte Schweine zur Verfügung, welche ubiquitär HLA-E exprimierten. In in-vitro Versuchen wurde zuvor nachgewiesen, dass Zellen dieser Schweine einen Schutz vor humanen NK-Zellen besitzen, diese Protektion unter Einfluss stark NK-aktivierender Faktoren jedoch teilweise aufgehoben wird.

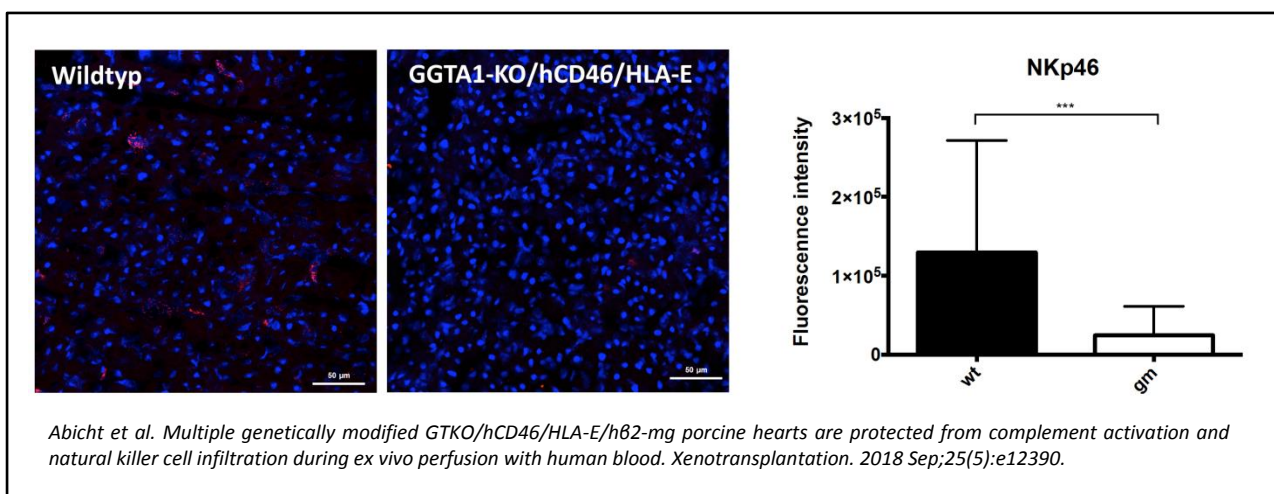


Abbildung 8: Quantifizierung von NK-Zellen im Myokard nach xenogener Perfusion porciner Herzen. In den genetisch modifizierten (GGTA1-KO/ hCD46/HLA-E) Herzen wurden verglichen mit den Kontrollen weniger NKp46-positive NK-Zellen (rot) nachgewiesen. blau: DAPI (Kernfärbung), *** p<0.001

In Perfusionsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass genetisch modifizierte porcine Herzen (GGTA1-knockout/hCD46/HLA-E) gegenüber einer xenogenen Immunreaktion mit humanem Blut geschützt sind. Der Knockout von GGTA1 führt zum Verlust der α 1,3 Gal Zuckerketten auf den Zelloberflächen der genetisch modifizierten Schweineherzen. Während die nativen Komplementregulatoren des porcinen Endothels keinen Einfluss auf humanes Komplement haben, führt der transgene humane Komplementregulator hCD46 zu einer lokalen Inhibierung des humanen Komplementsystems. Entsprechend waren in den genetisch modifizierten Herzen sowohl die humorale Immunreaktion, als auch die Komplementaktivierung deutlich reduziert (Abb. 7). Aufgrund der HLA-E Expression war zudem die NK-Zellaktivierung im Myokard geringer (Abb. 8). Als Folge der geringeren Immunreaktion waren Herzfunktion und Myokardperfusion deutlich besser (Abb. 9).

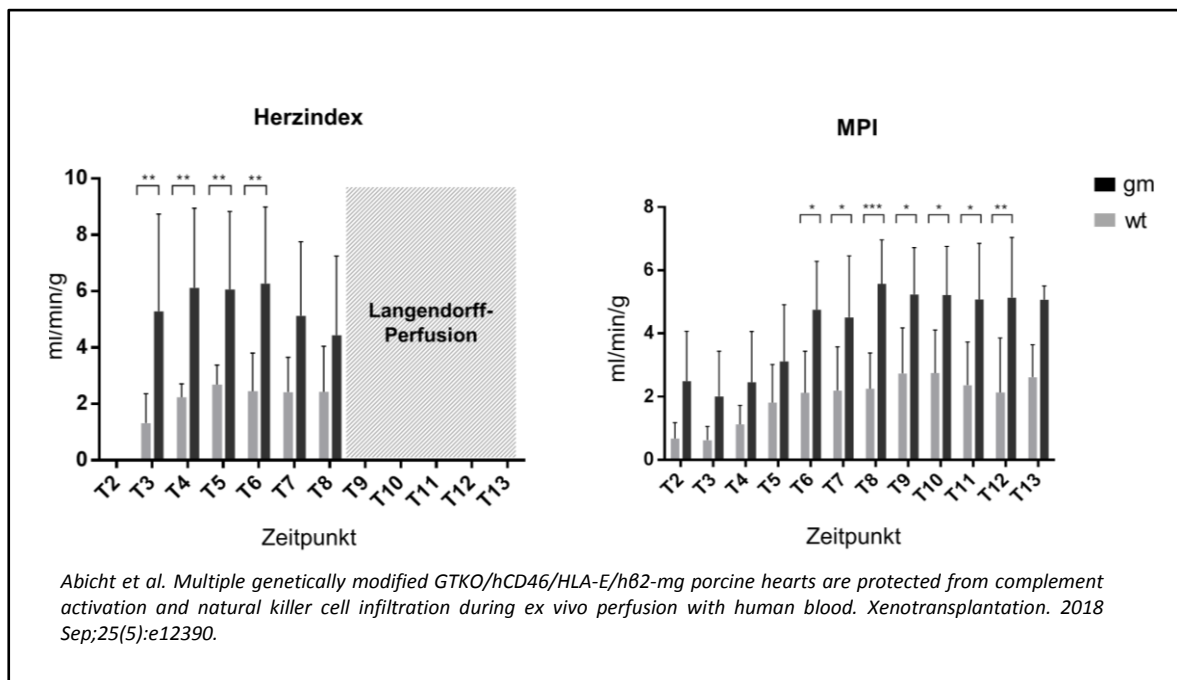


Abbildung 9: Herzfunktion und Myokardperfusion von porcinen Wildtypherzen (wt) sowie dreifach genetisch modifizierten Herzen (gm: GGTA1-KO/hCD46/HLA-E) während einer achtstündigen ex-vivo Perfusion mit humanem Blut. Während der ersten drei Stunden wurden alle Herzen in einem biventrikulären Arbeitsmodus getestet. Oben: Der Herzindex der genetisch modifizierten Herzen war verglichen mit Wildtyp-Kontrollen zu den ersten 4 Zeitpunkten höher. Unten: Der myokardiale Perfusions-Index (MPI) war sowohl zu einzelnen Zeitpunkten im Arbeitsmodus (T3-T8) als auch während Langendorff-Perfusion (T9-T13) in der Gruppe genetisch modifizierter Herzen höher.

Heterotop thorakale xenogene Herztransplantation in nicht-menschliche Primaten

Die Situation der experimentellen präklinischen Xenotransplantation ähnelt der Situation der klinischen Allotransplantation in den frühen 60er Jahren. In jener Zeit war die Häufigkeit eines primären Graftversagens nach Transplantation aufgrund unzureichender Organpräservierung sehr hoch, eine passagere Kreislaufunterstützung mittels extrakorporaler Unterstützungssysteme (ECLS) war damals nicht verfügbar. Aus dieser Not wurde die heterotop thorakale Transplantationstechnik entwickelt, bei der das eigene Herz unverändert im Empfänger verbleibt und das Graft parallel zu diesem transplantiert wird. Mit dieser Technik wurde unter der damals verfügbaren Immunsuppression ein Fünfjahresüberleben von 43% erreicht [17-21]. Trotz besserer Organpräservierung ist ein primäres Graftversagen nach kardialer Xenotransplantation im Sinne eines PCXD heute ebenfalls häufig. Aus diesem Grund wurden porcine Herzen weltweit erstmalig heterotop thorakal transplantiert [22]. Bei dieser chirurgisch sehr anspruchsvollen Technik unterstützt das eigene Herz, welches im Empfänger verbleibt, das Transplantat (Abb. 10). Linker und rechter Vorhof des Graftes werden dabei direkt mit den jeweiligen Vorhöfen des Eigenherzens anastomosiert. Die Aorta des Graftes wird direkt End-zu-Seit mit der Aorta ascendens des Empfängers und die Pulmonalarterie über ein Gefäßinterponat mit der des Empfängers verbunden.

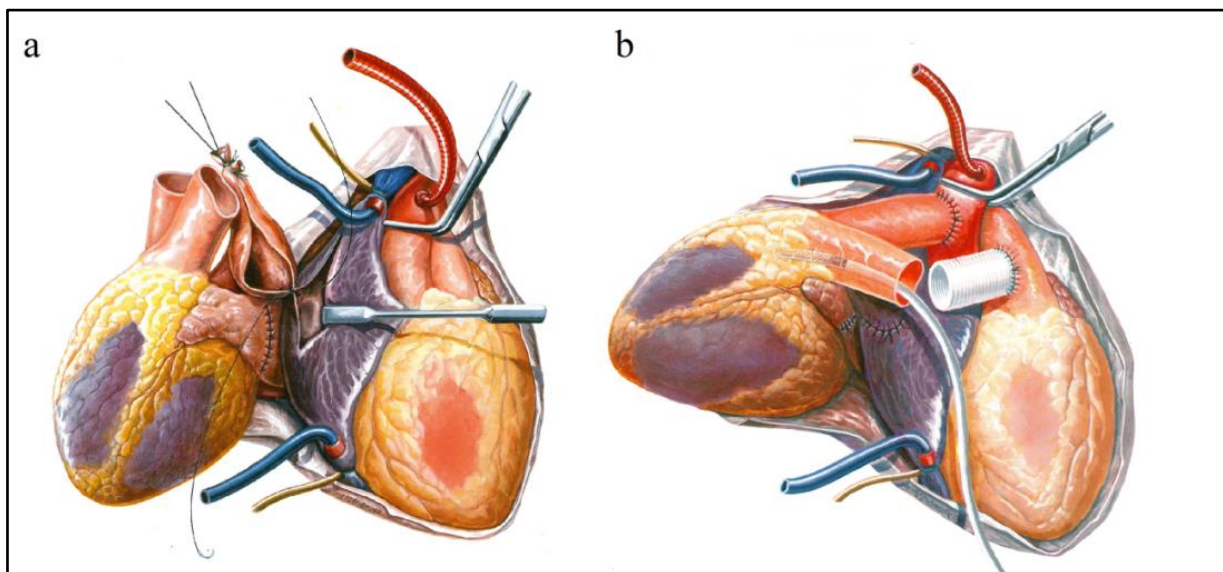


Abbildung 10: Heterotop thorakale Herztransplantation. Dargestellt sind die wesentlichen Schritte der Implantation; jeweils rechts das Herz des Empfängers, links das porcine Transplantat. a) Anastomose der linken Vorhöfe vollendet, zwischen den rechten Vorhöfen begonnen. b) End-zu-Seit Anastomose der Aorta durchgeführt, Interponat zwischen Pulmonalarterien des Empfängers und des Transplantats begonnen.

Die Operation wird mittels Herzlungenmaschine und während Kardioplegie beider Herzen durchgeführt. Nach Reperfusion beider Herzen schlagen diese unabhängig voneinander und tragen beide zum Herzzeitvolumen bei (Abb. 11).

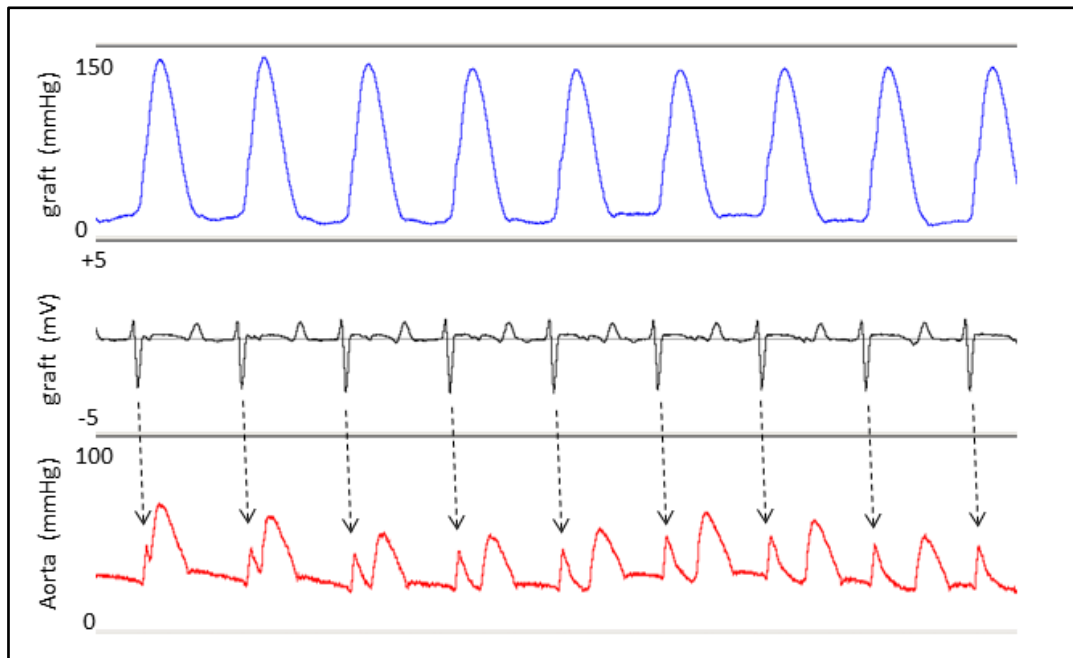


Abbildung 11: Kontinuierliches telemetrisches Monitoring nach heterotop thorakaler Herztransplantation: Dargestellt sind die linksventrikuläre Druckkurve (Graft), das epikardiale Elektrokardiogramm (Graft), sowie die aortale Druckkurve des Empfängers (von oben nach unten). In letzterer sind zweierlei Augmentationen erkennbar, die sich in ihrer Form und Wiederholungsfrequenz unterscheiden. Aus der Überlagerung mit dem EKG bzw. der ventrikulären Druckkurve (Graft) ist ersichtlich, welche Pulswellen vom transplantierten Herzen erzeugt werden (Pfeile).

Es wurden insgesamt 21 Herzen von genetisch veränderten Schweinen (GGTA1-KO/hCD46/ \pm hThrombomodulin) transplantiert. In allen Versuchen wurde präoperativ die Antikörperkonzentration mittels Immunabsorption reduziert.

Die Empfängertiere erhielten eine immunsuppressive Behandlung mit anti-CD20 Antikörpern, Proteosominhibitor Bortezomib, anti-Thymozyten Globulin, Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil sowie Methyprednisolon. Zur Reduktion der humoralen Immunantwort wurde bei einem Teil der Tiere, entsprechend der Therapie des B-Zell-Lymphoms, eine myeloablative Behandlung durchgeführt. Diese umfasste neben der präoperativen Therapie mit Cyclophosphamid eine postoperative totale thorakale und abdominelle Lymphknotenbestrahlung (TLI) mit einer Einzeldosis von 6 Gy.

Bei vier Experimenten traten technische Probleme auf, die zum Versuchsabbruch führten. In allen anderen Versuchen konnten die Tiere sowohl von der Herzlungenmaschine als auch von der Beatmung entwöhnt werden. Ein weiterer Versuch wurde aufgrund eines Pneumothorax des Empfängers beendet. Jedoch musste kein Versuch in den ersten 24 Stunden wegen kardiozirkulatorischen Störungen beendet werden. Bei Ausschluss der fünf erwähnten Komplikationen, betrug das mittlere Graftüberleben 21 Tage, das längste Überleben 50 Tage. Ein Überlebensvorteil für Tiere mit TLI konnte nicht nachgewiesen werden.

Abhängig von der Dauer der Versuche zeigten sich deutliche makroskopische und mikroskopische Zeichen einer ausgeprägten linksventrikulären Hypertrophie. Zum Teil waren diskrete Zeichen einer humoralen Abstoßung und thrombotischen Mikroangiopathie nachweisbar.

Vor Abschluss jeder Transplantation wurde den Versuchstieren ein Transmitter mit drei Messsonden implantiert. So konnten über den gesamten Versuchszeitraum sowohl der linksventrikuläre Druck und das EKG des Graftes, als auch der aortale Blutdruck des Empfängers gemessen und aufgezeichnet werden. Mittels dieser Daten konnte nachgewiesen werden, dass in drei Versuchen eine Funktionseinschränkung im Sinne einer PCXD aufgetreten war, diese aber aufgrund der Unterstützung durch das Eigenherz nicht zum Versuchsabbruch geführt hatte (Abb. 12). Alle drei Herzen erholten sich im Verlauf der folgenden 48 Stunden. In den histologischen Untersuchungen am Ende des Versuchs ließen sich keine Unterschiede im Vergleich zu den Herzen mit primär guter Funktion nachweisen.

Mit der verwendeten Immunsuppression konnte in keinem Versuch ein Transplantatüberleben von drei Monaten erreicht werden. Durch die heterotop thorakale Transplantationstechnik konnten jedoch Versuchsabbrüche aufgrund eines primären Graftversagens vermieden werden. Überdies zeigten diese Versuche, dass eine PCXD im Verlauf reversibel sein kann und sich aufgrund des zeitlichen Verlaufs, klar von einer hyperakuten Abstoßung abgrenzen lässt.

Die in diesen Versuchen verwendete Immunsuppression war ein limitierender Faktor. Die Versuche zeigten jedoch, dass die heterotop thorakale Transplantationstechnik eine valide Lösung für eine präklinische, aber auch klinische Anwendung ist.

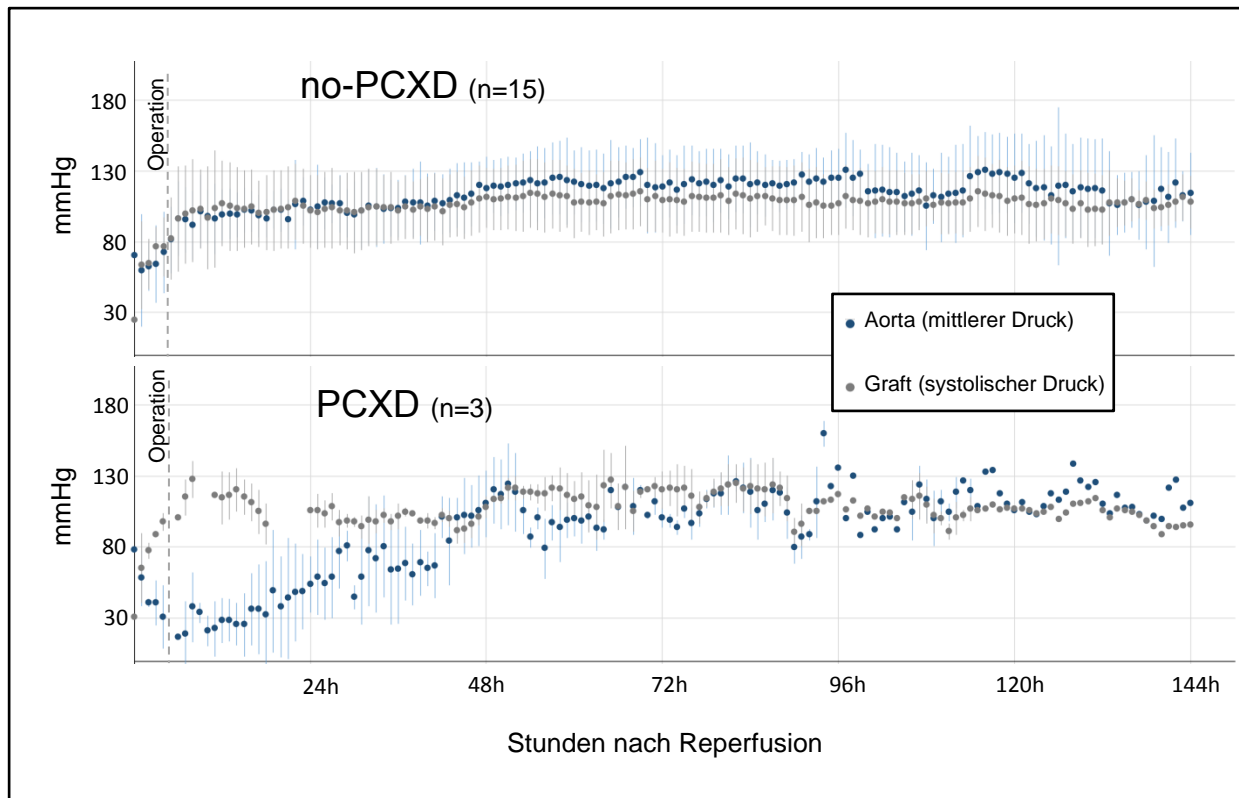


Abbildung 12: Telemetrisch gemessener mittlerer arterieller Blutdruck des Empfängers (grau) sowie systolischer ventrikulärer Blutdruck des Transplantats (blau). Oben: Verlauf der ersten 6 Tage nach heterotop thorakaler kardialer Xenotransplantation bei guter primärer Graftfunktion. Unten: Druckmessungen bei drei Tieren, die eine perioperative kardiale Xenograft-Dysfunktion entwickelten. Im Gegensatz zum Verlauf einer hyperakuten Abstoßung erholten sich diese Herzen innerhalb der folgenden 48 Stunden. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung einer Stunde.

Orthotope xenogene Herztransplantation in nicht-menschliche Primaten

Im Anschluss an die heterotop thorakalen Transplantationsexperimente wurden in einer präklinischen Versuchsreihe orthotope Transplantationen von porcinen Herzen in Paviane begonnen. Als letzter Schritt vor der klinischen Anwendung muss ein konsistentes Überleben des Primaten von 3 Monaten in diesem Modell erreicht werden.

Die zuvor durchgeführten immunsuppressiven Konzepte wurden zugunsten einer Therapie basierend auf einer CD40 Kostimulationsblockade verlassen. Mit dieser innovativen Therapie konnte von der Arbeitsgruppe um Dr. Mohiuddin (NIH, Bethesda, Maryland, USA) ein maximales Graftüberleben von über 900 Tagen (n=5, Median=298d) im heterotop abdominellen Modell erreicht werden [2]. Diese Ergebnisse beweisen, dass die kardiale Xenotransplantation grundsätzlich möglich ist, noch fehlt jedoch die Umsetzung im orthotopen Modell.

In den durchgeführten heterotop thorakalen Versuchen wurden Schweineherzen mit den identischen genetischen Veränderungen (GGTA1-knockout/hCD46/hThrombomodulin) transplantiert. Basierend auf unseren Ergebnissen im heterotop thorakalen Modell wurden zur Transplantation größere Herzen gewählt, um eine höhere funktionale Reserve in der initialen postoperativen Phase zu gewährleisten (Mittleres Graftgewicht: 120 (\pm 23) % des Pavianherzgewichtes).

Perioperativ wurde ein erweitertes Monitoring mittels transpulmonaler Thermodilution durchgeführt. Der Herzindex eine Stunde nach Beendigung der Herzlungenmaschine unterschied sich nicht von der Gruppe der heterotop thorakalen Versuche, bei denen Graft und Empfängerherz gemeinsam arbeiteten. Hierzu benötigten die Tiere in der Gruppe der orthotopen Transplantationen jedoch im Mittel höhere Katecholamindosen (0.10 \pm 0.09 μ g/kg/min Epinephrin, 0.11 \pm 0.05 μ g/kg/min Norepinephrin). Die drei Versuchstiere mit den postoperativ niedrigsten Herzindices entwickelten bei steigendem Katecholaminbedarf innerhalb von 24 Stunden eine PCXD. Diese drei Versuche mussten bei beginnendem Multiorganversagen am ersten postoperativen Tag beendet werden. Die anderen beiden Tiere überlebten 3 sowie 30 Tage.

Gruppe		orthotope xHTx (n=5)		heterotop thorakale xHTx (n=23)		
Parameter	Einheit	mean	SD	mean	SD	p
Laktat	mmol/l	4.1	\pm 3.4	2.8	\pm 1.4	0.19
pH		7.45	\pm 0.09	7.46	\pm 0.08	0.90
Base Excess	mmol/l	-3.2	\pm 4.2	0.5	\pm 3.7	0.06
Hämoglobingehalt	g/dl	9.8	\pm 1.2	9.2	\pm 2.5	0.59
Arterieller Sauerstoffpartialdruck	mmHg	455	\pm 97	363	\pm 125	0.14
Arterieller CO ₂ -Partialdruck	mmHg	29	\pm 3	35	\pm 5	0.04
Arterielle Sauerstoffsättigung	%	99	\pm 1	100	\pm 0	0.12
Zentralvenöse Sauerstoffsättigung	%	44	\pm 5	58	\pm 13	0.06
Mittlerer arterieller Druck	mmHg	73	\pm 18	79	\pm 16	0.50
Zentralvenöser Druck	mmHg	9	\pm 3	6	\pm 4	0.16
Herzfrequenz	1/min	129	\pm 15	115	\pm 42	0.53
Herzindex	l/min/m ²	2.7	\pm 1	2.7	\pm 0.7	0.98

Herzindex= Herzzeitvolumen/Körperoberfläche

Mayr et al. Hemodynamic and perioperative management in two different preclinical pig-to-baboon cardiac xenotransplantation models. Xenotransplantation. 2017 May;24(3).

Tabelle 1: Blutgase, sowie metabolische und hämodynamische Parameter eine Stunde nach Beendigung des kardiopulmonalen Bypass. Die initiale postoperative Pumpfunktion nach orthotoper xHTx war im Vergleich zur heterotop thorakalen xHTx nicht reduziert.

Zur Kardioplegie des Herzens wurde in zwei Versuchen University-of-Wisconsin-Lösung, in drei Versuchen HTK-Lösung nach Bretschneider verwendet; in letzteren trat in allen Fällen und somit signifikant häufiger ($p=0,03$) eine PCXD auf. In den folgenden Versuchen soll daher eine verbesserte Präservierung der Spenderorgane durchgeführt werden.

Perioperative Organdysfunktion

Sowohl in früheren Versuchen, als auch bei den letzten orthotopen xenogenen Herztransplantationen wurden perioperative Dysfunktionen von Leber, Lunge oder Niere beobachtet. Diese reichten von klinisch irrelevanten Veränderungen der Laborparameter bis hin zu terminalem Organversagen.

Ein orthotoper Transplantationsversuch musste wegen terminaler Niereninsuffizienz am dritten Tage nach primär erfolgreicher xenogener Herztransplantation beendet werden. Bei mehreren anderen Versuchen war eine Erhöhung der Transaminasen im Serum zu beobachten. Passagere Organdysfunktionen treten häufig auch nach klinischer Transplantation auf, insbesondere im Zusammenhang mit langen Operationszeiten und einer ausgedehnten Anwendung der extrakorporalen Zirkulation [23].

Eine Erklärung für die erhöhten Transaminasen als Zeichen eines Leberschadens wäre die Infektion mit porcinem Hepatitis E Virus (pHEV) im Rahmen der Herztransplantation. Ein symptomloser Befall von Schweinen mit Hepatitis-E Viren der Subtypen gt3 und gt4 ist häufig. Grundsätzlich kann das Virus auch Primaten infizieren; eine Infektion von immunkompetenten Individuen verläuft jedoch in aller Regel asymptomatisch [24-26].

Alle Schweine werden vor Transplantation mittels PCR auf pHEV getestet. Die Testergebnisse sind jedoch bei Schweinen im Alter von 6-10 Wochen – das übliche Alter zur Xenotransplantation - häufig falsch negativ. Nach Versuchsende wurden daher Gewebe- und Blutproben von Empfängern, die während des Versuchs ausgeprägte Leberschäden gezeigt hatten, und ihren zugehörigen Spendern auf pHEV getestet. Keine der Untersuchungen erbrachte jedoch einen Nachweis von pHEV. Perioperative Minderperfusion bzw. eine untere Einflusstauung zu Versuchsende sind daher die wahrscheinlichsten Ursachen für die beobachteten Organschäden.

Über die Infektionen immunsupprimierter Empfänger mit porcinen Viren im Rahmen einer kardialen Xenotransplantation existieren bisher keine Informationen. In den bisherigen Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen perioperativer kardialer Dysfunktion oder auch Dysfunktion anderer Organe und einer pHEV Infektion ausgeschlossen werden. Die virologischen Untersuchungen von Spender und Empfängertieren wurden ausgeweitet, da die mikrobiologische Sicherheit eine hohe Priorität auf dem Weg zur klinischen Anwendung der Xenotransplantation hat.

Ausblick

Wie dargelegt, wurde die kardiale Dysfunktion während xenogener Perfusion in verschiedenen ex-vivo und in-vivo Modellen untersucht, und zugrundeliegende Pathomechanismen beleuchtet. Die erfolgreichen therapeutischen Strategien werden in aktuellen und geplanten präklinischen Studien angewendet, mit dem langfristigen Ziel, die Voraussetzungen für eine klinische Anwendung der Xenotransplantation zu schaffen. Insbesondere die Ergebnisse aus dem orthotopen Transplantationsmodell haben gezeigt, dass die Verbesserung der Herzpräservierung das Auftreten einer PCXD verhindern und so die Basis für ein konsistentes Langzeitüberleben der xenogen transplantierten Herzen sein kann.

Referenzen

1. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Dipchand AI, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Yusen RD, Stehlik J; International Society for Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report-2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Oct;32(10):951-64.
2. Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, et al. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. *Nat Commun* 2016; 7: 11138.
3. McGregor CGA, Byrne GW, Vlasin M, et al. Preclinical orthotopic cardiac xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2009;16:224.
4. Vial CM, Ostlie DJ, Bhatti FN, et al. Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19:224–229.
5. Byrne GW, McGregor CG. Cardiac xenotransplantation: progress and challenges. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012;17:148–154.
6. Byrne GW, Du Z, Sun Z, Asmann YW, McGregor CG. Changes in cardiac gene expression after pig-to-primate orthotopic xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2011 Jan-Feb;18(1):14-27
7. Colah S, Freed DH, Mundt P, et al. Ex vivo perfusion of the swine heart as a method for pre-transplant assessment. *Perfusion* 2012; 27(5):408–413
8. Collins MJ, Moainie SL, Griffith BP, Poston RS. Preserving and evaluating hearts with ex vivo machine perfusion: an avenue to improve early graft performance and expand the donor pool. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34(2):318–325
9. Ardehali A, Esmailian F, Deng M, et al. Ex-vivo perfusion of donor hearts for human heart transplantation (PROCEED II): a prospective, open-label, multicentre, randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2015;385:2577–2584
10. Kimose HH, Ravkilde J, Helligsø P, Knudsen M, Baandrup U. Influence of pre-existing ischemia on recovery from chemical cardioplegia. A study on pig hearts in an isolated blood-perfused model. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;26(1):23–31
11. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11:785–797.
12. Pierson RN III, Dorling A, Ayares D, et al. Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. *Xenotransplantation*. 2009;16:263–280.
13. Rieben R, Seebach JD. Xenograft rejection: IgG₁, complement and NK cells team up to activate and destroy the endothelium. *Trends Immunol* 2005; 26: 2- 5
14. Schneider MKJ, Seebach JD. Current cellular innate immune hurdles in pig-to-primate xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 171 – 177
15. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 291- 330
16. García P, Llano M, de Heredia AB, Willberg CB, Caparrós E, Aparicio P, Braud VM, López-Botet M. Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol* 2002; 32:936 – 944
17. Barnard CN, Losman JG, Curcio CA et al. The advantage of heterotopic cardiac transplantation over orthotopic cardiac transplantation in the management of severe acute rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977; 74: 918–924.
18. Novitzky D, Cooper DK, Lanza RP, Barnard CN. Further cardiac transplant procedures in patients with heterotopic heart transplants. *Ann Thorac Surg* 1985; 39: 149– 154.
19. Cooper DK, Novitzky D, Becerra E, Reichart B. Are there indications for heterotopic heart transplantation in 1986? A 2- to 11-year follow-up of 49 consecutive patients undergoing heterotopic heart transplantation. *Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 34: 300–304.
20. Reichenspurner H, Odell JA, Cooper DK et al. Twenty years of heart transplantation at Groote Schuur Hospital. *J Heart Transplant* 1987; 6: 317–323.
21. Hildebrandt A, Reichenspurner H, Gordon GD et al. Heterotopic heart transplantation: mid-term hemodynamic and echocardiographic analysis—the concern of arteriovenous-valve incompetence. *J Heart Transplant* 1990; 9: 675–681; discussion 682.

22. Bauer A, Postrach J, Thormann M et al. First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2010; 17: 243–249.
23. de Mendonça-Filho HT, Pereira KC, Fontes M, Vieira DA, de Mendonça ML, Campos LA, Castro-Faria-Neto HC. Circulating inflammatory mediators and organ dysfunction after cardiovascular surgery with cardiopulmonary bypass: a prospective observational study. *Crit Care*. 2006;10(2):R46
24. Denner J. Xenotransplantation and Hepatitis E virus. *Xenotransplantation*, 2015; 22(3): 167–73
25. Scobie L, Dalton HR: Hepatitis E: source and route of infection, clinical manifestations and new developments. *J Virol Hep*, 2013; 20: 1–11
26. Johne R, Dremsek P, Reetz J et al: Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol*, 2014; 27: 212–29