

Aus der Klinik für Anaesthesiologie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Xenogene ex-vivo Perfusion von transgenen hCD46 Schweineherzen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephanie Amalie Wilhelmina Andrea Maria Vandewiele

aus

Mersch in Luxemburg

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Jan-Michael Abicht

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Paolo Brenner

Prof. Dr. med. Michael Schmoeckel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Entwicklung der Herztransplantationsmedizin	6
1.2	Definition und Geschichte der Xenotransplantation	7
1.3	Abstoßung von Xenografts	8
1.3.1	Hyperakute Abstoßung	8
1.3.2	Akute humorale Abstoßung	9
1.3.3	Akute zelluläre Abstoßung	10
1.3.4	Chronische Abstoßung	10
1.4	Strategien zur Vermeidung der hyperakuten Abstoßung	10
1.5	Modelle zur Untersuchung der xenogenen Abstoßung	11
1.6	Grundlagen des Komplementsystems	12
1.6.1	Die drei Wege des Komplementsystems	13
1.6.2	Der Membranangriffskomplex	14
1.7	hCD46	15
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Versuchstiere	19
3.2	Anästhesie	19
3.3	Technik der Herzexplantation	19
3.3.1	Herzexplantation	19
3.3.2	Präparation und Kanülierung des Herzens	20
3.4	Perfusionssystem	21
3.4.1	Aufbau	21
3.4.2	Einteilung der Versuchsgruppen und Blutspende	22
3.4.3	Vorbereitung des Perfusionssystems	23
3.4.4	Reperfusion des Herzens nach Langendorff	23
3.4.5	Working-Heart-Perfusion	25
3.5	Monitoring des biventrikulären Working-Heart-Modells	26
3.6	Auswertungsparameter	27

<b>3.7</b>	<b>Klinische Chemie</b> .....	<b>28</b>
<b>3.8</b>	<b>Herzgewicht</b> .....	<b>29</b>
<b>3.9</b>	<b>Histologie</b> .....	<b>29</b>
3.9.1	Paraffineinbettung und Schnittpräparation .....	29
3.9.2	Immunhistochemie der Paraffinschnitte .....	30
3.9.3	Verwendete Materialien für die immunhistochemischen Färbungen.....	32
3.9.4	Histologische Untersuchung.....	35
<b>3.10</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Hämodynamik</b> .....	<b>37</b>
4.1.1	Herzindex .....	37
4.1.2	Schlagarbeitsindex (SWI).....	38
4.1.3	Koronarfluss .....	39
<b>4.2</b>	<b>Point-of-Care Analyse</b> .....	<b>41</b>
4.2.1	Laktat.....	41
4.2.2	Sauerstoffverbrauch .....	42
<b>4.3</b>	<b>Serologie</b> .....	<b>43</b>
4.3.1	Kreatinkinase Isoenzym MB .....	43
4.3.2	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) .....	44
4.3.3	Laktatdehydrogenase (LDH) .....	45
4.3.4	Harnstoff.....	45
<b>4.4</b>	<b>Herzgewicht</b> .....	<b>46</b>
<b>4.5</b>	<b>Immunhistochemie</b> .....	<b>47</b>
4.5.1	C4d .....	47
4.5.2	C5b-9.....	50
4.5.3	IgM .....	53
4.5.4	CD45 .....	56
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Genetische Modifikation in der Xenotransplantation</b> .....	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Working-Heart Perfusionssystem</b> .....	<b>60</b>
<b>5.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>61</b>
5.3.1	Hämodynamik .....	61
5.3.2	Point-of-Care Analyse .....	62
5.3.3	Serologie .....	63



5.3.4	Herzgewicht und Immunhistochemie .....	64
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>77</b>
<b>9.1</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>77</b>
9.1.1	Messeinheiten .....	77
9.1.2	Abkürzungen .....	77
<b>9.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>9.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>9.4</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>83</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Entwicklung der Herztransplantationsmedizin

Im Jahre 1967 führte Christian Barnard in Kapstadt, Südafrika erstmals eine erfolgreiche Herztransplantation durch [1]. Seit diesem Durchbruch in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz konnte sich der Eingriff zu einem Standardverfahren im klinischen Alltag etablieren.

Dies gelang vor allem durch die Verbesserung der immunsuppressiven Therapie mit der Einführung von Cyclosporin A in die Transplantationsmedizin [2]. Der Calcineurin-Inhibitor ist in Deutschland seit 1983 auf dem Markt und ab diesem Zeitpunkt konnte ein Anstieg der durchgeführten Herztransplantationen bis in die 90er Jahre beobachtet werden.

Die Zahlen von Eurotransplant, die Vermittlungsstelle für Organspenden in Deutschland und sieben anderen europäischen Ländern, zeigen jedoch einen deutlichen Rückgang der jährlich durchgeführten Herztransplantationen seit 1997. Im Vergleich zum Jahr 1997, in dem über 800 Herztransplantationen durchgeführt wurden, fanden 2017 in der Eurotransplant-Region nur 548 Herztransplantationen statt. Ende 2017 standen 1108 Personen auf der Warteliste für ein Spenderherz [3]. Dieser eklatante Rückgang ist auf einen schwerwiegenden Organspendemangel zurückzuführen.

Um gegen diese Problematik vorzugehen, gibt es verschiedene Herangehensweisen. Auf politischer Ebene wurden Veränderungen im Transplantationsgesetz vorgenommen. In Österreich beispielsweise besteht eine Widerspruchsregelung, welche besagt, dass einem potenziellen Spender Organe entnommen werden dürfen, sofern er nicht zu Lebzeiten einen Widerspruch abgegeben hat.

In Deutschland wurde am 1. November 2012 die Zustimmungslösung durch die Einstimmungslösung ersetzt. Im neuen Gesetz wurde festgelegt, dass die Krankenversicherungen jedem Versicherten nach Erreichen des 16. Lebensjahrs Informationsmaterial zur Organspende und einen Organspendeausweis zukommen lassen. Der Grundsatz der Freiwilligkeit bleibt erhalten, so dass niemand sich für oder gegen eine Organspende entscheiden muss. Das Ziel ist, die Organspendebereitschaft zu fördern [4].

Als alternative Therapieverfahren zur Herztransplantation wurden ventrikuläre Unterstützungssysteme, auch Kunstherzen genannt, (LVAD: left ventricular assist device oder BiVAD: biventricular assist device) entwickelt. Diese wurden initial lediglich für die kurzfristige Überbrückung zur Herztransplantation verwendet (bridge to transplant). Mittlerweile werden sie allerdings auch langfristig als Organersatz für Patienten mit langen Wartezeiten oder für Patienten, die nicht für eine Herztransplantation in Frage kommen eingesetzt (destination therapy). Zwar sind erste Ergebnisse für

den längerfristigen Gebrauch der Kunstherze vielversprechend, Langzeitergebnisse gibt es jedoch noch nicht. So bleibt abzuwarten, ob sich der Gebrauch von Unterstützungssystemen als Alternative für die Herztransplantation durchsetzen wird [5].

Einen weiteren Ansatz den Organmangel zu umgehen bietet die Xenotransplantation, die im nächsten Kapitel näher beschrieben wird.

## **1.2 Definition und Geschichte der Xenotransplantation**

Das Wort Xenotransplantation stammt aus dem Griechischen (xénos = Fremder) und dem Lateinischen (transplantare = umpflanzen) und bezeichnet die Übertragung von Zellen oder Zellverbänden zwischen verschiedenen Spezies.

1964 führte James Hardy die erste xenogene Herztransplantation durch. Er implantierte ein Schimpansenherz in einen 68-jährigen Mann, der aufgrund einer ischämischen Kardiomyopathie an akutem Herzversagen erkrankt war. Der Patient verstarb allerdings nach 90 Minuten. James Hardy machte hierfür das zu kleine Spenderherz und den schlechten Zustand des Patienten verantwortlich [6, 7].

Ein weiterer bedeutender Fallbericht in der xenogenen Herztransplantation war die Implantation eines ABO-inkompatiblen Pavianherzens in ein 12 Tage altes Frühgeborenes mit hypoplastischem Linksherzsyndrom im Jahr 1984 durch Leonard Bailey. Trotz der eigentlich guten Voraussetzungen durch die ähnliche Größe von Spender- und Empfängerherz, der Verfügbarkeit von Cyclosporin A und des noch unterentwickelten Immunsystems des Mädchens verstarb sie nach 12 Tagen [7, 8].

Ebenfalls bedeutend für die Xenotransplantation generell ist ein Fallbericht aus dem Jahr 1992. Nachdem das Immunsuppressivum Tacrolimus auf den Markt kam, nutzte Thomas Starzl es um bei einem 35-jährigen Patienten mit Hepatitis B und C, sowie HIV die Leber eines Pavians zu implantieren. Die Pavianleber ist im Gegensatz zur humanen Leber nicht durch Hepatitis B-Viren angreifbar. Der Patient überlebte 70 Tage und verstarb an einer zerebralen Aspergillose in Kombination mit anderen Infektionen [7].

Die letzte publizierte kardiale Xenotransplantation in einen Menschen erfolgte 1992. Zbigniew Religa implantierte ein Schweineherz in einen Mann mit Marfan-Syndrom. Der Patient verstarb 23 Stunden später. Publiziert wurde der Fall durch Czaplicki, welcher die zu kleine Größe des Herzens für das Versterben verantwortlich machte [7, 9].

Insgesamt gilt heutzutage das Schwein als geeignetster Spender in der Xenotransplantation. Dies liegt zum einen daran, dass die Physiologie und Anatomie des Schweins dem Menschen sehr ähnlich

ist. Insbesondere das Herz des Schweins ist, vor allem was die Größe und Funktion betrifft, vergleichbar mit dem des Menschen. Des Weiteren können Schweine relativ unproblematisch in einem kontrollierbaren Umfeld gezüchtet und nicht zuletzt genetisch modifiziert werden [10, 11].

### **1.3 Abstoßung von Xenografts**

Auch wenn die Anatomie und Physiologie des Schweins derer des Menschen sehr ähnlich ist, haben die oben genannten Versuche gezeigt, dass die xenogene Transplantation trotz Immunsuppression zu einer schwerwiegenderen Abstoßung führt, als die allogene. Dies ist auf verschiedene Abstoßungsformen und -mechanismen zurückzuführen.

Letztere werden in eine hyperakute Abstoßung („Hyperacute rejection“; HAR), eine akute humorale Abstoßung („Acute humoral xenograft rejection“; AHXR oder „Acute vascular rejection“ oder „Delayed xenograft rejection“), eine akute zelluläre Abstoßung („Acute cellular xenograft rejection“; ACXR) und eine chronische Abstoßung unterteilt [12].

#### **1.3.1 Hyperakute Abstoßung**

Die schwerwiegendste Form der Abstoßung in der Xenotransplantation ist die hyperakute Abstoßung, welche innerhalb von 24 Stunden nach Transplantation auftritt. Vorbestehende xenoreaktive Antikörper des Empfängers greifen das Endothel des Transplantats an und führen so zu einer Aktivierung der Komplementkaskade mit anschließender Läsion des Endothels. Daraus resultieren eine subendotheliale Schwellung durch Hämorrhagie im Interstitium und mikrovaskuläre Thrombosen [12, 13].

Bei den präformierten xenoreaktiven Antikörpern des Empfängers handelt es sich hauptsächlich um Antikörper gegen das Galactose- $\alpha$ 1-3-Galactose ( $\alpha$ -Gal) Epitop des Gefäßendothels, welche vorwiegend der Immunglobulinklasse IgM angehören [14, 15]. Das  $\alpha$ -Gal Epitop wird auf den Zelloberflächen der meisten Säugetiere exprimiert, nicht jedoch auf den Zellen des Menschen, des Menschenaffen und des Altweltaffen. Diese drei Spezies bilden nach der perinatalen natürlichen Besiedlung mit Darmbakterien zeitlebens Antikörper gegen  $\alpha$ -Gal [16]. So kommt es bei einer Xenotransplantation zwischen diskordanten Spezies, wie beispielsweise zwischen Mensch und Schwein [17], zu einer hyperakuten Abstoßung aufgrund von  $\alpha$ -Gal-Antikörperbildung.

Kommt es zu einer Reaktion der  $\alpha$ -Gal-Antikörper mit dem Endothel, wird vor allem der klassische Weg der Komplementkaskade aktiviert. Hierdurch bildet sich ein Membranangriffskomplex, welcher eine Porenbildung im Endothel induziert (siehe Kapitel 1.6.). Es folgt eine Aktivierung weiterer proinflammatorischer Komponenten und der Verlust der Barrierefunktion des Endothels. Dadurch

kommt es zu Hämorrhagie im subendothelialen Interstitium, sowie zu einer thrombotischen Mikroangiopathie, die zu einem Verlust der gesamten Organfunktion führen [18].

Die mikrovaskulären Thrombosierungen resultieren wie oben beschrieben ebenfalls aus der Läsion des Endothels. Die Porenbildung durch die präformierten Antikörper und die Komplementablagerungen führen zu einem Überwiegen der prokoagulatorischen Eigenschaften des Endothels [18]. Für die antikoagulatorische Eigenschaft des Endothels ist unter anderem eine intakte Glykokalyx notwendig. Letztere ermöglicht die Aktivität des „Tissue factor pathway Inhibitors“ (TFPI), von Antithrombin III und von Thrombomodulin, welches wiederum die antikoagulatorische Aktivität von Protein C erhöht. Außerdem ist an der intakten Endothelzelloberfläche die Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase (NTPDase) exprimiert. Dieses Enzym sorgt für den Abbau von aus Thrombozyten stammendem ATP und ADP und verhindert somit die Thrombozytenaggregation und Thrombosebildung. Kommt es nun im Rahmen der HAR zu einer Läsion des Endothels und zu einer Fehlfunktion der oben genannten Mechanismen, resultiert daraus ein prokoagulatorischer Phänotyp. Dazu kommt der vermehrte Kontakt von Von-Willebrand-Faktor, Kollagen und Gewebethromboplastin mit Blutbestandteilen, was ebenfalls zu einer intravasalen Gerinnungsaktivierung führt [19].

Neben diesen prokoagulatorischen Effekten ist ebenfalls die Inkompatibilität zwischen porciner und humaner Blutgerinnung zu erwähnen, welche zu einer erhöhten Gerinnungsaktivität führt. So schafft es der porcine TFPI beispielsweise nicht, den humanen Gerinnungsfaktor Xa adäquat zu inhibieren. Das porcine Thrombomodulin ist ebenfalls nicht in der Lage humanes Thrombin zu binden und somit Protein C zu aktivieren [19].

### 1.3.2 Akute humorale Abstoßung

Die akute humorale Abstoßung (AHXR) findet innerhalb von Tagen nach konkordanten Xenotransplantationen oder nach diskordanten Xenotransplantationen ohne HAR, beispielsweise durch Blockade der Komplementkaskade, statt [20].

Ihre Pathogenese beruht am ehesten auf einer Antikörper-vermittelten Reaktion in Kombination mit der Einwanderung von polymorphonukleären Leukozyten. Diese Antikörper-vermittelte Reaktion besteht einerseits aus den  $\alpha$ -Gal-Antikörpern und entspricht dann einer verzögerten HAR und wird deswegen auch „Delayed xenograft rejection“ genannt. Alternativ können sich jedoch auch neue, sogenannte induzierte Antikörper bilden, die sich gegen andere Antigene auf dem Endothel, sogenannte non-Gal-Antigene richten. Diese Antikörper werden vom Empfänger erst nach Transplantation und nach einer Sensibilisierung gebildet [12].

Hinzu kommt die Einwanderung von aktivierten Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Durch eine Aktivierung von Zytokinen und proinflammatorischen Mediatoren kommt es zur Läsion des Endothels und zu thrombotischen Veränderungen, was in einer Abstoßung des Transplantats resultiert [20].

Histopathologisch imponieren in der AHXR eine endotheliale Schwellung mit interstitieller Hämorrhagie und thrombotischen Veränderungen. Im Gegensatz zur HAR beschränken sich diese jedoch nicht auf die Mikrozirkulation, sondern finden sich ebenfalls in den mittelgroßen Gefäßen [12].

### 1.3.3 Akute zelluläre Abstoßung

Die akute zelluläre Abstoßung (ACXR) ist vergleichbar mit der Abstoßungsreaktion in der Allotransplantation. Sie spielt in der Xenotransplantation eine untergeordnete Rolle, da sie selten beobachtet wird. Zum einen liegt das daran, dass sie entweder als Begleitphänomen der AXHR auftritt oder es aufgrund einer AHXR-bedingten Abstoßung des Transplantats nicht dazu kommt [12]. Zum anderen konnte aufgrund der immunsuppressiven Therapie auch in der Allotransplantation ein Rückgang der ACXR beobachtet werden, so dass auch in der Xenotransplantation die ACXR verhindert werden kann [21].

Histologisch imponieren multifokale lymphozytäre Infiltrate mit vor allem CD20-positiven B-Lymphozyten, aber auch T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen. Interstitielle Hämorrhagie und Thrombosen fehlen typischerweise [21].

### 1.3.4 Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung ist vergleichbar mit einer Transplantatvaskulopathie. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es nur wenige Erkenntnisse in präklinischen Versuchen. Der Stellenwert in der Xenotransplantation ist bisher unklar [10].

## 1.4 Strategien zur Vermeidung der hyperakuten Abstoßung

Neben den Fortschritten der Allotransplantation, wie die stetige Optimierung der immunsuppressiven Therapie, konnten in den letzten Jahren auch in der Xenotransplantation Verfahren entwickelt werden, um die oben beschriebene Abstoßung zu umgehen. Hauptsächlich in der Überwindung der HAR konnten einige Strategien vielversprechende Ergebnisse erzeugen.

Zum einen gelingt dies durch die Elimination der  $\alpha$ -Gal-Antikörper aus dem Serum des Empfängers mit Hilfe der extrakorporalen Immunadsorption. Mit dieser Methode ist es möglich, den Antikörperspiegel signifikant zu reduzieren [22, 23].

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Inhibierung des Komplementsystems, welches wie oben erläutert eine maßgebliche Rolle in der HAR spielt. Hierzu wurden verschiedene medikamentöse Komplementinhibitoren verwendet. Ein Beispiel für solche Komplementinhibitoren ist der Cobra Venom Factor (CVF), welcher als C3-Analogon die Komplementfaktoren verbraucht [24]. CVF zeigte in Versuchen eine Verminderung der HAR, ist jedoch durch seine potenzielle Toxizität umstritten.

Neben medikamentösen Komplementinhibitoren gibt es die Möglichkeit, transgene Schweine zu verwenden, die sogenannte komplementregulierende Faktoren (Regulators of complement activation; RCA) an deren Zelloberflächen exprimieren und so die Komplementkaskade im Rahmen der HAR blockieren. Hervorzuheben ist hier der in dieser Arbeit behandelte und in Kapitel 1.6. näher beschriebene Cofaktor hCD46. Weitere Transgene sind beispielsweise der „Decay-accelerating-factor“ (DAF, CD55), ein Inhibitor der C3-Konvertase (Siehe Kapitel 1.4.), und der „Membrane inhibitor of reactive lysis“ (MIRL, CD59), welcher die Komplementfaktoren C8 und C9 inhibiert [25].

Ein Meilenstein in der Entwicklung geeigneter Spendertiere war die Herstellung von  $\alpha$ 1-3-Galactosyltransferase-knock-out-Schweinen. Hierdurch konnte die Bindung von  $\alpha$ -Gal-Antikörpern des Empfängers an das Epitop des Spenderorgans verhindert werden, was eine Umgehung der HAR ermöglicht [26-28].

## **1.5 Modelle zur Untersuchung der xenogenen Abstoßung**

Zur Untersuchung der xenogenen Reaktion zwischen porcinen Zellen eines Transplantats und dem humanen Immunsystem sind nur wenige Versuchsmodelle nutzbar. Erst in einer unbestimmten Zukunft werden dies klinische Studien sein. Präklinische Studien sind durch die Transplantation von porcinen Zellen, Gewebe oder Organen auf nicht-menschliche Primaten möglich, aus ethischen und finanziellen Gründen jedoch nur in eingeschränkter Zahl. Die HAR zwischen dem humanen Immunsystem und porcinen Organen kann aber auch in ex-vivo Perfusionssystemen mit menschlichem Blut untersucht werden.

Seit Oscar Langendorff 1895 erstmals sein Perfusionsmodell für Säugetierherzen vorstellte [29, 30], wurden zahlreiche Varianten beschrieben, die es erlaubten die kardiale Funktion möglichst physiologisch zu untersuchen. Zunächst fand die Entwicklung isolierter Linksventrikulärer-Working-Heart-Modelle durch Neely et al. ihren Ursprung, was die Interpretation der linksventrikulären Pumpfunktion und des Metabolismus unter Einfluss einer Vor- und Nachlast ermöglichte [31]. Auch in der Xenotransplantation stellte sich diese Entwicklung als besonderer Fortschritt heraus, da nun mehr die hyperakute Abstoßungsreaktion in Form der kardialen Pumpfunktion gemessen werden konnte [32]. Das Einbeziehen des rechten Ventrikels, erstmals beschrieben durch Demmy et al. im

biventrikulären Rattenherzmodell, ermöglichte eine weitere Annäherung an die in-vivo physiologische Funktion des Herzens und somit einer Verbesserung der Interpretation von Schlagvolumen, Cardiac output und transeptalem Druckgradienten [33].

## **1.6 Grundlagen des Komplementsystems**

Das Komplementsystem besteht aus mehr als dreißig kommunizierenden Plasma- und membranständigen Proteinen im Blut und anderen Körperflüssigkeiten und ist sowohl Teil des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems. Es erhielt seinen Namen durch die ursprünglich entdeckte Ergänzung (Komplementierung) der Antikörperfunktion im erworbenen Immunsystem. Heutzutage ist jedoch bekannt, dass es ebenso allein durch die Aktivierung der Oberflächen von Mikroorganismen in der angeborenen Immunität wirken kann. Seine wichtigsten Aufgaben bestehen zum einen in der Markierung und Opsonierung körperfremder Pathogene, welche dadurch von Phagozyten erkannt werden können, und zum anderen im Abtöten von Mikroorganismen. Diese Elimination der Pathogene wird ermöglicht durch Lyse der bakteriellen Membran anhand der Bildung von Poren durch den sogenannten Membranangriffskomplex (MAC). Eine dritte wichtige Funktion des Komplementsystems ist die Induktion einer lokalen Inflammationsreaktion durch die Aktivierung von entzündungsvermittelnden Anaphylatoxinen [34].

Der Wirkungsmechanismus des Komplementsystems lässt sich als „triggered Enzymkaskade“ beschreiben. Ein Großteil der Komplementfaktoren sind sogenannte Zymogene und somit durch proteolytische Spaltung aktivierte Proteasen, die sobald sie in Kontakt mit infektiösen Herden kommen ihre Funktion ausüben. Sobald eine Protease aktiviert wird, spaltet sie weitere Proteine. Die Produkte dieser Reaktion entwickeln entweder eine enzymatische Aktivität um wiederum das nächste Substrat zu aktivieren oder eine entzündungsvermittelnde Wirkung in Form einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Anziehung von Phagozyten oder Mastzellen. Diese Kaskade ermöglicht innerhalb kürzester Zeit eine lokale Erhöhung aktivierter Komplementfaktoren und Entzündungsmediatoren, was zu einer schnellen Verstärkung der antibakteriziden Wirkung führt [35].

Die Komplementkaskade kann durch drei verschiedene Reaktionswege initiiert werden (Abbildung 1). Diese laufen jedoch alle an einem Konvergenzpunkt zusammen und bilden in Form des MAC und der Opsonierung der Pathogene eine gemeinsame Endstrecke. Der Konvergenzpunkt der drei Reaktionswege ist die Bildung einer C3-Konvertase, welche dann im Verlauf C3 in C3b und C3a spaltet, zur Bildung des MAC führt und für die Opsonierung der Pathogene verantwortlich ist [36].



## 1.6.1 Die drei Wege des Komplementsystems

- Der klassische Weg

Der klassische Weg ist sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunität von Bedeutung und zeigt eine Beteiligung von neun Glykoproteinen (C1-C9), beginnend mit C1. Er wird initiiert durch die Bindung von C1q an einen Antikörper-Antigen-Komplex als Teil des erworbenen Immunsystems oder direkt an eine pathogene Oberfläche in der angeborenen Immunität. C1q ist ein Kollektin, bildet sechs C-terminale globuläre Domänen (Köpfchen) und ist ein Bestandteil des C1-Komplexes, welcher zusätzlich zwei C1r- und C1s-Moleküle umfasst.

Die Bindung von mehr als einem C1q-Köpfchen an ein Pathogen oder einen Antikörper-Antigen-Komplex führt zu einer Konformationsänderung und autokatalytischen Aktivierung von C1r, welches das C1s-Zymogen spaltet. Letzteres spaltet C4 in C4a und C4b, welches eine kovalente Bindung mit der pathogenen Oberfläche eingeht und im Anschluss daran C2 binden kann. C1s hat nun Zugriff auf C2 und spaltet das inaktive Zymogen in C2a und C2b. Es entsteht der Komplex C4b2a, die C3-Konvertase des klassischen Weges [37].

- Der Lektinweg

Homolog zum klassischen Weg wird der Lektinweg durch Proteine aktiviert, die C1q strukturell ähnlich sind [38].

Das wichtigste Protein ist das mannosebindende Lektin (MBL). Dieses Molekül bindet an Mannosereste die nur an der Oberfläche von Krankheitserregern direkt zugänglich und auf körpereigenen Zellen durch Zuckerreste bedeckt sind. Ebenfalls homolog zu den Proteinen C1r und C1s, beinhaltet der MBL-Komplex jeweils zwei inaktive Zymogene, MASP-1 und MASP-2. Bei der Bindung von MBL an ein Pathogen kommt es zur Aktivierung von MASP-1 und MASP-2, welche C4 und C2 spalten und aktivieren. Analog zum klassischen Weg bildet der C4b2a-Komplex die C3-Konvertase [39].

Eine weitere Proteingruppe die C1q ähnlich ist, ist die der Ficoline. Es gibt drei menschliche Ficoline, L-, M-, und H-Ficolin. Sie binden spezifisch an N-Acetylglucosamin und N-galactosamin der Pathogenoberflächen und bilden ebenfalls einen Komplex mit MASP-1- und MASP-2-Molekülen. Zusätzlich zum kollagenartigen Stiel zeigt sich bei den Ficolinen eine fibrinogenähnliche Komponente [40, 41].

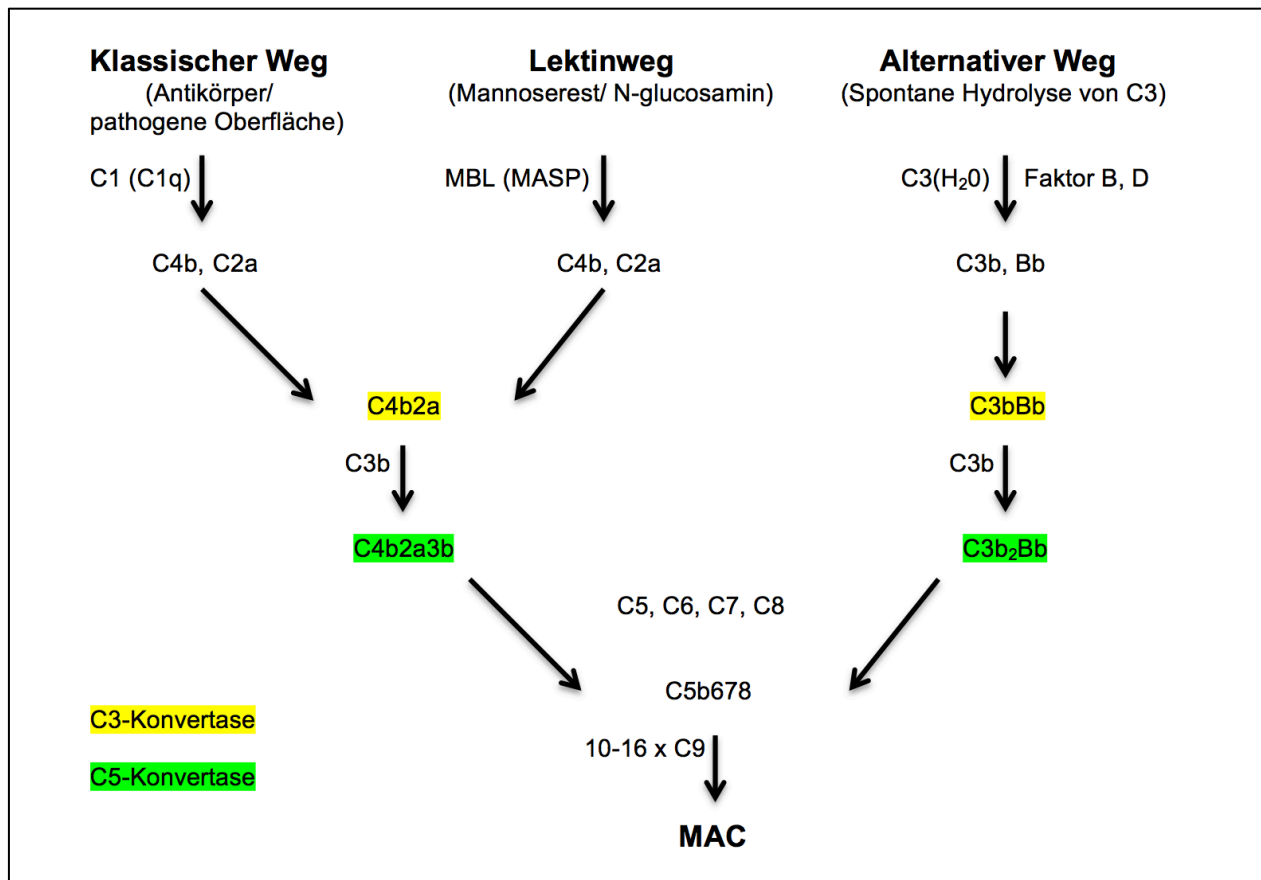
- Der alternative Weg

Der alternative Weg kann an pathogenen Oberflächen ablaufen, ohne dass ein spezifischer Antikörper vorhanden sein muss. Er führt im Gegensatz zum klassischen und Lektinweg zur Bildung einer anderen C3-Konvertase, nämlich des C3bBb-Komplexes. Auslöser ist die spontane Hydrolyse einer Thioesterbindung („tick-over“) von C3 zu C3(H<sub>2</sub>O). Die daraus resultierende Konformationsänderung ermöglicht die Bindung des Plasmaproteins Faktor B an C3(H<sub>2</sub>O) und die anschließende Spaltung von Faktor B in Faktor Bb und Ba durch die Plasmaprotease Faktor D. Daraus resultiert der Komplex C3(H<sub>2</sub>O)Bb, die C3-Konvertase in seiner flüssigen Phase, welche C3 in C3a und C3b spaltet.

C3b geht eine kovalente Bindung mit der pathogenen Membran ein. Es bindet im Anschluss Faktor B, was im Verlauf zur Bildung der C3-Konvertase C3bBb führt und somit die weitere Produktion von C3b anregt. Die Besonderheit der Konvertase des alternativen Weges ist die Tatsache, dass die Produktion von C3b zur weiteren Bildung eben dieser Konvertasen führt und sie somit eine Verstärkungsmöglichkeit der Komplementkaskade darstellt [42, 43].

### 1.6.2 Der Membranangriffskomplex

Zur Bildung des MAC bindet zunächst C3b an die verschiedenen C3-Konvertasen wodurch die C5-Konvertasen C4b2a3b und C3b<sub>2</sub>Bb entstehen. C5 kann nun an das integrierte C3b binden und wird durch C2b oder Bb in C5a und C5b gespalten. Im Anschluss bindet C5b C6, welches als Andockstelle für C7 dient. Die Bildung des C5b67-Komplexes führt zu einer Konformationsänderung und zur Freigabe hydrophober Stellen, sodass sich der amphiphile Komplex nun in die Lipiddoppelschicht der pathogenen Membranen integrieren kann. Das Protein C8, bestehend aus C8β und C8α-γ, bindet mit der β-Domäne an C5b, wodurch die α-γ-Domäne in die Membran eingeschlossen wird. C8α-γ initiiert die Polymerisation von 10-16 C9-Proteinen, welche die Pore in der pathogenen Membran bilden. Der so entstandene MAC führt zur Störung der zellulären Homöostase, des Protonengradienten und zum Eindringen von Lysozymen in das Zellinnere der Pathogene und somit zu deren Lyse [44].



**Abbildung 1:** Die Komplementkaskade mit klassischem, alternativem und Lektinweg.

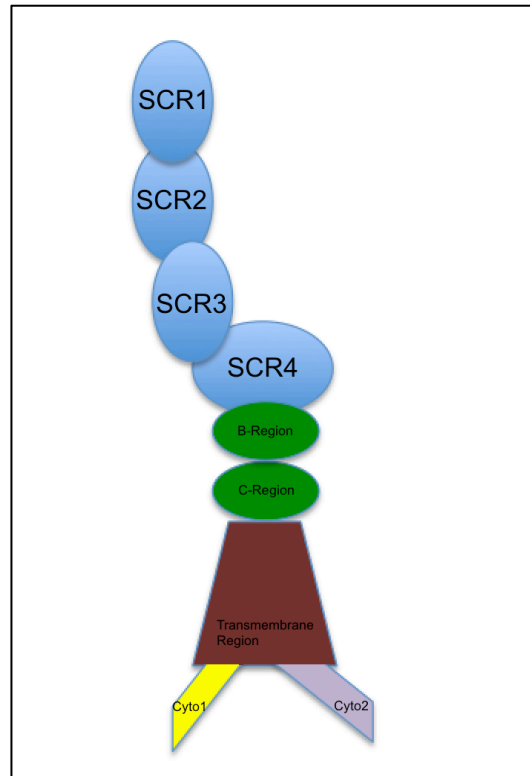
Klassischer- und Lektinweg bilden die C3-Konvertase C4b2a und die C5-Konvertase C4b2a3b. Aus dem alternativen Weg resultieren die C3-Konvertase C3bBb und die C5-Konvertase C3b<sub>2</sub>Bb. Beide C5-Konvertasen führen anschließend zur Bildung des MAC.

## 1.7 hCD46

Um die Lyse körpereigener Zellen durch das Komplement zu verhindern und um den Körper effizient vor Pathogenen zu schützen, bedarf es regulatorischer Proteine, welche die Komplementkaskade inhibieren, beziehungsweise verstärken.

Eines dieser Proteine ist das zellmembranständige, humane CD46 Typ I Glykoprotein, auch unter dem Namen Membran Cofaktor Protein (MCP) bekannt. Das 1986 entdeckte ubiquitäre Protein ist 45 bis 70 kDa groß und besitzt eine inhibitorische Wirkung auf das Komplementsystem. Es ist sowohl strukturell (gemeinsames 60 Aminosäuren langes Strukturelement, „Short consensus repeat“) und genetisch (Genlocus der Komplementregulatorproteine auf Chromosom 1q32) als auch funktionell (Bindung der Komplementfaktoren C3b und C4b) mit den anderen Komplementregulatorproteinen verwandt [45].

Durch alternatives Splicing des CD46-Gens können vier Isoformen des Proteins entstehen. Letzteres besteht, beginnend mit dem N-Terminus, aus vier Short consensus repeats, einer O-glykosylierten C- und/oder B-Region, 12 Aminosäuren unbekannter Funktion, einer transmembranen Region und einer oder zwei cytoplasmatischen Domänen (Abbildung 2) [46].



**Abbildung 2:** hCD46 Struktur.

*Der N-Terminus besteht aus vier Short consensus repeats (SCR1-4), welche die komplementregulatorische Funktion ausüben. Anschließend folgen eine C- und/oder B-Region, 12 Aminosäuren unbekannter Funktion, eine transmembrane Region und eine oder zwei cytoplasmatische Domänen (Cyto1 und 2).*

hCD46 wirkt als Cofaktor für die Plasmaserinprotease Faktor I, welche C3b in die inaktive Form iC3b und C4b in C4c und C4d umwandelt. Die Folge ist die Inaktivierung der C3- und C5-Konvertasen und die Inhibierung der Signalkaskade des Komplementsystems [47]. Da sich seine Wirkung nur auf die Zelle beschränkt, in die hCD46 verankert ist, wird es als intrinsisches regulatorisches Protein bezeichnet. Im Gegensatz zu CR1, welches ebenfalls C3b/C4b benachbarter Zellen binden kann [48].

Durch seine Funktion ist hCD46 maßgeblich für den Schutz der körpereigenen Zellen vor überschießender Komplementaktivität verantwortlich. Das wird deutlich bei Mutationen im CD46-Gen, welche zum atypischen hämolytisch-urämischen Syndrom führen. Durch unkontrollierte Komplementaktivierung kommt es zu C3b-Ablagerungen im Endothel und im Anschluss daran zu

einer mikroangiopathischen, hämolytischen Anämie, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen [49].

Neben seiner regulatorischen Funktion im Komplementsystem wirkt hCD46 als Virus- und Bakterienrezeptor unter anderem für den Masernvirus, den Herpesvirus 6, Neisseriaviren, bovine Virusdiarrhoe und Streptococcus pyogenes Infektionen [50]. hCD46 spielt außerdem eine Rolle in der Fertilisation [51].

Darüber hinaus zeigen neuere Erkenntnisse, dass hCD46 zur Regulation CD4<sup>+</sup>T-Zellen beiträgt. hCD46 führt als Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors zur Generierung IL-10-sezernierender regulatorischer T-Zellen (IL-10-secreting regulatory T-cells; T<sub>regs</sub>), was eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellt [52, 53].

## 2 Fragestellung

Die Xenotransplantation bietet eine bisher theoretische Möglichkeit, den bestehenden Organspendemangel zu beheben. Es gilt jedoch auf Basis des wachsenden Wissens über die xenogene Abstoßung klinisch anwendbare Konzepte zu entwickeln.

Mit der genetischen Modifikation von porcinen Herzen, wie beispielsweise mit der Expression von  $\alpha$ 1-3-Galactosyltransferase-knock-out oder Komplementinhibitoren am Endothel konnten bisher die besten präklinischen Ergebnisse nach kardialer Xenotransplantation erreicht werden [54]. Bisher gibt es jedoch noch kein Studienmodell, in dem die isolierte Auswirkung des hCD46-Transgens auf die HAR in der kardialen Xenotransplantation untersucht wurde.

In ex-vivo Perfusionsversuchen wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der endothelialen Expression des humanen Komplementregulators hCD46 auf die HAR im Schweineherz untersucht. Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit behandelt und beantwortet werden.

- Verbessert das hCD46-Transgen die kardiale Pumpfunktion des xenogen perfundierten Herzens?
- Fördert das hCD46-Transgen die myokardiale Durchblutung?
- Reduziert das hCD46-Transgen die Gewebischämie und myokardiale Schädigung?
- Reduziert das hCD46-Transgen die Endothelschädigung und damit verbundene Ödembildung und Gewebehämorrhagie?
- Wird durch das hCD46-Transgen die Aktivierung der Komplementkaskade im kardialen Gewebe unterdrückt?

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Versuchstiere**

Sechs hCD46-transgene Schweine und elf Deutsche Landrasseschweine wurden vom Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Moorversuchsgut) in Oberschleißheim bereitgestellt. Das Alter der Schweine betrug 8-10 Wochen und das Gewicht 12-15 Kilogramm. Laut Anzeige gemäß § 6 Absatz 1 Satz 2 Nr. 4 des Tierschutzgesetzes wurde das Vorhaben von der Regierung von Oberbayern genehmigt und unter dem Geschäftszeichen Gz. 55.2-1-54-2532.3-102-12 geführt. Die Tiere wurden bereits eine Woche vor der Operation im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin (WBEX) in Gruppen untergebracht.

### **3.2 Anästhesie**

Die Prämedikation der Schweine erfolgte mit einer intramuskulären Injektion von 10 mg/kg Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), 10-20 mg/kg Ketamin (Ketavet®, Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) und 0,02 mg/kg Atropinsulfat (Atropinsulfat®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Nackenmuskulatur. Nach dem Einschlafen der Tiere wurden diese in den Operationssaal transportiert und anschließend ein venöser Zugang am Ohr gelegt. Die Narkose wurde mit 1 mg/kg Propofol (Propofol-®Lipuro 2%, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und 5-7 µg/kg/h Fentanyl Dihydrogencitrat (Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) eingeleitet. Es folgte die endotracheale Intubation mittels 4.5 Spiraltubus (Safety-FLEX, Mallinckrodt, St. Louis, USA) mit anschließend druckkontrollierter maschineller Beatmung (Siemens SC 900, Siemens AG, München, Deutschland) mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch von 50%. Die Narkose wurde während der Herzexplantation mit 5-7 mg/kg/h Propofol und intermittierender Gabe von 5 µg/kg/h Fentanyl weitergeführt. Bei Bedarf einer Volumensubstitution wurde Acetat gepufferte Vollelektrolytlösung (Jonosteril®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H, Deutschland) verabreicht.

### **3.3 Technik der Herzexplantation**

#### **3.3.1 Herzexplantation**

Nach Fixierung des Tieres in Rückenlage erfolgte zunächst ein medianer Schnitt vom Jugulum bis zum Xiphoid, um dann die Sternotomie unter Schonung der kranial gelegenen Vasa thoracica interna durchzuführen. Durch das Einlegen des Wundspreizers wurde der Zugriff auf das Mediastinum ermöglicht, sodass der Thymus stumpf reseziert und das Perikard mittels einer T-förmigen Inzision

eröffnet werden konnte. Nach Anlage zweier Perikardhochnähte wurde die V. cava caudalis angeschlungen und das rechte Vorhofohr ligiert. Die A. pulmonalis und die Aorta ascendens wurden freipräpariert und letztere im Anschluss daran ebenfalls angeschlungen.

Daraufhin wurde eine Kanüle in die Aortenwurzel eingeführt und mit einer Tabaksbeutelnaht befestigt, um die Verabreichung der kardioplegischen Lösung (Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland) vorzubereiten. Anschließend erfolgte die systemische Vollheparinisierung mit 500 IE/kg (Heparin-Natrium-25000-Ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland). Nach Ligatur der V. cava caudalis und dem Ausklemmen sowohl der V. cava cranialis und der Aorta ascendens wurden zur Kardioplegie 4°C kalte kardioplegische Lösung instilliert und das Herz mittels Ringerlösung (Plastipur®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) topisch gekühlt. Die Volumenbelastung des Herzens wurde reduziert, indem sowohl das linke als auch das rechte Vorhofohr eröffnet wurden.

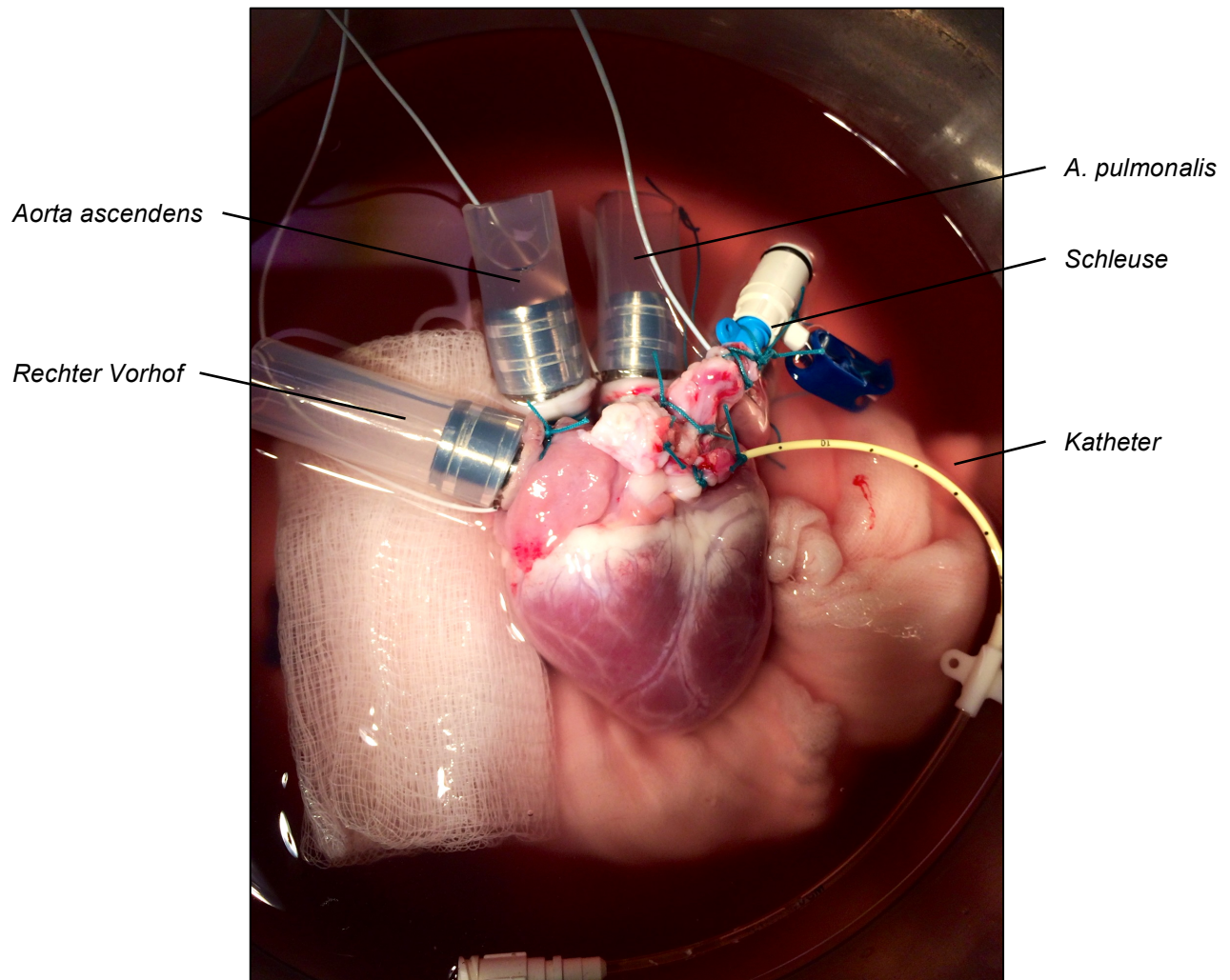
Nach Applikation von 50 ml/kg kardioplegischer Lösung wurden Herz und Lunge en bloc entnommen und in 4°C kalter Ringerlösung aufbewahrt.

### 3.3.2 Präparation und Kanülierung des Herzens

Nach Explantation des Herzens wurden Lungen und Trachea freipräpariert und vom Herzen entfernt. Nachdem die Pulmonalvenen mit einer Massenligatur verschlossen wurden, wurde das Herz gewogen.

Aorta ascendens und Truncus pulmonalis wurden auf 3 cm Länge gekürzt. Anschließend wurden vier Stahlkanülen (40 mm Länge, 12 mm Durchmesser, eigene Herstellung) in die Aorta ascendens, den Truncus pulmonalis, sowie den rechten und linken Vorhof eingeführt und mit Ligaturen fixiert (Abbildung 3). In die V. cava caudalis wurde ein 14.0 Gauge Katheter (Blue FlexTip® Catheter, Arrow Deutschland GmbH, Erding, Deutschland) eingeführt, bis in den Sinus coronarius vorgeschoben und mit einer Ligatur befestigt. Die V. cava cranialis wurde nach Einführung einer 1cm langen 11.8 Gauge Schleuse (Arrow Deutschland GmbH, Erding, Deutschland) ebenfalls ligiert.





**Abbildung 3:** Kanülierung des Herzens.

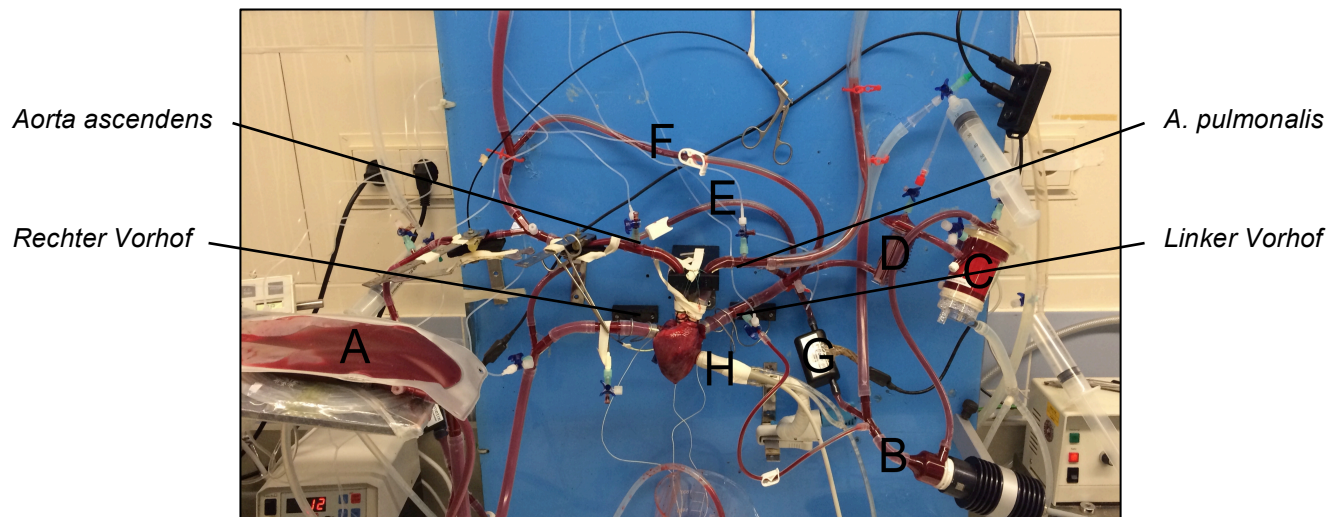
Herz mit 4 Kanülen in der Aorta ascendens, der A. pulmonalis, dem rechten und linken (auf der Abbildung nicht zu sehen) Vorhof, einem Katheter im Sinus coronarius und einer Schleuse für die Biopsiezange.

### 3.4 Perfusionssystem

#### 3.4.1 Aufbau

Das Perfusionssystem, photographisch dargestellt in Abbildung 4, wurde konzipiert, um juvenile Schweineherzen ex-vivo aber in biventrikulärer Funktion zu untersuchen. Das Schlauchsystem wurde im WBEX entwickelt und so aufgebaut, dass die makro-hämodynamische Strömung im Herzen weitgehend physiologisch stattfand und dafür weniger als 500 ml Perfusat benötigt wurde. Es bestand aus Schläuchen und Konnektoren (Raumedic®-ECC, Rehau AG&Co, Rehau, Deutschland), die für den Aufbau der Herz-Lungen-Maschine und der extrakorporalen Perfusion verwendet werden. In das

Perfusionssystem waren ein Reservoir (Raumedic®-ECC, Rehau AG&Co, Rehau, Deutschland), ein Oxygenator (HILITE® 800 LT, Rheoparin® beschichteter Hohlfaser Oxygenator, MEDOS Medizintechnik AG, Stolberg, Deutschland), ein 30 µm Teilchenfluss Filter (Micro40, Sorin Group, Milano, Italien), eine Rotationspumpe (Deltastream®, MEDOS Medizintechnik AG, Stolberg, Deutschland) und zwei Doppler-Sensoren (Ultrasonic Flowmeter, Cynergy3 Components Ltd., Wimborne, England) zur Flussmessung integriert. Des Weiteren war das System über zuführende Leitungen mit Druckwandlern (Einfach-Druckwandler-Set, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Inc., Utah, USA) und einem Glucoseperfusor (Perfusor®secura, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verbunden. Zum Erreichen eines physiologischen Widerstandes und einer Impedanz wurden ein sogenanntes “dreiteiliges Windkesselsystem“ und ein Dämpfungselement integriert. Die Temperatur des Perfusats und Herzens wurde über einen Wärmetauscher innerhalb des Oxygenators, sowie mittels Wärmen des Reservoirs kontrolliert.



**Abbildung 4:** Das Perfusionssystem.

*Biventrikuläres Perfusionssystem mit Reservoir (A), Rotationspumpe (B), Oxygenator (C), Filter (D), rechtem (E) und linkem (F) Umgehungskreislauf, Flusssensoren (G) und Echokardiographiesonde (H).*

### 3.4.2 Einteilung der Versuchsgruppen und Blutspende

Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen eingeteilt. Die erste diente als Kontrollgruppe, bestehend aus fünf Deutsche Landrasseschweinen (autologe WT-Gruppe). Die autologe Perfusion dieser Herzen erfolgte mit Eigenblut der Tiere. Die zweite Gruppe bestand aus sechs hCD46-transgenen Schweinen (xenogene hCD46-Gruppe), dessen Herzen xenogen mit Humanblut perfundiert wurden. Die Herzen der dritten Gruppe, bestehend aus sechs Deutsche Landrasseschweinen (xenogene WT-Gruppe), wurden ebenfalls mit humanem Blut xenogen perfundiert.

Als Basis für das xenogene Perfusat wurden 500 ml frisches, heparinisiertes humanes Vollblut (10 IE/ml) verwendet. Aufgrund des durchschnittlich höheren Hämoglobinwerts wurden ausschließlich Blutspender des männlichen Geschlechts herangezogen. Am Versuchstag wurde während der Ischämiezeit des Herzens ein venöser Zugang in die V. mediana cubiti des Spenders gelegt und Blut in zehn 50 ml Perfusorspritzen (BD Perfusion 50 ml Syringe Luer Lock™ Tip 146 x ¼) abgenommen. Letztere wurden bereits im Voraus mit je 500 IE Heparin versehen. Um eine größere Menge Perfusat zur Verfügung zu haben, wurde das Blut mit 6%iger Hydroxyethylstärke (Vololyte 6%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Fresenius) im Reservoir so verdünnt, dass ein Hämoglobinwert zwischen 8 und 9 mg/dl zu erreicht wurde.

Ein Blutspender spendete jeweils für einen Versuch der zweiten und dritten Versuchsgruppe, so dass letztere gepaart untersucht werden konnten.

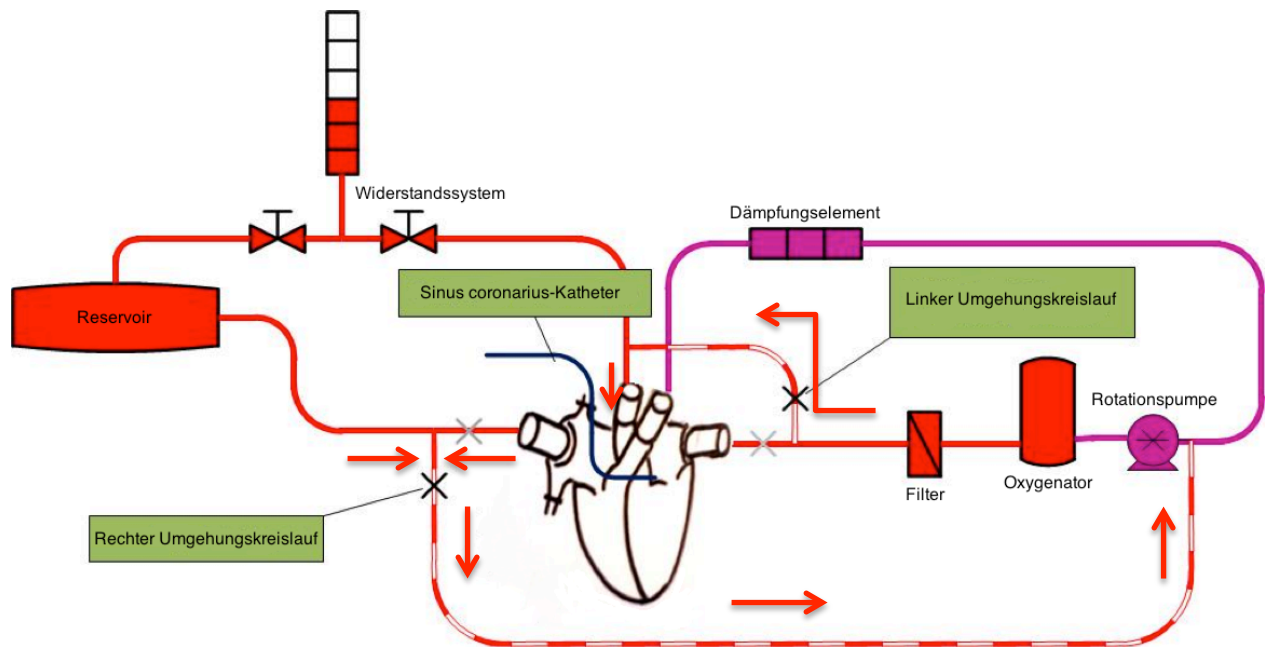
### 3.4.3 Vorbereitung des Perfusionssystems

Das Perfusionssystem wurde im Vorfeld mit NaCl durchgespült und erwärmt. Anschließend wurde das humane Perfusat ohne Perfusion des Herzens zirkuliert. Der Sauerstoff-, CO<sub>2</sub>- und Luftfluss durch den Oxygenator wurde so reguliert, dass ein pO<sub>2</sub> von 100-150 mmHg und ein pCO<sub>2</sub> von 35-40 mmHg im Perfusat erreicht wurde. Nach Entfernung aller Luftblasen im System und kurz vor Erreichen der 2,5-stündigen Ischämiezeit des Herzens, konnte das Herz eingesetzt werden, indem es entsprechend Abbildung 4 mit den vorgesehenen Schläuchen des Perfusionssystems verbunden wurde. Die Aorta war dabei an einen zum Widerstandssystem führenden, abgeklemmten Schlauch angeschlossen, die A. pulmonalis war über das Dämpfungselement an die Pumpe gekoppelt und der rechte und linke Vorhof erhielten jeweils vom Reservoir und vom Oxygenator und Filter zuführende Leitungen. Nach der Fixierung des Herzens wurde dieses sorgfältig mit Perfusat gefüllt und entlüftet. Nach einem einmaligen Bolus von 2ml erfolgte eine konstante Glucose-Infusion mit 100 mg/h, sowie Insulin mit 0,2 IE/h.

### 3.4.4 Reperfusion des Herzens nach Langendorff

Nach Ablauf der 2,5-stündigen Ischämiezeit des Herzens wurde die Aortenklemme geöffnet. Damit begann über einen retrograden Fluss über die Aorta ascendens in die Koronararterien die Reperfusion des Herzens mit dem zirkulierenden Perfusat bei einem Mitteldruck von 70 mmHg. Die elektrische Aktivität des Myokards setzte dadurch wieder ein und es kam zum Kammerflimmern. Daraufhin wurde das Herz mit einem manuellen externen Defibrillator (Hewlett Packard Codemaster XL+®, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) mit 5-10J defibriert.

Nach dem Erstbeschreiber kann die initial durchgeführte Perfusion mit retrogradem Aortenfluss des Herzens auch Perfusion nach Langendorff genannt werden (Abbildung 5). Zu Beginn wurde das Herz nach Langendorff perfundiert. Aus dem Reservoir erfolgte der Fluss über den rechten Umgehungskreislauf in den pulmonalen Kreislauf, bestehend aus Rotationspumpe, Oxygenator und Filter. Von dort aus floss das Blut über den linken Umgehungskreislauf zur Aorta. Der Gradient zwischen hohem Aortendruck, aufgebaut durch das Widerstandssystem und die Rotationspumpe, und niedrigem Ventrikeldruck sorgte dafür, dass die Aortenklappe geschlossen blieb. Infolgedessen kam es zum retrograden Fluss durch die Aorta in die Koronararterien. Aus den Koronararterien floss das Blut in die Mikrozirkulation des Myokards und von dort aus über die Koronarvenen in den Sinus coronarius. Über die Kanüle im rechten Vorhof wurde das Blut aus dem rechten Herzen in das Schlauchsystem geleitet. Hier erfolgte der Zusammenfluss mit Blut aus dem Reservoir, welches nicht über die Aorta in die Koronararterien gelangte und der Kreislauf wurde geschlossen. Um den linken Vorhof bei möglicher geringgradiger Aorteninsuffizienz zu entlasten, führte ein Shunt das Blut von der linken Vorhofkanüle zum Eingang der Rotationspumpe, an dem ein negativer Druck herrschte.

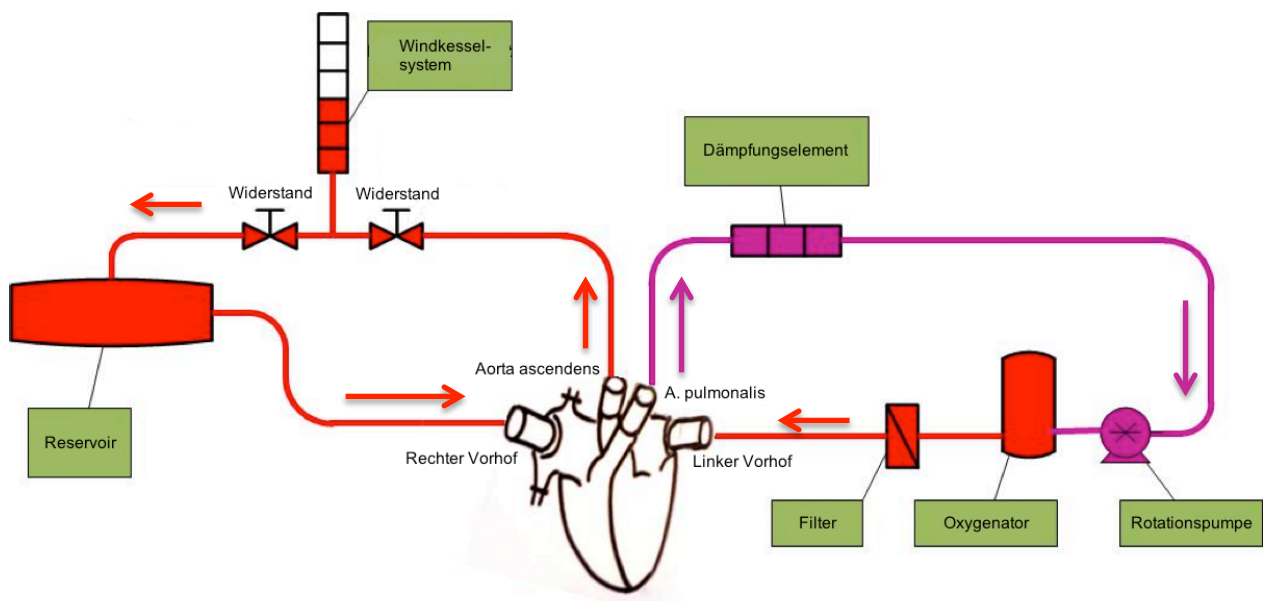


**Abbildung 5:** Perfusion nach Langendorff.

Das Blut floss aus dem Reservoir über den rechten Umgehungskreislauf zur Rotationspumpe, zum Oxygenator und zum Filter. Von dort führte das System über den linken Umgehungskreislauf zur Aorta. Auf Grund der verschlossenen Aortenklappe floss das Blut retrograd in die Koronararterien und gelangte über die Mikrozirkulation in die abfließenden Venen und den Sinus coronarius. Anschließend wurde das Blut durch den rechten Vorhof in das Schlauchsystem geleitet, wo es mit dem Restblut aus dem Reservoir zusammenfloss, sodass der Kreislauf geschlossen wurde.

### 3.4.5 Working-Heart-Perfusion

Nach 15 Minuten Langendorffperfusion wurden beide Umgehungskreisläufe und der Shunt verschlossen. Es erfolgte der Übergang in den Working-Heart-Modus (Abbildung 6). Durch Anheben des Reservoirs floss das Perfusat mit dem dadurch erreichten hydrostatischen Druck in den rechten Vorhof und den rechten Ventrikel. Das ausgeworfene Blut gelangte über die A. pulmonalis in den pulmonalen Kreislauf. Um die Druckamplituden im pulmonalarteriellen System auf physiologische Werte von ca. 20 mmHg zu reduzieren war ein Dämpfungselement integriert worden. Das Blut floss mit Unterstützung einer Zentrifugalpumpe durch den Oxygenator und von dort in den linken Vorhof. Ausgeworfen vom linken Ventrikel führte es über die Aorta und das Windkesselsystem zurück in das Reservoir. Durch Steuerung der Widerstände und Dämpfung konnte der Mitteldruck konstant bei ca. 65 mmHg und der systolische Druck bei 100 mmHg eingestellt werden.



**Abbildung 6:** Working-Heart-Perfusion.

Das Blut floss aus dem Reservoir in den rechten Vorhof, in den rechten Ventrikel und anschließend über die A. pulmonalis und das Dämpfungselement zur Rotationspumpe. Von dort aus wurde das Blut oxygeniert und gefiltert um dann über den linken Vorhof in den linken Ventrikel zu gelangen. Über die Aorta ascendens gelangte das Blut durch ein Widerstandssystem und zurück zum Reservoir.

### 3.5 Monitoring des biventrikulären Working-Heart-Modells

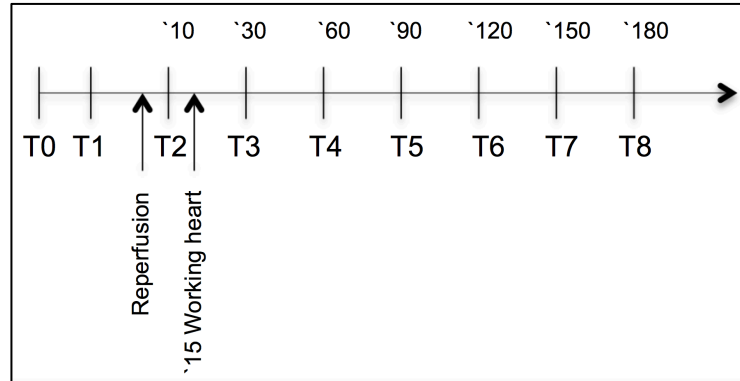
Folgende Parameter wurden erhoben, um eine physiologische Perfusion des biventrikulären Modells zu gewährleisten und eine spätere Auswertung zu ermöglichen.

- **Blutdruckkontrolle:**  
Mit Hilfe der oben genannten Druckwandler, von welchen flüssigkeitsgefüllte Druckleitungen zu den Kanülen der Aorta, der A. pulmonalis, des rechten und des linken Vorhofs führten, konnten die systolischen und diastolischen Drücke sowie die Druckkurven gemessen werden.
- **Elektrokardiographie:**  
Über drei an den Kanülen befestigte Elektroden wurde ein EKG abgeleitet, um den Herzrhythmus und die Frequenz zu bestimmen.
- **Flow-Messung:**  
Über die zwei in-line Dopplersensoren konnte der Blutfluss durch die Aorta und die A. pulmonalis kontinuierlich aufgezeichnet werden.
- **Blutgasanalyse (RAPIDLab1265®, Siemens AG, Erlangen, Deutschland):**  
Beginnend mit den Ausgangswerten des venösen Spenderblutes wurden Blutgasanalysen durchgeführt. Im Verlauf des Versuchs wurden sowohl arterielle als auch koronarvenöse Proben entnommen, um O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, BE, Calcium und Glucose zu steuern. O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> wurden mittels des Gasflusses des Oxygenators eingestellt. Natriumbicarbonat (Natriumhydrogencarbonat 8,4% B.Braun Infusionslösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Calciumgluconat (Calciumgluconat 10% B.Braun Injektionslösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden als Bolus, Glucose durch kontinuierliche Zufuhr substituiert.
- **Echokardiographie (HP Sonos 5500®, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland):**  
Eine 8 MHz Ultraschallsonde war für den gesamten Untersuchungszeitraum in einer Position auf das Herz gerichtet. Mit dieser wurde die kurze Achse kontinuierlich aufgezeichnet.
- **Temperatur:**  
Mit dem Thermometer (Voltcraft® Multimeter, Hirschau, Deutschland) konnte die Temperatur des Herzens erfasst werden.



### 3.6 Auswertungsparameter

Folgende Parameter wurden zu den Zeitpunkten T0-T8 (Abbildung 7) während des gesamten Versuchs erfasst.



**Abbildung 7:** Zeitpunkte im Versuchsverlauf.

T0: Zeitpunkt der Spenderblutentnahme; T1: Blutentnahme aus dem Perfusionssystem nach Einfüllen des Perfusats und 5 Minuten Zirkulation; Start Perfusion: Beginn der Reperfusion des Herzens 150 Minuten nach Abklemmen der Aorta ascendens (Ischämiezeit); T2: Blutentnahme 10 Minuten nach Perfusionsstart; Start Working heart: Nach 15 Minuten Wechsel von Perfusion nach Langendorff zu Working-Heart-Perfusion; T3: Blutentnahme 30 Minuten nach Perfusionsstart; T4: 60. Minute; T5: 90. Minute; T6: 120. Minute; T7: 150. Minute; T8: 180. Minute.

- Hämodynamische Parameter

Der Verlauf der Hämodynamik wurde anhand der Messungen T0-T8 beschrieben. Zur statistischen Auswertung wurde der Mittelwert der Zeitpunkte T5-T8 berechnet.

- Herzindex (Cardiac index; CI)

Zur Beurteilung der Herzauswurfleistung wurde der Herzindex bestimmt. Er wurde berechnet, indem der Mittelwert des Aortenflusses pro Minute der Zeitpunkte T5 – T8 durch das ursprüngliche Gewicht des Herzens geteilt wurde.

$$\text{Herzindex} \left( \frac{\text{ml}}{\text{min} \times \text{g}} \right) = \frac{\text{Aortenfluss}}{\text{Minute} \times \text{Gewicht davor (g)}}$$

- Koronarfluss

Der Koronarfluss wurde aus der Differenz der Mittelwerte des Aorten- und Pulmonalarterienflusses der Zeitpunkte T5 - T8 berechnet.

$$\text{Koronarfluss} \left( \frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) = \text{Pulmonalarterienfluss} - \text{Aortenfluss}$$

- Schlagarbeitsindex (Stroke-Work-Index; SWI)

Als Parameter der ventrikulären Auswurfleistung wurde der Schlagarbeitsindex folgendermaßen bestimmt.

$$\text{Schlagarbeitsindex} = \frac{13,6 \times (\text{Mittl. art. Blutdruck} - \text{mittl. Blutdruck linker Vorhof}) \times \text{CI}}{\text{Herzfrequenz}}$$

- Point-of-Care Analyse
  - Laktat

Das Laktat konnte mittels Point-of-Care Analyse zu allen Zeitpunkten im Verlauf bestimmt werden. Es wurde sowohl die Laktatzunahme zwischen den Zeitpunkten T1 und T8 berechnet, als auch der Verlauf der Laktatkurve bestimmt.

$$\text{Laktatzunahme} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right) = \text{Laktat T8} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right) - \text{Laktat T1} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right)$$

- Sauerstoffgehalt und -verbrauch

Anhand der Sauerstoffsättigung (SO<sub>2</sub>), des Hb, des pO<sub>2</sub>, der Hüfner-Zahl (Sauerstoffbindungskapazität: 1,34 ml) und des Löslichkeitskoeffizienten (0,003) konnte der arterielle und koronarvenöse Sauerstoffgehalt der Zeitpunkte T5 - T8 berechnet werden.

$$\text{Sauerstoffgehalt} \left( \frac{\text{ml}}{\text{dl}} \right) = \text{SO}_2 \times \text{Hb} \times 1,34 + 0,003 \times \text{pO}_2$$

Mit dem arteriellen und koronarvenösen Sauerstoffgehalt (C<sub>a</sub>O<sub>2</sub> und C<sub>v</sub>O<sub>2</sub>) wurde im Anschluss die Sauerstoffdifferenz bestimmt. Multiplizierte man die Sauerstoffdifferenz mit dem Koronarfluss erhielt man den Sauerstoffverbrauch.

$$\text{Sauerstoffverbrauch} \left( \frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) = (\text{CaO}_2 - \text{CvO}_2) \times \text{Koronarfluss}$$

### 3.7 Klinische Chemie

Zu den Zeitpunkten T1, T2, T4, T6 und T8 wurden jeweils ein Serum-, zwei Citrat- und ein EDTA-Röhrchen Blut abgenommen. Die Blutproben wurden 15 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert, im Anschluss daran in Aliquots aufgeteilt und im Kühlschrank bei 4°C zwischengelagert. Nach Beenden des Versuchs wurden die Proben bei -80°C eingefroren.



Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Bestimmung aller serologischer Parameter im Institut für Klinische Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München durchgeführt. Zur Beurteilung der myokardialen Schädigung während der Perfusion wurden hierzu die Konzentrationen der Kreatinkinase Isoenzym MB (CK-MB), der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), des Harnstoffs und der Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt.

Schlussendlich wurden die erhaltenen Werte auf den Zeitpunkt T1 und auf das Gewicht normiert, um den Verlauf einheitlich darstellen und beurteilen zu können.

### 3.8 Herzgewicht

Das Herzgewicht wurde sowohl nach Explantation als auch nach Perfusion (nach Zeitpunkt T8) gemessen. Aus diesen Daten ergab sich die prozentuale Gewichtszunahme.

$$\text{Gewichtszunahme(\%)} = \frac{\text{Gewicht danach}(g) - \text{Gewicht davor}(g)}{\text{Gewicht danach}(g)} \times 100$$

### 3.9 Histologie

Nach Perfusionsende wurde das Herzgewebe für die histologische Untersuchung fixiert. Hierzu wurde eine 4%ige neutral gepufferte Formaldehydlösung verwendet. Die anschließenden Färbungen wurden im Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München durchgeführt.

#### 3.9.1 Paraffineinbettung und Schnittpräparation

In einem Entwässerungsautomaten (Histomaster Modell 2050/Di, Bavimed, Birkenau, Deutschland) wurde das gewonnene und fixierte Herzgewebe nach folgendem Protokoll entwässert.

- 0,5 Stunden Spülen des Gewebes mit Aqua dest.
- 2x 1,5 Stunden entwässern mit 70%igem Ethanol
- 2x 1,5 Stunden entwässern mit 96%igem Ethanol
- 2x 1,5 Stunden entwässern mit 100%igem Ethanol
- 2x 0,5 Stunden durchtränken mit Xylol
- 1,5 Stunden durchtränken mit Xylol
- 2 Stunden einbetten mit Paraffin bei 60°C
- 3 Stunden einbetten mit Paraffin bei 60°C

Im Anschluss daran wurde das Gewebe an einer Paraffinausgießstation (TBS 88 Paraffin, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) in Blöcke ausgegossen.

Nach Abkühlen der Paraffinblöcke wurden am Rotationsmikrotom (HM 315, MIKROM International GmbH, Berlin, Deutschland) Gewebeschnitte mit einer Dicke von 4-5 µm erstellt. Letztere wurden in ein 40°C warmes Wasserbad (Daglef Patz KG, Wankendorf, Deutschland) überführt und auf Objektträger aufgezogen. Im Anschluss erfolgte die Trocknung der Präparate bei 37°C für 24 Stunden in einem Trockenschrank (Memmert GmbH&Co KG, Schwabach, Deutschland).

Die Paraffinschnitte wurden vor der Färbung nach folgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert:

- 15 Minuten Entparaffinisierung mit Xylol
- Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%)
- Spülen mit Aqua dest.

### 3.9.2 Immunhistochemie der Paraffinschnitte

Bei der immunhistochemischen Färbung wurden Antikörper-Antigen-Reaktionen genutzt, um IgM-Ablagerungen im Gefäßendothel und die Komplementkomponenten C4d und C5b-9 darzustellen. Außerdem konnte anhand der CD45-Färbung die Leukozytenaktivierung beurteilt werden.

#### 3.9.2.1 C4d Protokoll

- Probe in 10mM Citratpuffer pH 6,0 für 33 Minuten in Mikrowelle bei 700 Watt im Dampftopf erhitzen
- 25 Minuten Abkühlen
- 15 Minuten Blockieren mit 1%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
- 5 Minuten waschen in Tris buffered saline (TBS)
- 30 Minuten blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Normalserum vom Schwein, Verdünnung 1:10
- Inkubation mit Primärantikörper (Tabelle 1)
- 5 Minuten waschen in TBS
- Inkubation mit Sekundärantikörper (Tabelle 2)
- 30 Minuten mit Avidin-Biotin Complex (ABC) (Vector Laboratories Inc, Nr. PK-6100, Burlingame, USA) inkubieren
- 5 Minuten waschen in TBS
- 3 Minuten Inkubation mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Gebrauchslösung
- Spülen mit Leitungswasser
- 15 Sekunden Gegenfärbung mit Hämalaun
- Spülen mit Leitungswasser

- Dehydratation mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%)
- Einlegen in Xylol
- Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent), Sondheim, Nr. 1025, Deutschland)

### 3.9.2.2 C5b-9 Protokoll

- 15 Minuten Blockieren mit 1%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
- 5 Minuten waschen in TBS
- 10 Minuten Inkubation mit Protease K
- 5 Minuten waschen in TBS
- 30 Minuten blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Normalserum (Rabbit), Verdünnung 1:10
- Inkubation mit Primärantikörper (Tabelle 1)
- 5 Minuten waschen in TBS
- Inkubation mit Sekundärantikörper (Tabelle 2)
- 5 Minuten waschen in TBS
- 3 Minuten Inkubation mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Gebrauchslösung
- Spülen mit Leitungswasser
- 30 Sekunden Gegenfärbung mit Hämalaun
- Spülen mit Leitungswasser
- Dehydratation mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%)
- Einlegen in Xylol
- Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent), Sondheim, Nr. 1025, Deutschland)

### 3.9.2.3 IgM Protokoll

- 15 Minuten Blockieren mit 1%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
- 5 Minuten waschen in TBS
- 10 Minuten Inkubation mit Protease K
- 5 Minuten waschen in TBS
- 30 Minuten blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Normalserum vom Schwein, Verdünnung 1:10
- Inkubation mit Primärantikörper (Tabelle 1)
- 5 Minuten waschen in TBS
- Inkubation mit Sekundärantikörper (Tabelle 2)
- 5 Minuten waschen in TBS

- 2 Minuten Inkubation mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Gebrauchslösung
- Spülen mit Leitungswasser
- 15 Sekunden Gegenfärbung mit Hämalaun
- Spülen mit Leitungswasser
- Dehydratation mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%)
- Einlegen in Xylol
- Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent), Sondheim, Nr. 1025, Deutschland)

#### **3.9.2.4 CD45 Protokoll**

- Probe in 10mM Citratpuffer pH 6,0 für 33 Minuten in Mikrowelle bei 700 Watt im Dampftopf erhitzen
- 25 Minuten Abkühlen
- 30 Minuten blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Normalserum, Verdünnung 1:10
- Inkubation mit Primärantikörper (Tabelle 1)
- 5 Minuten waschen in TBS
- Inkubation mit Sekundärantikörper (Tabelle 2)
- 30 Minuten mit Avidin-Biotin Complex (ABC) inkubieren
- 5 Minuten waschen in TBS
- 3 Minuten Inkubation mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Gebrauchslösung
- Spülen mit Leitungswasser
- 15 Sekunden Gegenfärbung mit Hämalaun
- Spülen mit Leitungswasser
- Dehydratation mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%)
- Einlegen in Xylol
- Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent), Sondheim, Nr. 1025, Deutschland)

### **3.9.3 Verwendete Materialien für die immunhistochemischen Färbungen**

#### **3.9.3.1 Lösungen**

- 1%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
  - 6 ml 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (neoLab Nr. 1185, Heidelberg, Deutschland) in 174 ml Aqua dest. lösen

- 0,05 M Tris-Buffered-Saline (TBS) pH 7,6:
  - 121 g Tris-Hydroxymethylaminomethan ultrapure (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in 1900 ml Aqua dest. auflösen
  - 90 g NaCl (neoLab, Heidelberg, Deutschland) auflösen
  - pH-Wert von 7,6 mit 25%iger HCl Lösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) einstellen
  - Auffüllen mit 2000 ml Aqua dest.
  - Überprüfen pH-Werts
- DAB-Gebrauchslösung
  - Auflösung einer 10 mg Diaminobenzidintetrahydrochlorid-dihydrat-Tablette (Biotrend Nr 4170, Köln, Deutschland) in 10 ml Aqua dest. im Dunkeln. Anschließend filtrieren
  - Pro ml DAB-Lösung 1 µl 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (neoLab Nr. 1185, Heidelberg, Deutschland) hinzugeben
- 0,01 M Citratpuffer pH 6,0
  - Auflösung von 4,2 g Citrat-Monohydrat ((neoLab Nr. 4345, Heidelberg, Deutschland) in 2000 ml Aqua dest. und Titration mit 2 N NaOH (neoLab Nr. 5630, Heidelberg, Deutschland) auf pH-Wert von 6,0

### 3.9.3.2 Primärantikörper

*Tabelle 1: Primärantikörper nach IHC-Protokoll*

Antigen	Primärantikörper	Verdünnung	Zeit
<b>C4d</b>	Polyclonal Rabbit Anti-Human C4d Antibody (1132588) EMELCA Bioscience, Clinge, Niederlande	1:50	Über Nacht Bei 4°C
<b>C5b-9</b>	Monoclonal Mouse Anti-Human C5b-9 (ab66768) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:200	60 Minuten
<b>IgM</b>	Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM (A0425) DAKO Agilent Technologies, Santa Clara, USA	1:10	60 Minuten
<b>CD45</b>	Polyclonal Rabbit Anti-Human CD45 Antibody (ab10558) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:40	60 Minuten

### 3.9.3.3 Sekundärantikörper

*Tabelle 2: Sekundärantikörper nach IHC-Protokoll*

<b>Antigen</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Zeit</b>
<b>C4d</b>	Swine Anti-Rabbit Biotin IgG EMELCA Bioscience, Clinge, Niederlande	1:200	Über Nacht Bei 4°C
<b>C5b-9</b>	Rabbit Anti-Mouse Ig PO Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:100	60 Minuten
<b>IgM</b>	Swine Anti-Rabbit Ig PO DAKO Agilent Technologies, Santa Clara, USA	1:100	60 Minuten
<b>CD45</b>	Swine Anti-Rabbit biotinylated Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:200	60 Minuten

### 3.9.3.4 Negativkontrollen

*Tabelle 3: Negativkontrollen*

<b>Antigen</b>	<b>Negativkontrolle</b>
<b>C4d</b>	Rabbit Anti-E.coli EMELCA Bioscience, Clinge, Niederlande
<b>C5b-9</b>	Anti-Mouse IgG Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
<b>IgM</b>	Rabbit Anti-E.coli DAKO Agilent Technologies, Santa Clara, USA
<b>CD45</b>	Rabbit Anti-E.coli Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

### 3.9.3.5 Positivkontrolle

*Tabelle 4: Positivkontrollen*

Antigen	Positivkontrolle
C4d	Schweineniere
C5b-9	Schweineniere
IgM	Rattenherz
CD45	Humane Tonsille, Rattenlymphknoten

### 3.9.4 Histologische Untersuchung

Die Auswertung der Präparate wurde verblindet von zwei Personen durchgeführt. Die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen wurden semiquantitativ bewertet. Für die lichtmikroskopische Beurteilung der CD45-Schnitte wurden pro Präparat in 10 Gesichtsfeldern bei zehnfacher Vergrößerung die angefärbten Leukozyten gezählt. Um die IgM-, C4d- und C5b-9-Präparate auszuwerten, wurde jeweils das gesamte Präparat in zwanzigfacher Vergrößerung beurteilt und eine Bewertung zwischen 0 und 3 vergeben. Letztere wurde wie folgt definiert:

*Tabelle 5: Wertungssystem der histologischen Untersuchung*

0	Keine Anfärbung
1	Vereinzelte Gesichtsfelder, lediglich leichte Anfärbung
2	Mehrere große Gefäße in mehreren Gesichtsfeldern, jedoch nicht dominierende Anfärbung
3	Dominierende über das ganze Präparat verteilte Anfärbung

## 3.10 Statistik

Für die statistische Analyse der erhobenen Daten wurden die Ergebnisse zunächst auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und ähnliche Varianzen (Levene-Test) geprüft (Sigmaplot®, Systat Software Inc., San Jose, Californien USA). Die anschließende Auswertung erfolgte anhand eines ungepaarten t-Tests zum Vergleich der autolog und xenogen perfundierten Gruppen. Der Vergleich der xenogen perfundierten Gruppen erfolgte mit einem gepaarten t-Test, da die Herzen der beiden Gruppen paarweise mit dem Blut desselben Spenders perfundiert wurden (Prism 6 GraphPad Software, Inc for Mac OS X, La Jolla, California USA). Angegeben wurden jeweils die Mittelwerte  $\pm$

SEM (standard error of the mean). Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen wurden als signifikant angesehen, wenn  $p < 0,05$  war.



## 4 Ergebnisse

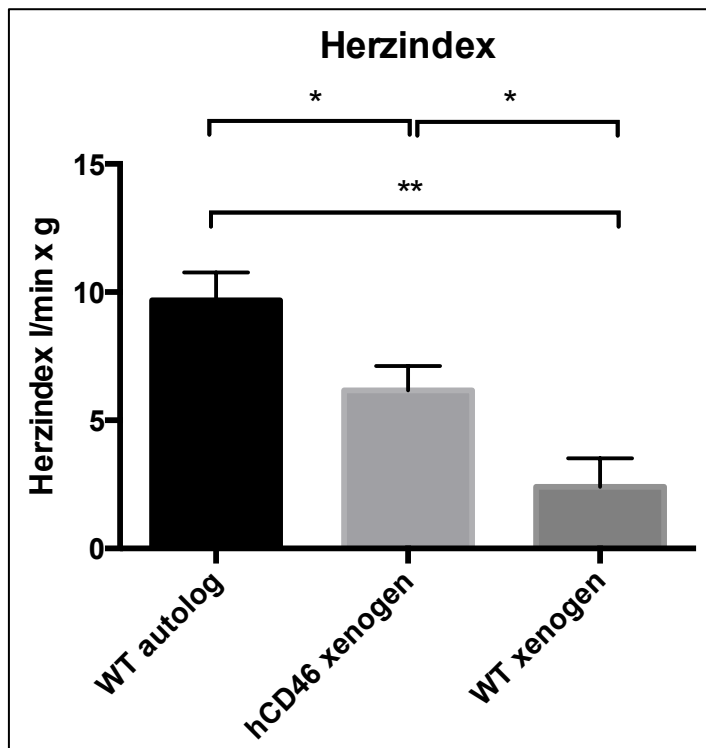
### 4.1 Hämodynamik

#### 4.1.1 Herzindex

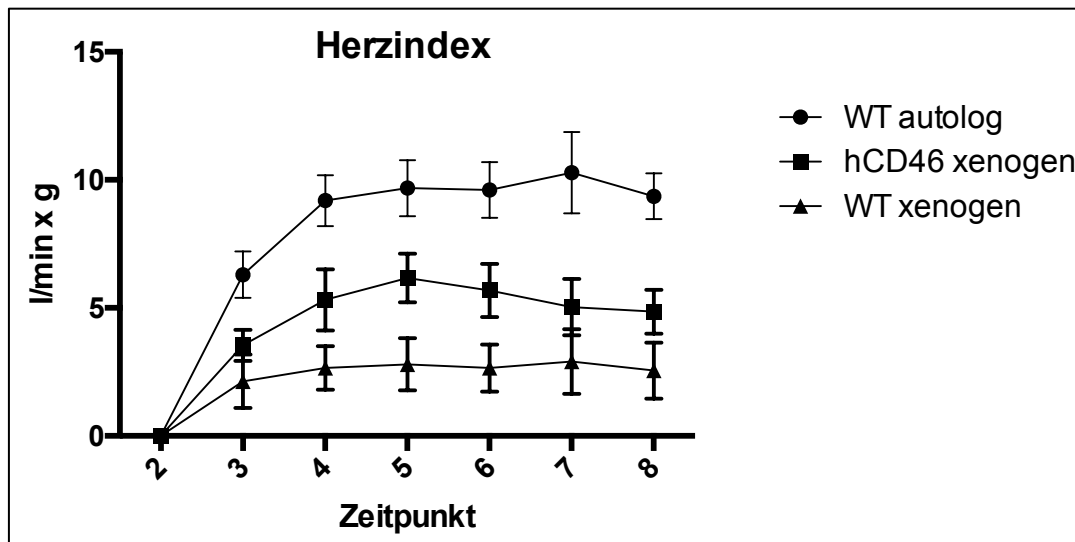
Im Verlauf stieg der Herzindex in allen Gruppen an und erreichte anschließend ab Zeitpunkt T5 (90. Minute) eine Plateauphase (Abbildung 10).

Der Herzindex war mit einem Mittelwert von  $9,68 \pm 1,10$  ml/min\*g in der autologen WT-Gruppe (n=5) am höchsten. In der xenogenen hCD46-Gruppe (n=6) war der Herzindex niedriger und es wurde ein Mittelwert von  $6,17 \pm 0,95$  ml/min\*g gemessen. In der xenogenen WT-Gruppe (n=6) lag der Herzindex unter den anderen Gruppen mit einem Mittelwert von  $2,4 \pm 1,12$  ml/min\*g (Abbildung 9).

Der Unterschied zwischen den drei Gruppen war jeweils signifikant (Abbildung 9).



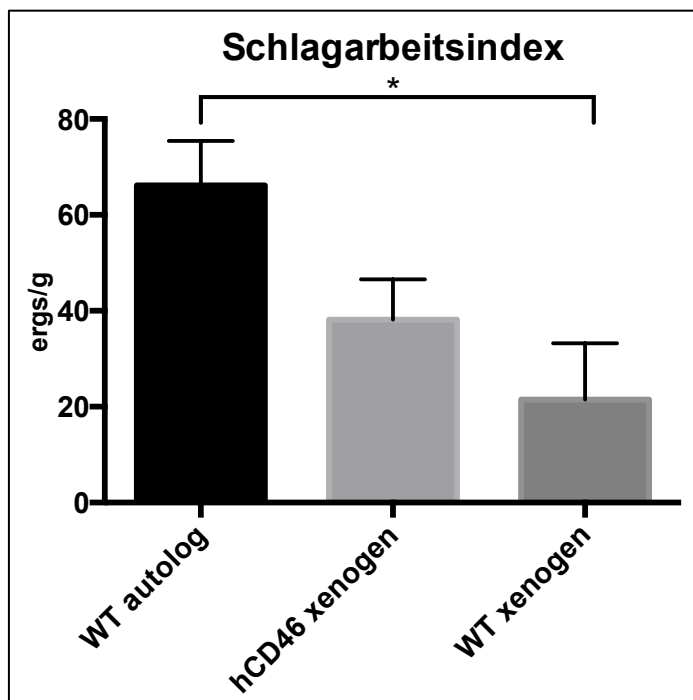
**Abbildung 8:** Mittelwerte der Herzindices in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \*  $p_{WT\ autolog-hCD46} = 0,04$ , \*\*  $p_{WT\ autolog-WT\ xenogen} = 0,001$ , \*  $p_{WT\ xenogen-hCD46} = 0,04$



**Abbildung 9:** Verlauf des Herzindex in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe (keine statistische Auswertung)

#### 4.1.2 Schlagarbeitsindex (SWI)

Der höchste Schlagarbeitsindex zeigte sich in der autologen WT-Gruppe mit einem mittleren Schlagarbeitsindex von  $66,17 \pm 9,26$  ergs/g (n=5). In der xenogenen hCD46-Gruppe fand sich ein SWI von  $38,17 \pm 8,39$  ergs/g (n=6) und in der autologen WT-Gruppe ein SWI von  $21,49 \pm 11,73$  (n=6). Der Unterschied zwischen autologer und xenogener WT-Gruppe war signifikant ( $p= 0,02$ ) (Abbildung 11).



**Abbildung 10:** Mittelwerte des Schlagarbeitsindex in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \*  $p=0,02$

#### 4.1.3 Koronarfluss

Ähnlich zum Verlauf des Herzindexes konnte initial während der Langendorffperfusion, ohne Schlagarbeit des Herzens ein Abfall der Koronarperfusion gesehen werden. Im Anschluss zeigte sich in der autologen WT- sowie in der xenogenen hCD46-Gruppe ein kontinuierlicher Anstieg der Koronarperfusion, während die Kurve der xenogenen WT-Gruppe tendenziell nach einem kurzen Anstieg wieder abflachte und eine Plateauphase erreichte (Abbildung 13).

In der autologen WT-Gruppe (n=5) war der Koronarfluss am höchsten und betrug im Mittelwert  $411,8 \pm 82,4$  ml/min. In der xenogenen hCD46-Gruppe (n=6) lag der Mittelwert bei  $379,2 \pm 69,6$  ml/min und in der xenogenen WT-Gruppe (n=6) war er am niedrigsten bei  $200,5 \pm 82,7$  ml/min (Abbildung 12).

Autologe WT- und xenogene hCD46-Gruppe zeigten nur einen geringen Unterschied. Im Vergleich zu letzterer zeigte der mittlere Koronarfluss in der xenogenen WT-Gruppe eine Tendenz zu einem niedrigeren jedoch nicht-signifikant unterschiedlichen Mittelwert.

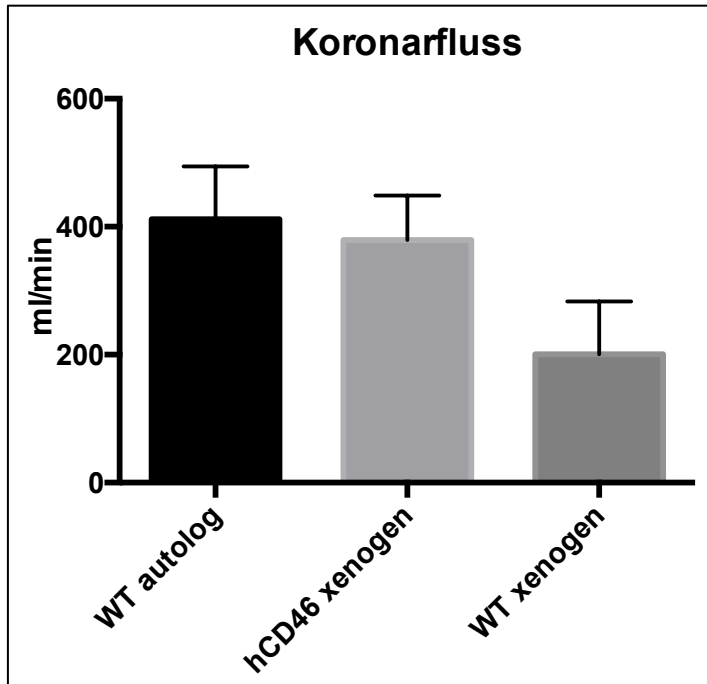


Abbildung 11: Mittelwerte des Koronarflusses in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe

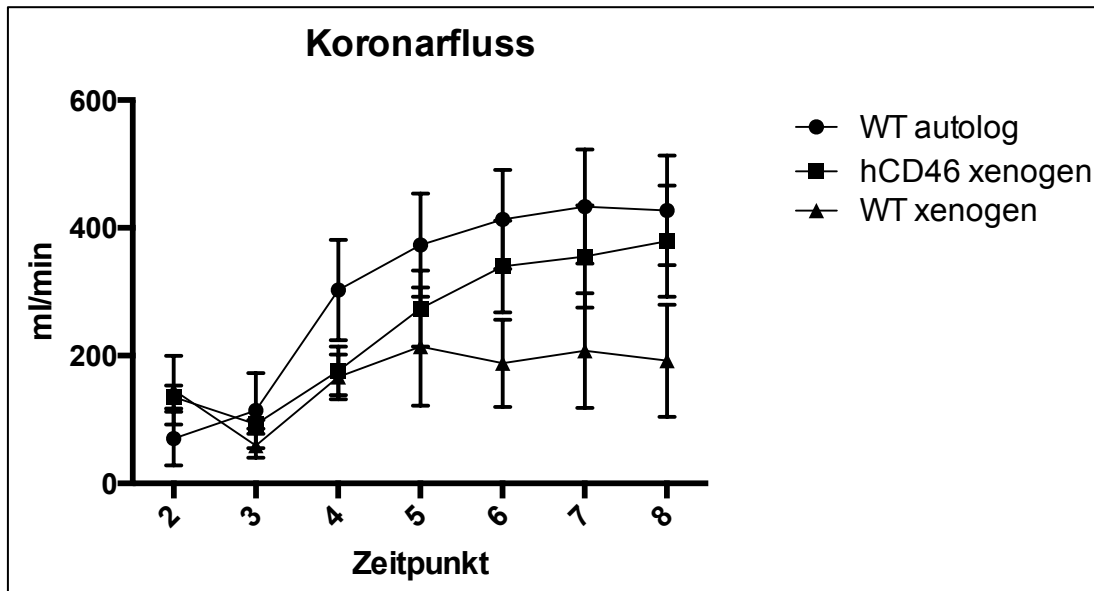


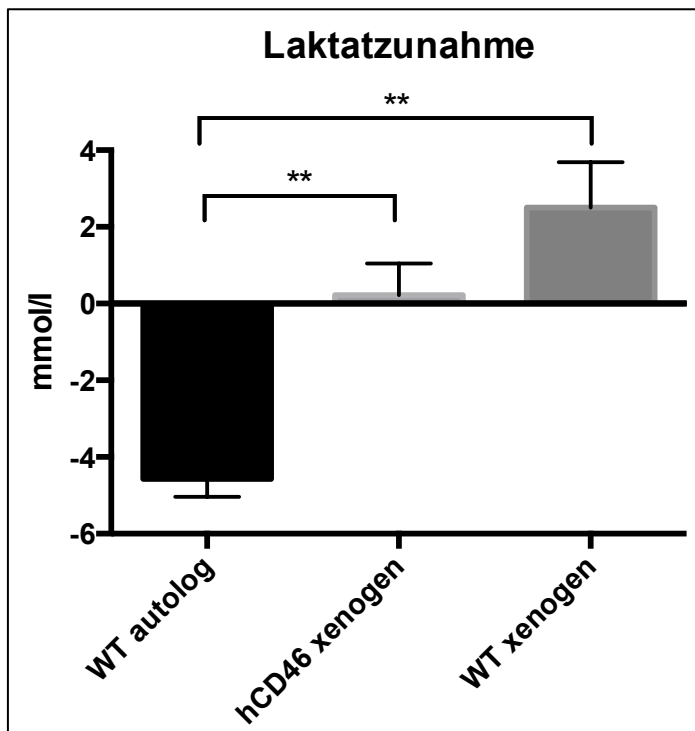
Abbildung 12: Verlauf des Koronarflusses in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe

## 4.2 Point-of-Care Analyse

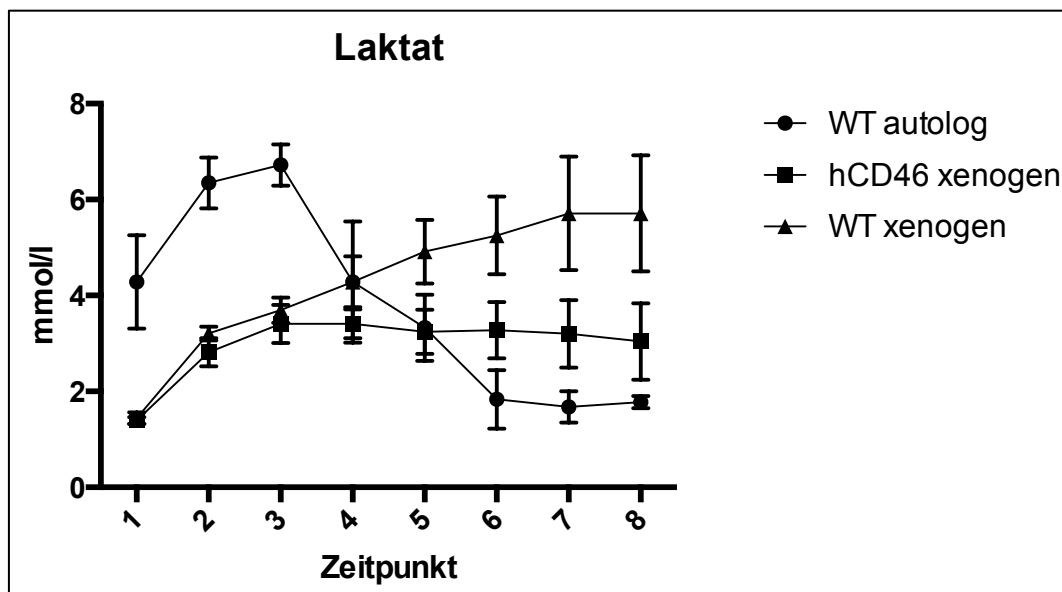
### 4.2.1 Laktat

In der autologen WT-Gruppe konnte nach einer initialen Zunahme des Laktats (Abbildung 17) eine deutliche Abnahme ab T3 beobachtet werden, so dass zwischen T1 und T8 ein Unterschied von insgesamt  $-4,79 \pm 0,46$  mmol/l registriert wurde (Abbildung 16). In der xenogenen hCD46-Gruppe (n=6) stieg das Laktat zwischen T1 und T8 um  $0,22 \pm 0,83$  mmol/l an. Der Kurvenverlauf zeigte analog zur autologen WT-Gruppe einen initialen Anstieg, jedoch gefolgt von einer Plateauphase mit erst anschließendem Abfall der Laktatkonzentration (Abbildung 17). In der xenogenen-WT Gruppe (n=6) zeigte der Verlauf einen kontinuierlichen Anstieg der Laktatkonzentration (Abbildung 17). Der Mittelwert der Laktatzunahme zwischen T1 und T8 lag bei  $2,92 \pm 1,18$  mmol/l.

Der Unterschied der Laktatzunahme zwischen autologer WT- und xenogener hCD46-Gruppe war signifikant ( $p=0,006$ ), ebenso zwischen autologer und xenogener WT-Gruppe ( $p=0,005$ ). Xenogene hCD46- und xenogene WT-Gruppe unterschieden sich trotz unterschiedlicher Tendenz im Kurvenverlauf nicht signifikant (Abbildung 16).



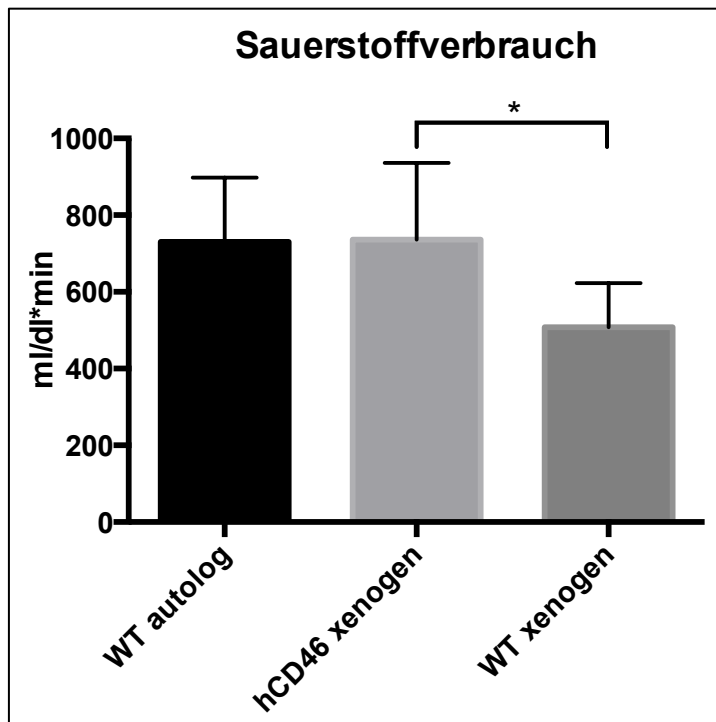
**Abbildung 13:** Mittelwerte der Laktatkonzentrationszunahme (zwischen T0 und T8) in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \*\*  $p_{WT\ autolog-hCD46} = 0,006$ , \*\*  $p_{WT\ autolog-WT\ xenogen} = 0,005$



**Abbildung 14:** Verlauf des Laktats in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe

#### 4.2.2 Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch ( $VO_2$ ) zu den Zeitpunkten T5-T8 (Abbildung 7) zeigte sich in der xenogenen WT-Gruppe mit durchschnittlich  $508 \pm 115$  ml/dl\*min  $O_2$  am niedrigsten (n=6). In der autologen WT-Gruppe betrug der Sauerstoffverbrauch  $730 \pm 167$  ml/dl\*min (n=5) und in der hCD46-Gruppe  $736 \pm 200$  ml/dl\*min (n=6) (Abbildung 18). Zwischen autologer WT- und xenogener hCD46-Gruppe konnte also nur ein geringer Unterschied festgestellt werden, während hCD46- und xenogene WT-Gruppe sich signifikant unterschieden ( $p=0,047$ ).

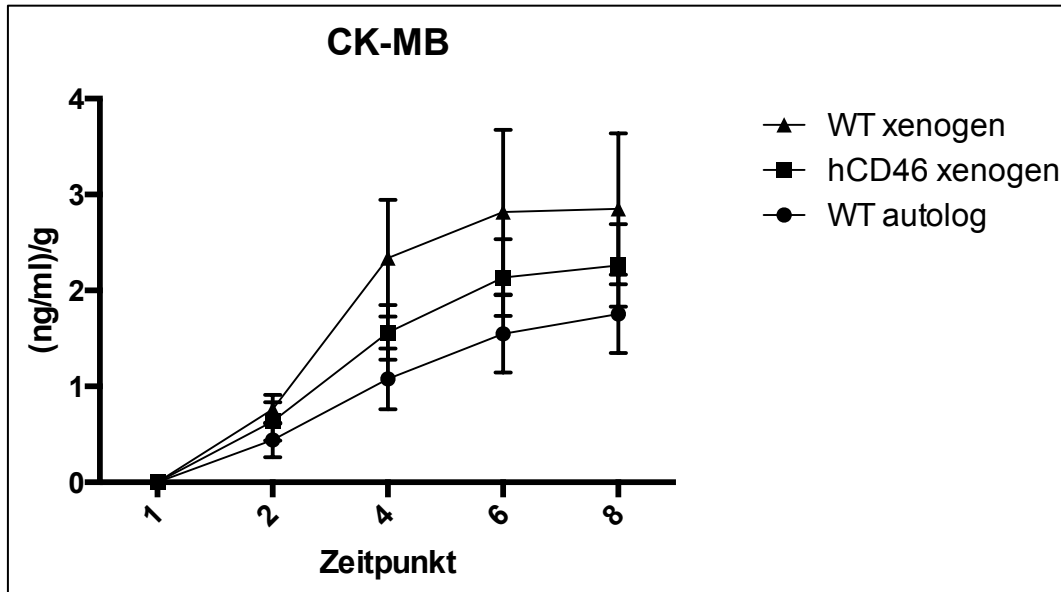


**Abbildung 15:** Mittelwerte des Sauerstoffverbrauchs in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \*  $p=0,047$

## 4.3 Serologie

### 4.3.1 Kreatinkinase Isoenzym MB

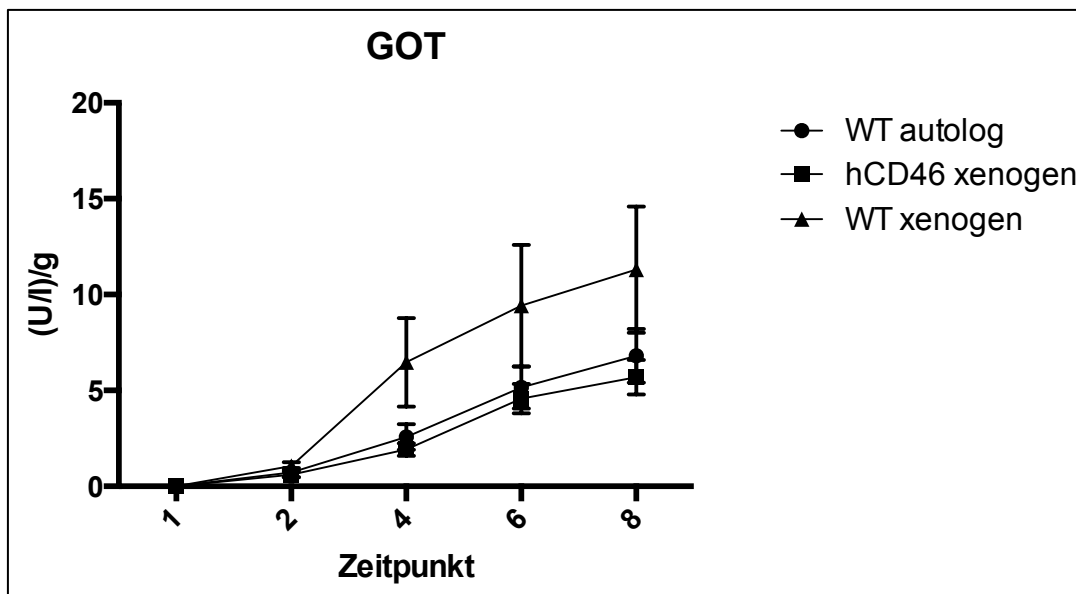
Insgesamt zeigten alle drei Gruppen einen ähnlichen Verlauf mit kontinuierlichem Anstieg und leichter Plateaubildung zwischen T6 und T8 (Abbildung 20). Die xenogene WT-Gruppe zeigte jedoch ab T2 einen steileren Anstieg als die beiden anderen Gruppen. Hier wurden außerdem die höchsten CK-MB-Werte gemessen. Die xenogene hCD46-Gruppe stieg ebenfalls etwas steiler an als die autologe WT-Gruppe. Innerhalb der Gruppen waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 16:** Verlauf der CK-MB in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe

#### 4.3.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Ähnlich wie bei der CK-MB kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der GOT-Konzentration in allen drei Gruppen, welcher sich nicht signifikant unterscheidet. Die höchsten Serumkonzentrationen wurden in der xenogenen WT-Gruppe gemessen. Hier verläuft die Kurve nach T2 steiler als in der xenogenen hCD46- und autologen WT-Gruppe. Xenogene hCD46- und autologe WT-Gruppe zeigen beide einen flacheren Kurvenverlauf.

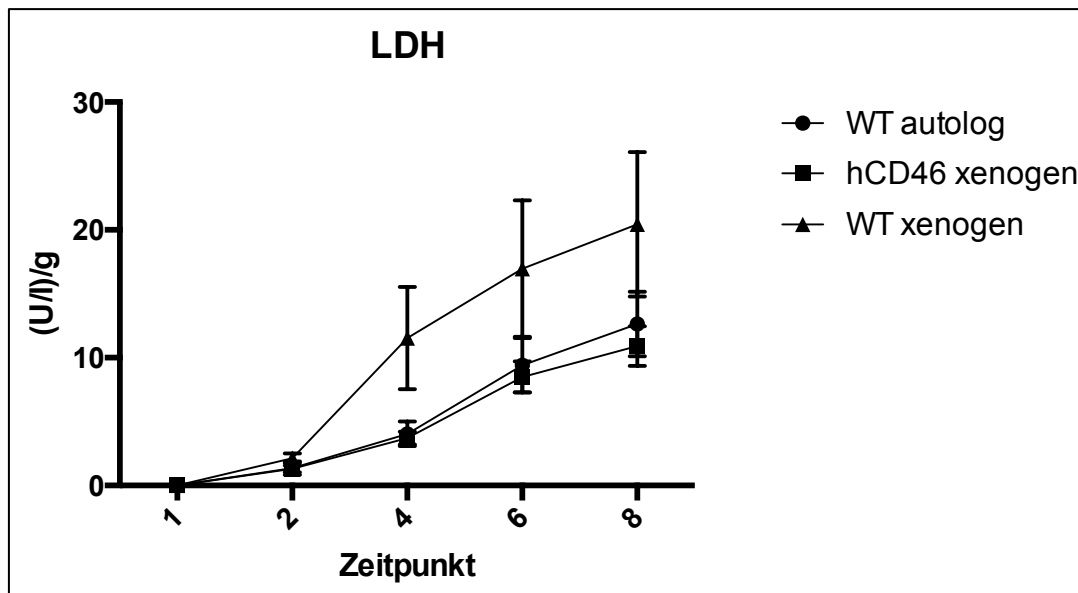


**Abbildung 17:** Verlauf der GOT in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe



### 4.3.3 Laktatdehydrogenase (LDH)

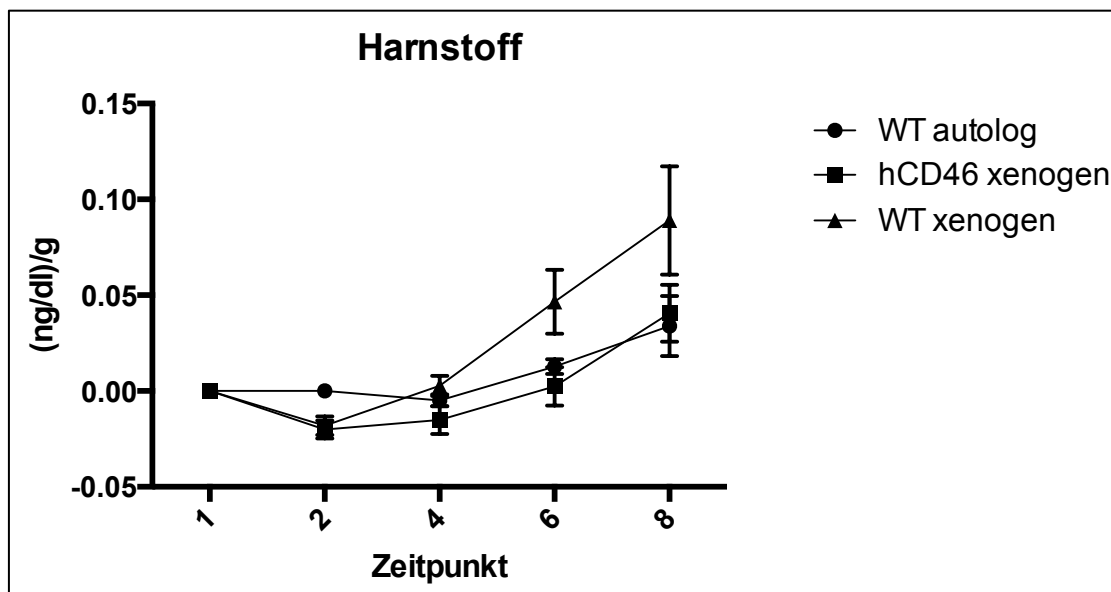
Die Kurven verlaufen analog zu den restlichen Herzenzymen wie beispielsweise der GOT. Auch hier sieht man einen kontinuierlichen Anstieg der LDH-Konzentration, wobei ebenfalls die xenogene WT-Gruppe den steilsten Verlauf mit den am höchsten gemessenen LDH-Werten zeigt. hCD46- und autologe WT-Gruppe verlaufen flacher und eng beieinander.



**Abbildung 18:** Verlauf der LDH in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe

### 4.3.4 Harnstoff

Auch der Kurvenverlauf des Harnstoffs ähnelt dem der zuvor beschriebenen Herzenzyme. Lediglich die Kurve der autologen WT-Gruppe verläuft flacher als die restlichen beiden. Letztere fallen außerdem zunächst bis T2 etwas ab und steigen erst im Anschluss kontinuierlich an. Die höchsten Harnstoffwerte wurden auch hier in der xenogenen WT-Gruppe gemessen. Ab dem Zeitpunkt T2 liegt die Konzentration der xenogenen hCD46-Gruppe zunächst unter der autologen WT-Gruppe. Vor T8 kreuzen sich die Kurven jedoch und die xenogene hCD46-Gruppe endet zum Zeitpunkt T8 mit einer höheren Harnstoffkonzentration als die autologe WT-Gruppe.

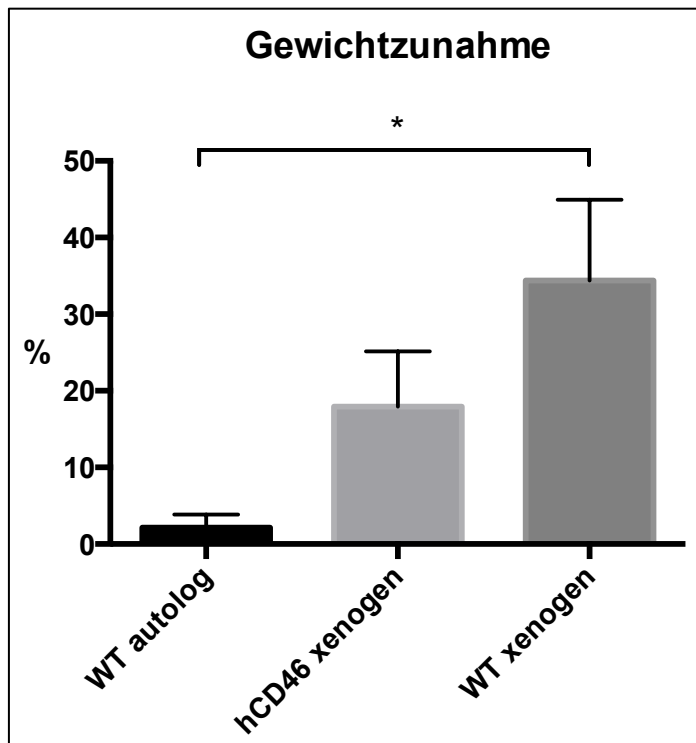


**Abbildung 19:** Verlauf des Harnstoffs in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe

#### 4.4 Herzgewicht

Die prozentual größte Zunahme des Herzgewichts zeigte sich in der xenogenen WT Gruppe (n=6) mit durchschnittlich  $34,38 \pm 10,54$  %. In der hCD46 xenogenen Gruppe (n=6) konnte eine Gewichtszunahme von  $17,95 \pm 7,19$  % beobachtet werden. Die prozentual geringste Gewichtszunahme wurde in der autologen WT-Gruppe (n=5) mit  $2,16 \pm 1,69$  % gesehen (Abbildung 8).

Zwischen autologer WT- und xenogener WT-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,02$ ), während der Unterschied zwischen der autologen WT- und xenogenen hCD46-Gruppe sowie zwischen xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe nicht signifikant war.

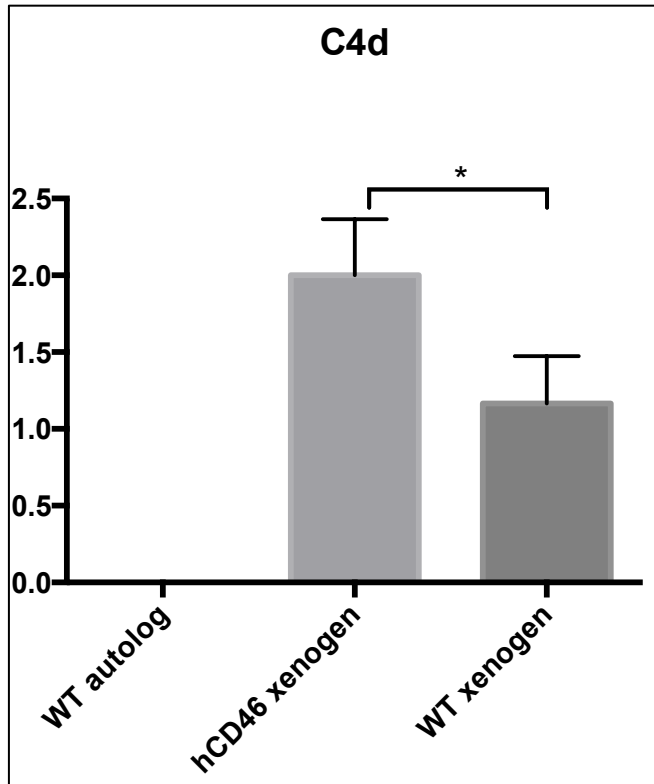


**Abbildung 20:** Mittelwerte der prozentualen Gewichtszunahme in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \*  $p = 0,02$

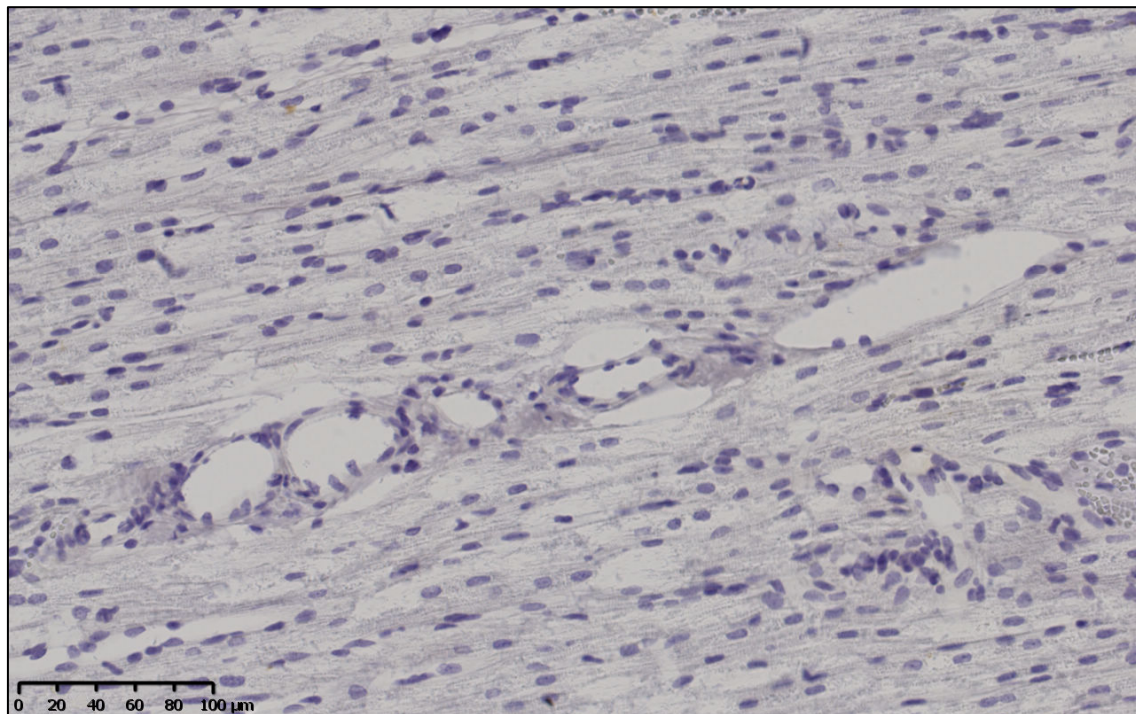
## 4.5 Immunhistochemie

### 4.5.1 C4d

Die meisten Ablagerungen von C4d konnten in der xenogenen hCD46-Gruppe beobachtet werden ( $2 \pm 0,37$ ) (Abbildungen 24 und 26), während in der xenogenen-WT Gruppe signifikant weniger C4d-Ablagerungen in der histologischen Untersuchung gesehen wurden ( $1,17 \pm 0,31$ ) (Abbildungen 24 und 27). In der autologen WT-Gruppe wurden in keinem der Präparate C4d-Ablagerungen gesehen, da der verwendete Antikörper porcines Komplement nicht bindet (Abbildungen 24 und 25).

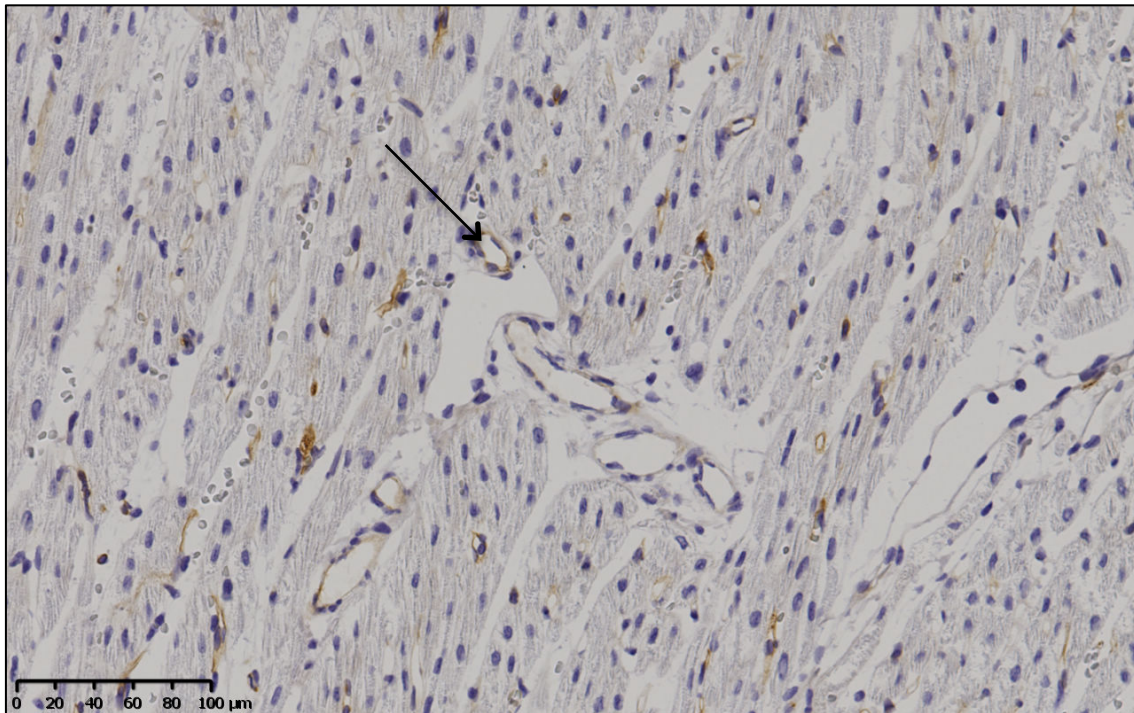


**Abbildung 21:** Semiquantitative Auswertung der C4d-Ablagerung in xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \*  $p=0,04$



**Abbildung 22:** Autologes WT-Präparat nach C4d-Färbung in 20-facher Vergrößerung.

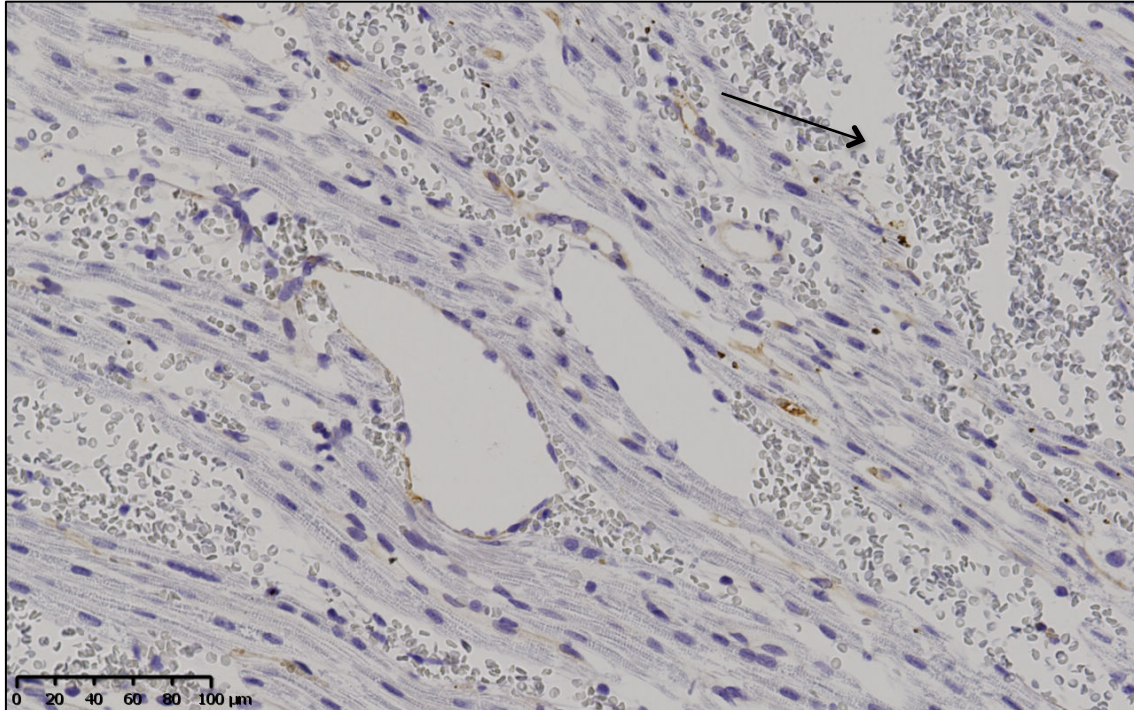
*Dieser Ausschnitt zeigt Kardiomyozyten eines autolog perfundierten WT-Herzens. Die Struktur des Muskelgewebes ist erhalten und die Zellkerne sind mittelständig.*



**Abbildung 23:** *Xenogenes hCD46-Präparat nach C4d-Färbung in 20-facher Vergrößerung.*

*Dieser Abschnitt zeigt ein xenogen perfundiertes hCD46 Präparat. Die Muskulatur erscheint etwas aufgelockerter im Vergleich zum autolog perfundierten Gewebeschnitt in Abbildung 22. Der Pfeil zeigt auf C4d-Ablagerungen im Endothel eines kleinen Gefäßes.*



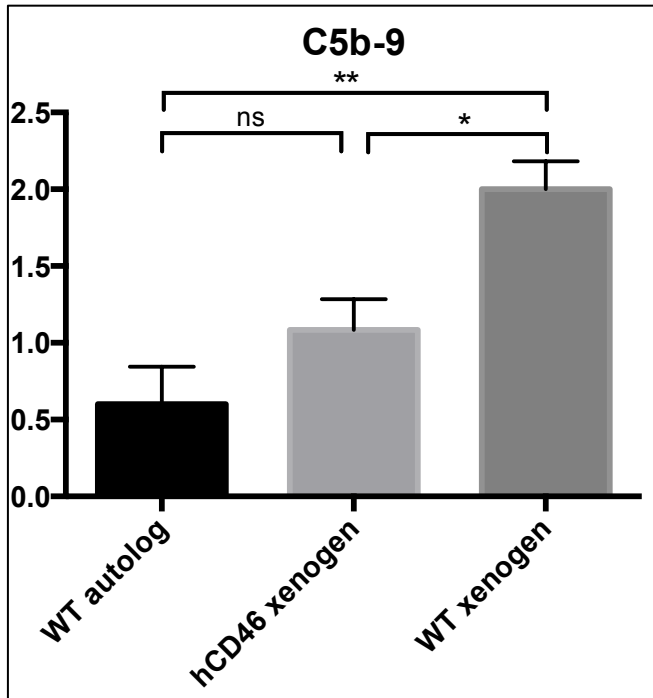


**Abbildung 24:** Xenogenes WT-Präparat nach C4d-Färbung in 20-facher Vergrößerung.

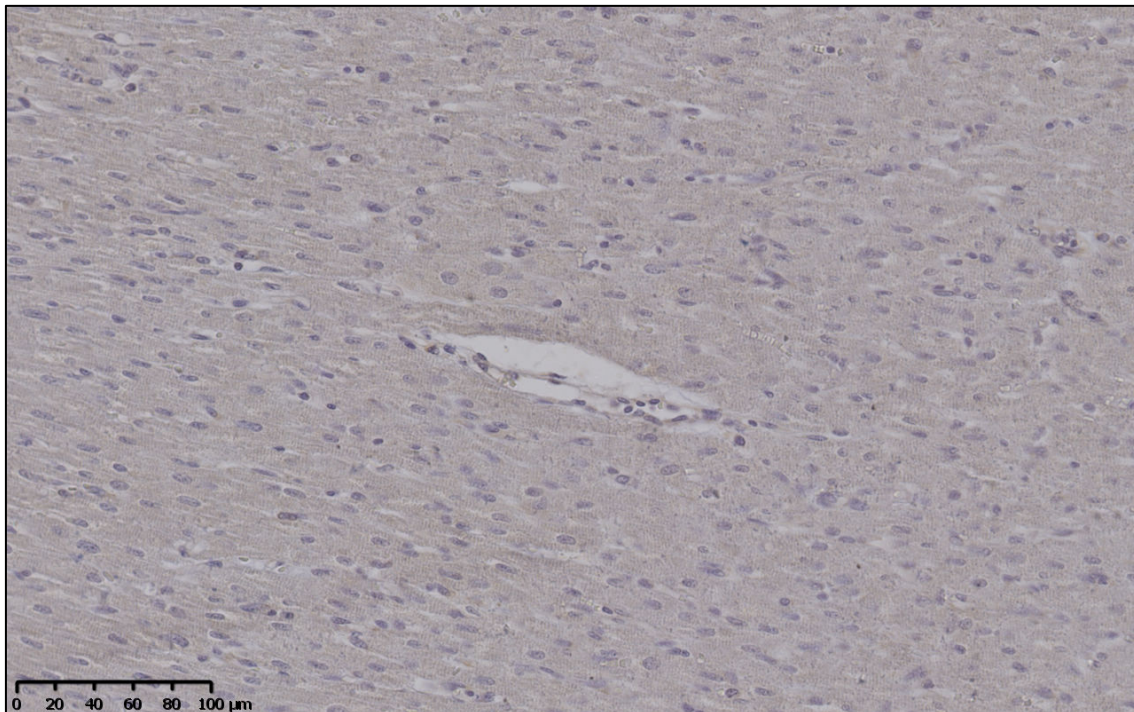
Diese Abbildung zeigt xenogen perfundiertes WT-Gewebe. Man sieht eine deutlich aufgelockerte Struktur der Muskulatur, sowie Hämorrhagie und Ödembildung. (Pfeil) Allerdings fällt die C4d-Ablagerung geringer aus, als in Abbildung 23.

#### 4.5.2 C5b-9

In der xenogenen WT-Gruppe konnten am meisten C5b-9-Ablagerungen beobachtet werden ( $2 \pm 0,18$ ; Abbildungen 28 und 31). Signifikant weniger waren es in der xenogen perfundierten hCD46-Gruppe ( $1,08 \pm 0,2$ ; Abbildungen 28 und 30). Am wenigsten Anfärbungen wurden in der autologen WT-Gruppe gesehen ( $0,6 \pm 0,25$ ; Abbildung 28 und 29) und der Unterschied zwischen xenogener hCD46- und autologer WT-Gruppe war nicht signifikant.

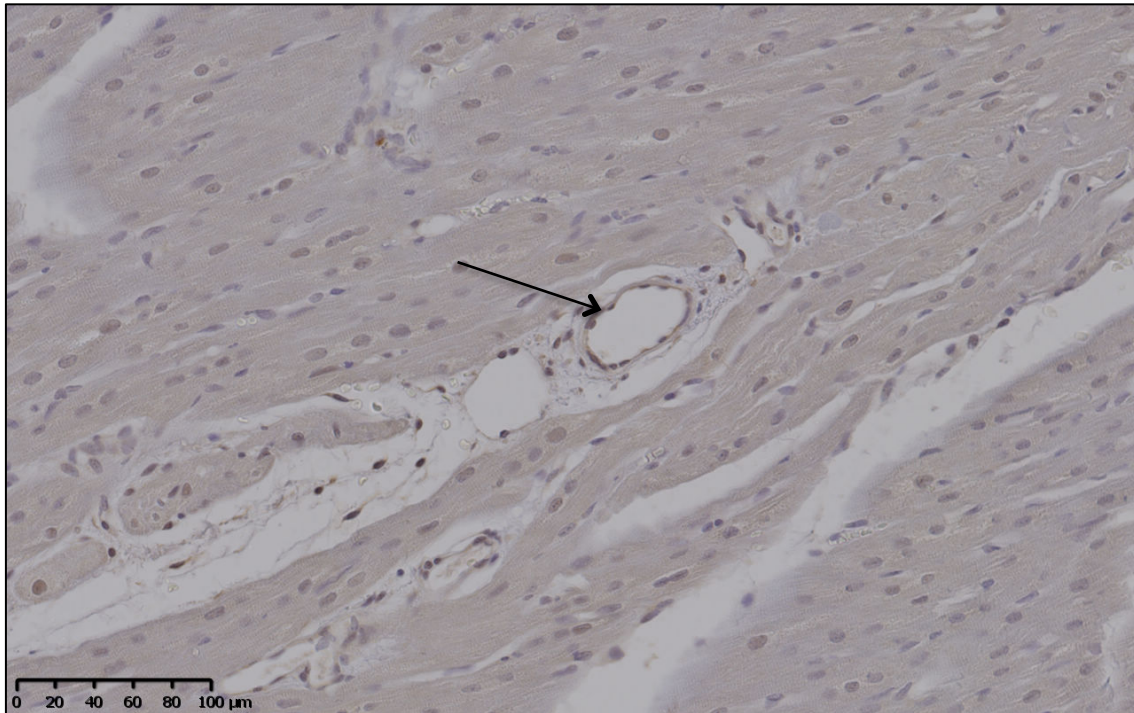


**Abbildung 25:** Mittelwerte der C5b-9-Ablagerung in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \*  $p=0,0197$ , \*\*  $p=0,0012$



**Abbildung 26:** Autologes WT-Präparat nach C5b-9-Färbung in 20-facher Vergrößerung.

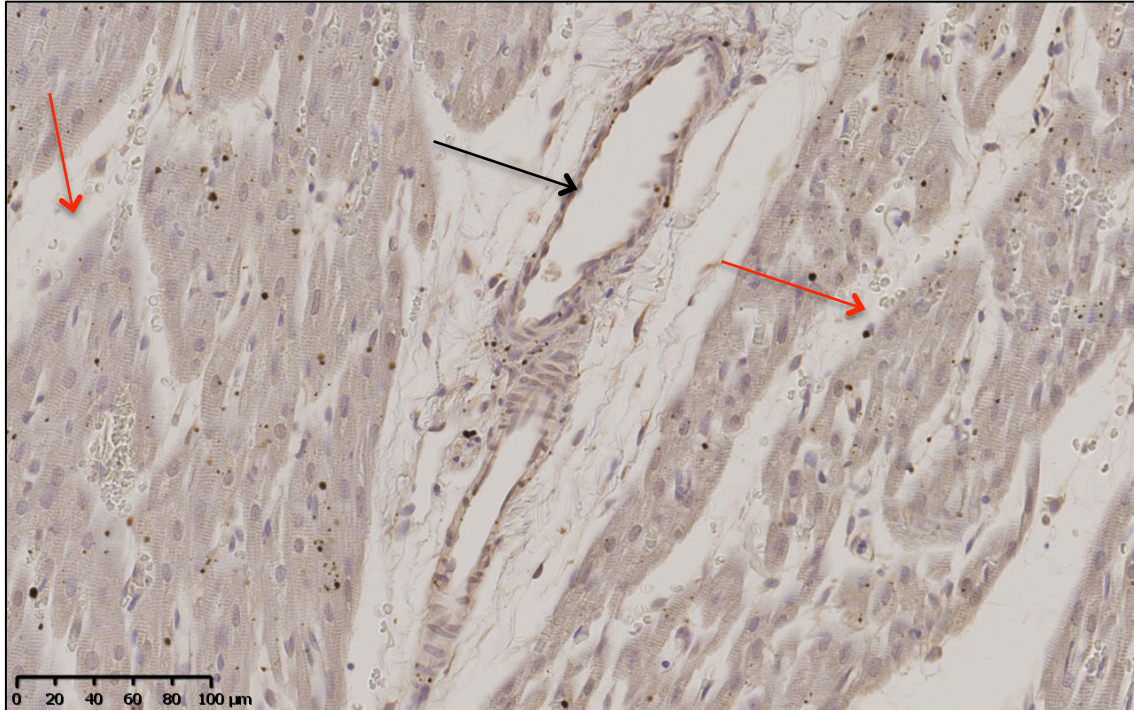
Die Kardiomyozyten dieses autolog perfundierten WT-Herzens sind intakt mit mittelständigen Zellkernen. In diesem Ausschnitt sind weder Ödem oder Hämorrhagien noch C5b-9-Ablagerungen in den Gefäßen zu erkennen.



**Abbildung 27:** Xenogenes hCD46-Präparat nach C5b-9-Färbung in 20-facher Vergrößerung.

Im Gegensatz zum autologen WT-Präparat (Abbildung 26) sieht man in diesem xenogen perfundierten hCD46 transgenen Gewebe eine leichte Auflockerung der muskulären Struktur. In einem Gefäß sieht man C5b-9-Ablagerungen (Pfeil).



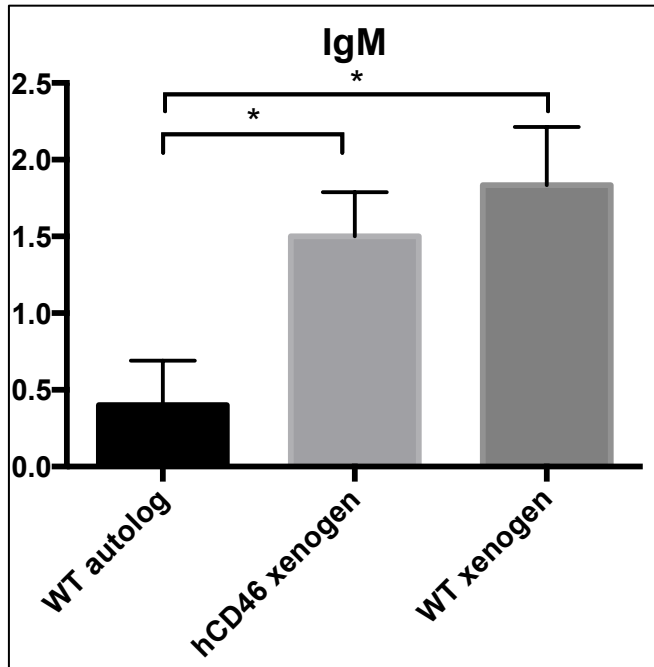


**Abbildung 28:** Xenogenes WT-Präparat nach C5b-9-Färbung in 20-facher Vergrößerung.

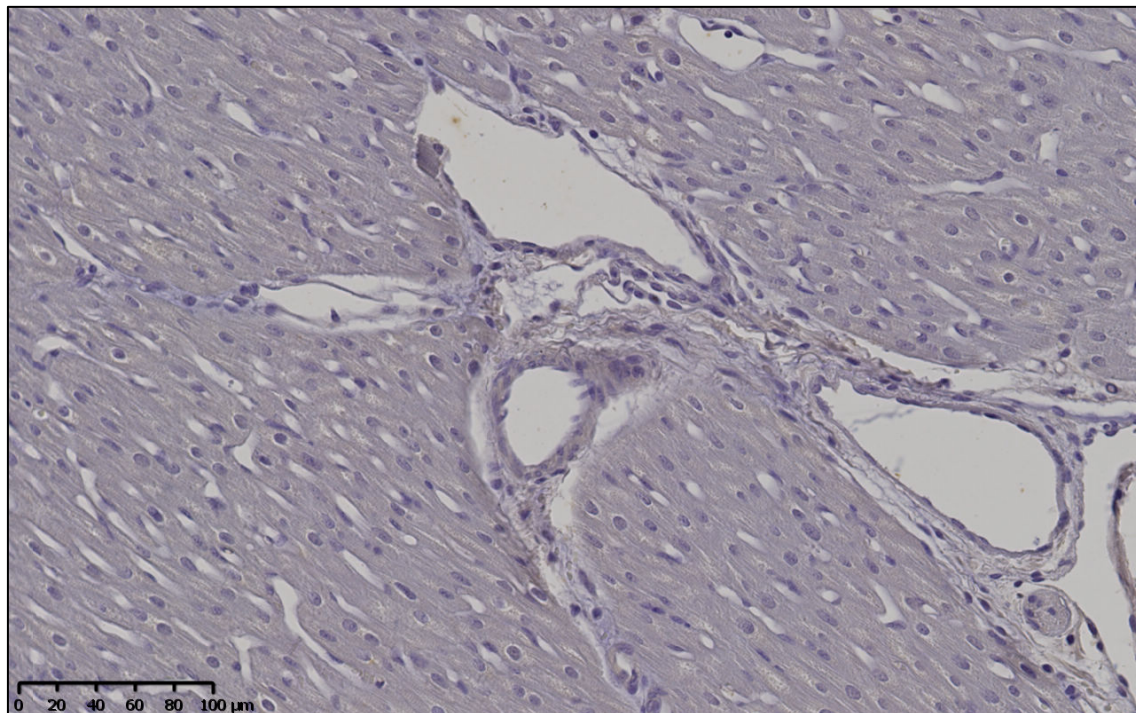
*In diesem Präparat fällt eine deutliche Auflockerung der muskulären Struktur durch Ödembildung und Hämorrhagie auf (rote Pfeile). In dem größeren Gefäß (schwarzer Pfeil) sieht man eine deutliche Ablagerung der C5b-9-Färbung.*

### 4.5.3 IgM

Am meisten IgM-Einlagerungen wurden in der xenogen perfundierten WT-Gruppe beobachtet ( $1,83 \pm 0,38$ ; Abbildung 34). Nicht signifikant weniger Einlagerungen fanden sich in der xenogen perfundierten hCD46-Gruppe ( $1,5 \pm 0,29$ ; Abbildung 33). Im Gegensatz dazu zeigten sich in der autologen WT-Gruppe signifikant weniger IgM-Ablagerungen in den Präparaten ( $0,4 \pm 0,29$ ; Abbildung 32).



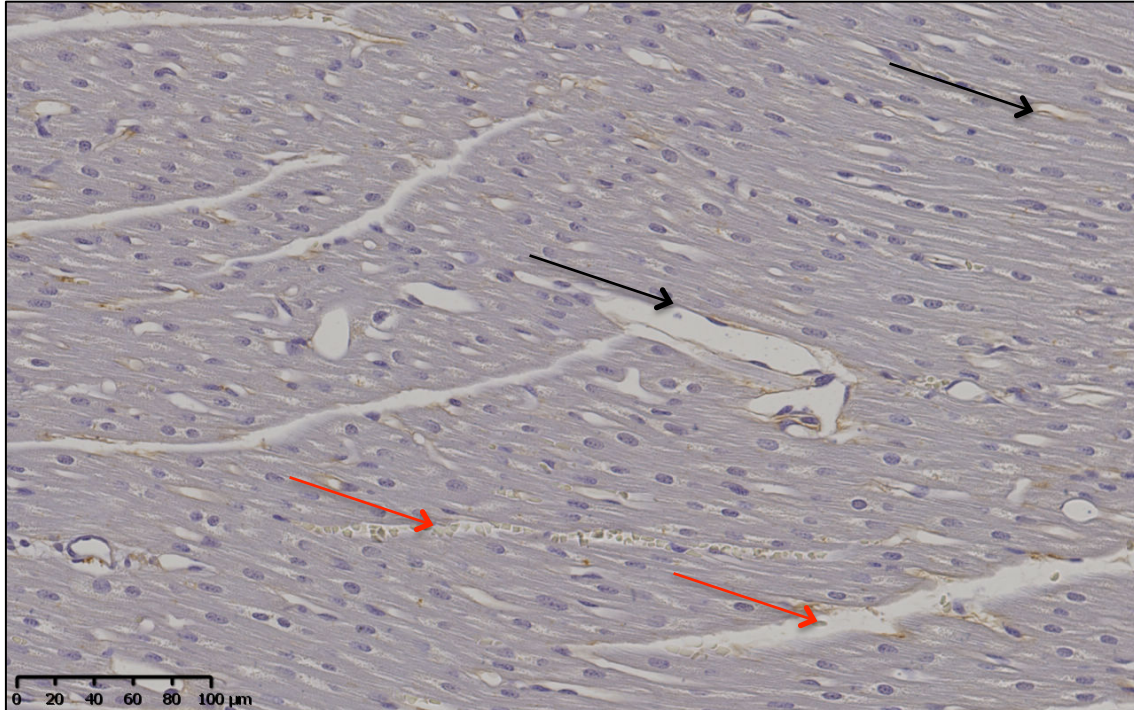
**Abbildung 29:** Mittelwerte der IgM-Ablagerung in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; Gruppe; \*  $p_{WT\ autolog - WT\ xenogen} = 0,0179$ , \*  $p_{WT\ autolog - hCD46} = 0,026$



**Abbildung 30:** Autologes WT-Präparat nach IgM-Färbung in 20-facher Vergrößerung.

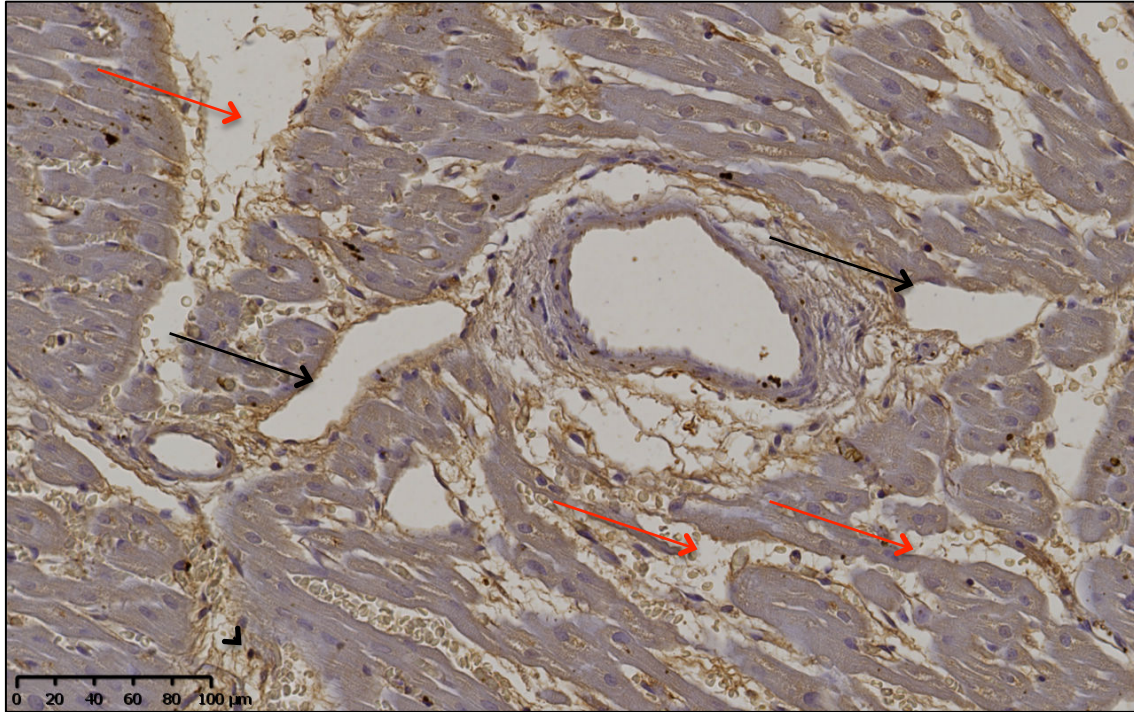
Die kardiomuskuläre Struktur dieses autolog perfundierten WT-Herzens ist intakt. Es sind weder Ödem oder Hämorrhagien noch IgM-Einlagerungen im Gewebe oder dem Gefäßendothel zu erkennen.





**Abbildung 31:** Xenogenes hCD46-Präparat nach IgM-Färbung in 20-facher Vergrößerung.

Die Struktur der Kardiomyozyten ist in diesem xenogen perfundierten hCD46-Präparat, mit Ausnahme von geringfügigem Ödem und leichter Hämorrhagie (rote Pfeile), größtenteils erhalten. Man sieht jedoch in den kleinen Gefäßen IgM-Einlagerungen (schwarze Pfeile).

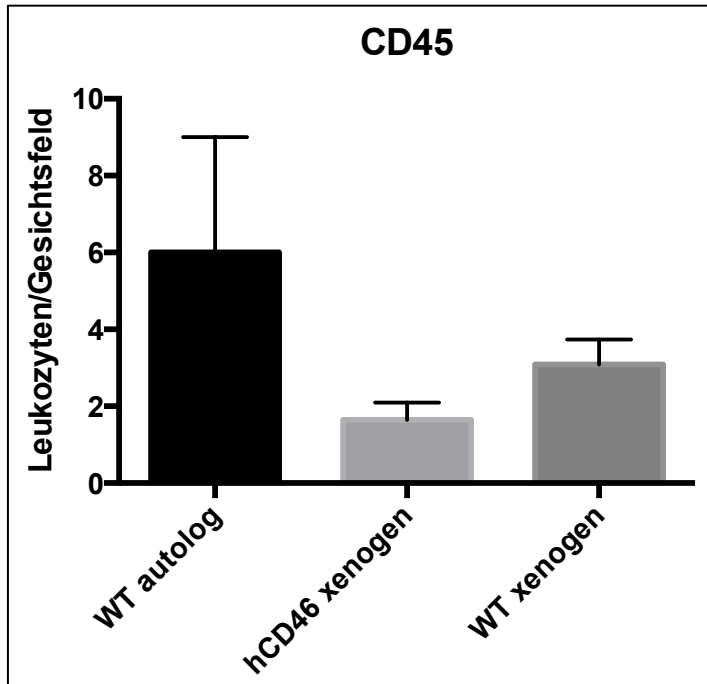


**Abbildung 32:** Xenogenes WT-Präparat nach IgM-Färbung in 20-facher Vergrößerung.

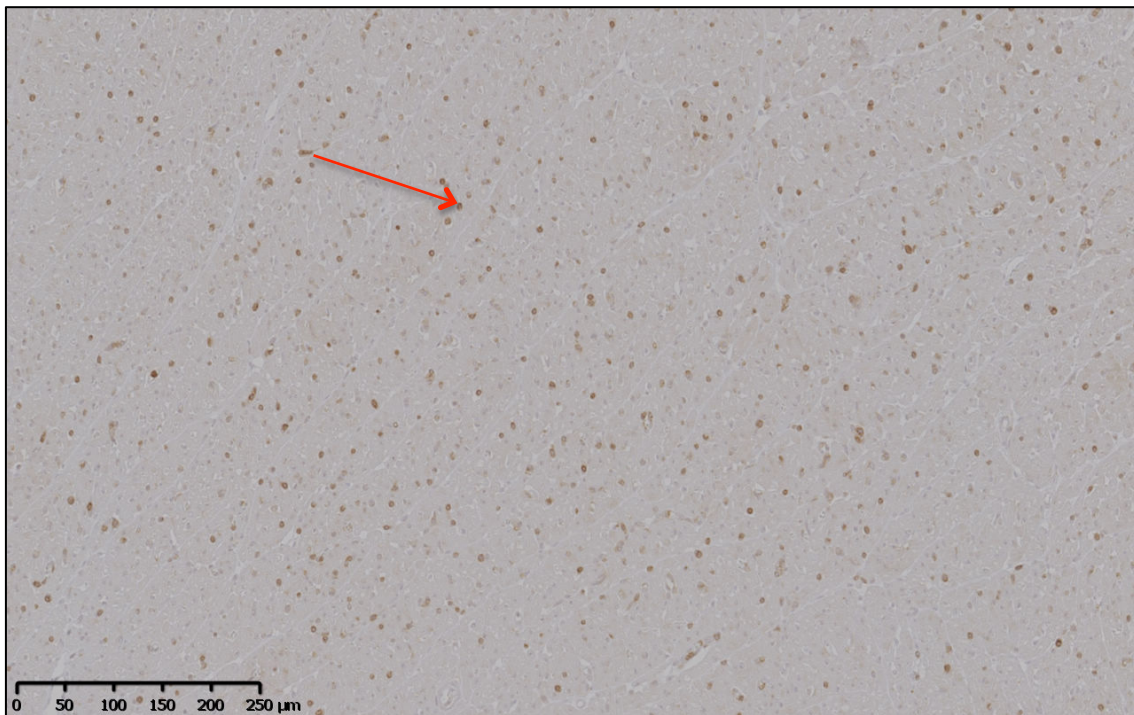
*In diesem Ausschnitt eines xenogen perfundierten WT-Präparats sieht man eine ausgeprägte Destruktion der kardiomykulären Struktur mit Ödembildung, Hämorrhagie (rote Pfeile) und IgM-Einlagerungen auch in den großen Gefäßen (schwarze Pfeile).*

#### 4.5.4 CD45

In der autologen WT-Gruppe wurden mit  $6 \pm 3$  Leukozyten/Gesichtsfeld durchschnittlich am meisten Leukozyten in den zehn Gesichtsfeldern gezählt. Nicht signifikant weniger waren es in der xenogenen WT-Gruppe mit  $3,09 \pm 0,65$  Leukozyten/Gesichtsfeld. Am wenigsten Leukozyten wurden in der xenogenen hCD46-Gruppe gezählt. Hier waren es  $1,65 \pm 0,45$  Leukozyten/Gesichtsfeld. Die Unterschiede waren nicht signifikant (Abbildung 36).



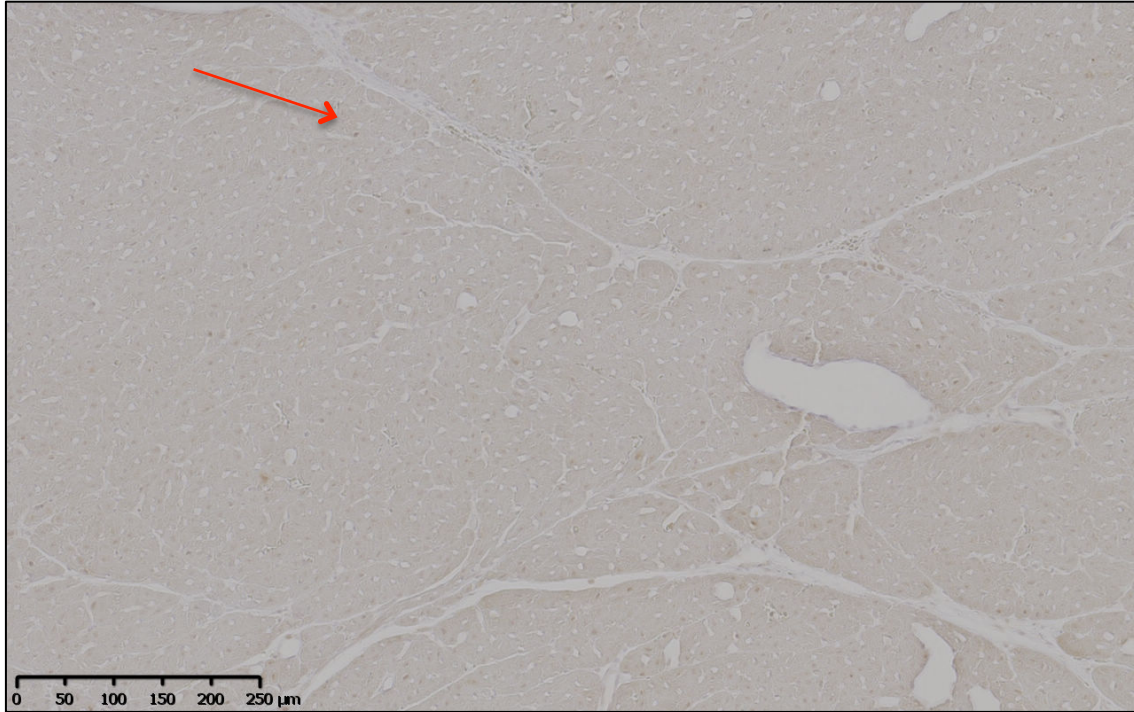
**Abbildung 33:** Mittelwerte der gezählten CD45-positiven Leukozyten in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe.



**Abbildung 34:** Autologes WT-Präparat nach CD45-Färbung in 10-facher Vergrößerung.

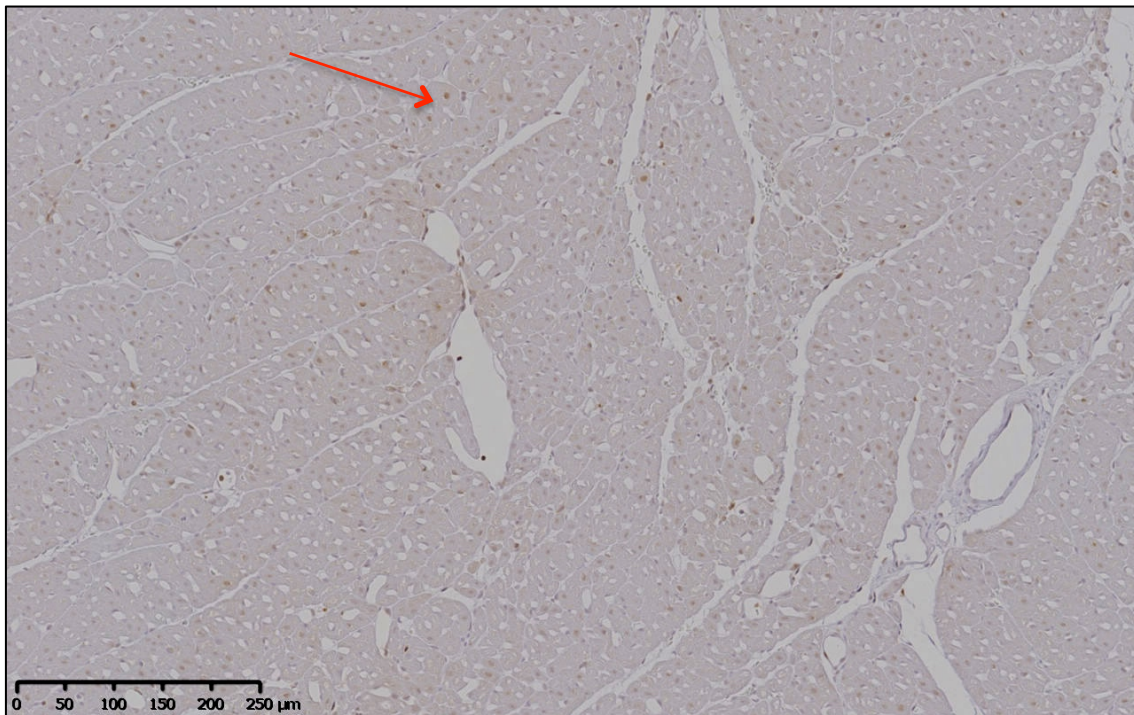
In diesem Ausschnitt sieht man deutlich, dass eine große Anzahl an Leukozyten im kardialen Gewebe angefärbt wurde (exemplarisch: Pfeil).





**Abbildung 35:** Xenogenes hCD46-Präparat nach CD45-Färbung in 10-facher Vergrößerung.

In diesem Präparat sind deutlich weniger angefärbte Leukozyten zu sehen, als in Abbildung 34 (exemplarisch: Pfeil).



**Abbildung 36:** Xenogens WT-Präparat nach CD45-Färbung in 10-facher Vergrößerung.

*In diesem Ausschnitt sieht man mehrere angefärbte Leukozyten (exemplarisch: Pfeil). Es sind deutlich mehr als in der xenogen perfundierten hCD46-Gruppe (Abbildung 35), jedoch weniger als in der autolog perfundierten WT Gruppe (Abbildung 34).*

## **5 Diskussion**

### **5.1 Genetische Modifikation in der Xenotransplantation**

Die Xenotransplantation wird seit vielen Jahren als Möglichkeit erachtet, den Organmangel zu beheben. Wie die präklinischen Studien gezeigt haben, kann die Kombination aus genetisch modifizierten, porcinen Spenderorganen und einer auf die Xenotransplantation abgestimmte systemische Therapie nach der Transplantation das Leben von Primaten mit einem porcinen Herzen ermöglichen. Die klinisch angewandte Xenotransplantation ist in greifbare Nähe gerückt. Genetische Modifikationen werden in Zukunft eine entscheidende Säule sein, um die xenogene Herztransplantation zu ermöglichen. [55]

Essentieller Bestandteil der genetischen Modifikation ist das hCD46-Transgen. In unserer Untersuchung ist ersichtlich, dass letzteres alleine bereits eine erhebliche Verbesserung in der Umgehung der hyperakuten Abstoßung erreicht. In dem verwendeten Perfusionsmodell konnte das hCD46-Transgen ohne Primatenversuch isoliert getestet werden.

### **5.2 Working-Heart Perfusionssystem**

Basierend auf dem biventrikulären Modell von Demmy et al. und den nachfolgenden biventrikulären Perfusionssystemen wurde unser Modell im WBEX entwickelt. Die Besonderheit des Systems besteht in der Möglichkeit, die Folgen der Explantation und Reperfusion physiologisch und unabhängig von anderen Organsystemen untersuchen und die reine kardiale Funktion erfassen zu können.

Durch die Perfusion des porcinen Herzens mit humanem Perfusat, ermöglicht das Modell die Dokumentation einer xenogenen Abstoßungsreaktion anhand einer effizienten Generierung hämodynamischer, serologischer und histologischer Daten.

Die isolierte (ohne zusätzliche pharmakologische oder genetische Verfahren) Untersuchung hCD46-transgener Herzen im Vergleich zu unbehandelten Wildtypherzen zeigt den spezifischen Impact von hCD46 auf die kardiale xenogene Abstoßungsreaktion.

Eine weitere Besonderheit des Perfusionssystems ist die Verwendung eines vergleichsweise niedrigen Perfusativolumens von 500 ml. In den meisten Perfusionsmodellen werden ca. 4 l einer Krebs-Henseleit-Lösung verwendet [56, 57]. Durch die Verwendung eines humanen Perfusats in unserem Modell und die daraus resultierende Beschränkung auf humane Blutspender, ist die Volumenquantität begrenzt.



Dies führt zur genaueren Auseinandersetzung mit der Wahl der Blutspender. Unterschiedliche Blutspender zeigen unterschiedliche Antikörpertiter ( $\alpha$ -Gal-Antikörpertiter, Neu5Gc-Antikörpertiter), was zur Beeinflussung der jeweiligen Abstoßungsreaktion in den Versuchen führen könnte. Aus diesem Grund wurden die Versuche in hCD46- und xenogener Gruppe jeweils gepaart untersucht, um die Antikörperlast in Relation zu setzen. Des Weiteren hatten die Probanden unterschiedliche Blutgruppen, was ebenfalls zu Verfälschungen der Resultate führen könnte. Jedoch zeigte sich in der Literatur keine Korrelation der Abstoßungsreaktion im Zusammenhang mit alpha-Gal-Antikörpern und Blutgruppen [58, 59].

Nichtsdestotrotz zeigt das Perfusionssystem auch Nachteile. Bereits bei der Verwendung von beschichteten Schläuchen in der Herz-Lungen-Maschine kommt es zur Aktivierung und Apoptose von Zellen und zu Hämolyse [60, 61]. Da es sich bei unserem Modell um ein nicht beschichtetes Schlauchsystem handelt, sind zum einen die Interpretation des PBMCS-Verlaufs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) und zum anderen die Analyse von Hämolyse erschwert. Durch das Schlauchsystem wird die Verabreichung einer hohen Heparindosis notwendig, was dazu führt dass die Untersuchung der Gerinnung eingeschränkt ist.

Des Weiteren stellt die Isolierung des Herzens vom restlichen Körperkreislauf zwar einen Vorteil für die Untersuchung der kardialen Abstoßungsreaktion dar, jedoch entfallen die Regulierungsmechanismen des in-vivo Milieus. Zwar ist es möglich letztere anhand der zuvor beschriebenen Substitution von Glucose, Insulin, Natriumbicarbonat und Calciumgluconat zu simulieren, jedoch kann dessen Komplexität ex-vivo nicht naturgetreu erfasst werden.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Hämodynamik**

Zur statistischen Auswertung der hämodynamischen Parameter wurde der Mittelwert der Zeitpunkte T5-T8 berechnet, da ab der 90. Minute eine Stabilisierung des Kreislaufs zu erwarten war [57].

Beginnend mit dem Herzindex konnte festgestellt werden, dass hCD46 zu einer signifikanten Verbesserung des kardialen Outputs im Vergleich zu den unbehandelten xenogen perfundierten Landrasseherzen führte. Dies spricht für eine Steigerung der Herzleistung in den transgenen hCD46-Herzen, die auf eine Verminderung der xenogenen Abstoßungsreaktion in der hCD46-Gruppe zurückzuführen ist. Im Vergleich zu den autolog perfundierten WT-Herzen war die Herzleistung der hCD46-Herzen jedoch signifikant unterlegen.

Wir konnten also feststellen, dass das hCD46-Transgen die kardiale Pumpfunktion im Rahmen der hyperakuten Abstoßungsreaktion signifikant verbessern kann. Im Vergleich zu autolog perfundierten WT-Herzen kommt es jedoch dennoch zu einer abgeschwächten Herzleistung.

Auch der Schlagarbeitsindex als bedeutender, hämodynamischer Parameter der ventrikulären Auswurfleistung, zeigte eine zwar nicht signifikant aber dennoch verminderte kardiale Leistung in der xenogen perfundierten WT-Gruppe im Vergleich zur hCD46-Gruppe und autolog perfundierten WT-Gruppe. Letztere zeigte gegenüber den beiden anderen Gruppen einen überlegenen Schlagarbeitsindex, so dass auch hier zu sehen ist, dass die hyperakute Abstoßungsreaktion durch das hCD46 Transgen beeinflussbar, jedoch nicht völlig vermeidbar ist.

Der Koronarfluss wurde bestimmt um den Grad der Durchblutung des Herzmuskelgewebes zu bestimmen und eventuelle Veränderungen der Gefäße zu identifizieren.

Der Koronarfluss war in der hCD46-Gruppe im Vergleich zu den xenogen perfundierten Landrasseherzen erhöht. Man kann infolgedessen davon ausgehen, dass die Durchblutung des kardialen Gewebes in den hCD46-Herzen überlegen war. Ein erniedrigter Koronarfluss spricht für eine durch die Abstoßung bedingte Verengung der koronaren Gefäße. Hier sind zum einen die intravasale und zum anderen die extravasalen Komponenten des Gefäßwiderstands zu berücksichtigen. Intravasal führt der verminderte Koronarfluss durch die eingeschränkte kardiale Pumpfunktion zu einem erhöhten koronaren Widerstand. Außerdem spielen beginnende mikrothrombotische Prozesse eine Rolle. Die durch die Abstoßungsreaktion verminderte Kontraktilität des Herzens mit steigendem intraventrikulärem Druck als extravasale Faktoren führen zu einem erhöhten Widerstand und somit vermindertem Fluss in den Koronararterien [62, 63]. Des Weiteren führen extravasale Ödembildung und Hämorrhagie, sowie die verminderte Mikrozirkulation im kardialen Gewebe zu einer Verengung der koronaren Gefäße.

Insgesamt konnten wir in der xenogen perfundierten hCD46 Gruppe im Vergleich zur xenogenen WT-Gruppe einen deutlich besseren Verlauf der Hämodynamik zeigen, was dafür spricht, dass die hyperakute Abstoßung durch das hCD46-Transgen vermindert und die kardiale Pumpfunktion und Durchblutung verbessert werden konnten.

### 5.3.2 Point-of-Care Analyse

Die Erkennung kardialer Gewebshypoxien erfolgte durch die Bestimmung des Laktats, welches bei Sauerstoffmangel in der anaeroben Glykolyse gebildet wird [64]. Als Ischämie marker, welcher bei Hypoperfusion aus hypoxischen Gewebearealen freigesetzt wird, lässt das Laktat einen Rückschluss auf die Sauerstoffversorgung des Herzens zu [65, 66].

Bei näherer Betrachtung der Blutgasanalysen fiel zunächst der unterschiedliche Kurvenverlauf des Laktats zwischen autologer und sowohl xenogener als auch hCD46 Gruppe auf. Initial kam es in allen drei Gruppen zwischen T1 und T2 zu einem Laktatanstieg, welcher unserer Ansicht nach auf die 2,5-stündige Ischämiezeit und anschließende Reperfusion zurückzuführen ist. Da die Halbwertszeit des Laktats nur wenige Minuten beträgt [67], kam es in der autologen Gruppe im Anschluss zu einem Abfall der Laktatkonzentration in den Normbereich (0,5-2,2mmol/l). Im Gegensatz dazu wurde sowohl in der hCD46- als auch in der xenogenen Gruppe im Verlauf weiterhin ischämiebedingt Laktat ausgeschieden und im Blut nachgewiesen. In der hCD46-Gruppe war diese Laktatausscheidung geringer als in der autologen Gruppe. Dieser Unterschied in der Laktatausscheidung und somit im Konzentrationsanstieg führt zur Schlussfolgerung, dass das kardiale Gewebe in den hCD46-Herzen weniger ischämisch und besser mit Sauerstoff versorgt war als in den xenogen perfundierten Landrasseherzen.

Des Weiteren zeigte sich in der xenogenen WT-Gruppe ein erniedrigter Sauerstoffverbrauch ( $VO_2$ ) im Gegensatz zu hohen Werten in autologer und hCD46-Gruppe. Dies liegt daran, dass  $VO_2$  bei kritisch erniedrigtem Sauerstoffangebot ( $DO_2$ ) von letzterem abhängig wird und ebenfalls sinkt. Da man in der xenogenen Gruppe einen vergleichsweise niedrigen Koronarfluss beobachten konnte, war infolgedessen  $DO_2$  erniedrigt, denn  $DO_2$  entspricht dem Produkt aus Blutfluss und arteriellem Sauerstoffgehalt [66]. In der autologen und hCD46-Gruppe war der Koronarfluss und somit auch  $DO_2$  bei konstantem Sauerstoffgehalt der xenogenen Gruppe überlegen, so dass  $VO_2$  von  $DO_2$  unabhängig war. In einer solchen stabilen Stoffwechsellage entspricht  $VO_2$  dem Sauerstoffbedarf, so dass ein erhöhter Sauerstoffverbrauch in der hCD46- und autologen Gruppe auf eine überlegene metabolische Aktivität zurückzuführen ist [68]. Die transgenen Herzen hatten einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch als die xenogen perfundierten Landrasseherzen so dass wir zu dem Ergebnis kommen, dass das hCD46-Transgen zu einer Verbesserung des kardialen Metabolismus führt.

### 5.3.3 Serologie

Zur Quantifizierung der myokardialen Schädigung mit Zelluntergang in Folge der hyperakuten Abstoßung wurden einige serologische Parameter bestimmt.

Die Kreatinkinase Isoenzym MB ist eines der vier Isoenzyme der Kreatinkinase, die beim Menschen vor allem in Gehirn und Muskulatur ihren Ursprung finden [69]. Das Isoenzym MB kommt vor allem in Skelettmuskulatur und Myokard vor und hat sich als wichtiger Parameter in der Diagnostik der Myokardischämie bewährt [70]. Da das Perfusionssystem aufgrund des Aufbaus keinen Einfluss der Skelettmuskulatur zulässt, kann man von einer myokardialen Abstammung der gemessenen CK-MB ausgehen.

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) oder auch Aspartat-Aminotransferase (ASAT) kommt in zwei Isoformen, einer mitochondrialen und einer zytoplasmatischen, vor. Beim Menschen findet sie ihren Ursprung hauptsächlich in der Leber, der Skelett- und Herzmuskulatur [71]. Da auch hier weder Skelettmuskulatur noch Leber Einfluss auf das Perfusionssystem haben, kann von einem Ursprung der gemessenen GOT aus dem Myokard ausgegangen werden.

Die Laktatdehydrogenase kommt mit seinen fünf Isoenzymen im Zytoplasma aller Zellen vor. Die höchste Aktivität findet sich jedoch in der Skelett- und Herzmuskulatur, in der Leber, der Niere und den Erythrozyten [67]. Zwar ist der Wert somit recht unspezifisch für die myokardiale Schädigung, jedoch konnte auch hier aufgrund der isolierten Perfusion des Herzens gezielt der Verlauf der kardialen LDH beobachtet werden.

Zuletzt wurde neben den oben genannten Herzenzymen Harnstoff als Marker für den myokardialen Zelluntergang verwendet. Harnstoff ist ein Stoffwechselprodukt des Proteinabbaus. Somit steigt die Harnstoff-Serumkonzentration als Zeichen der Veränderung des Metabolismus in der Myokardischämie [72].

Alle genannten Parameter zeigten einen ähnlichen Verlauf. Initial kam es zu einem langsamen Anstieg bzw. sogar zu einem Abfall (Harnstoff) der Konzentrationen im Serum zwischen den Zeitpunkten T1 und T2. Dies liegt an der noch bis zu dem Zeitpunkt kurzen Perfusionszeit von zehn Minuten. Im Anschluss daran kam es in allen Gruppen zu einem starken Anstieg und einem leichten Abflachen der Kurve gegen Ende der Perfusion. In der Beobachtung aller Parameter waren die gemessenen Konzentrationen der xenogenen WT-Gruppe am höchsten und unterschieden sich von denen der autologen WT- und hCD46-Gruppe. Letztere lagen jeweils nah beieinander. Dieser Unterschied der Konzentrationen ist als ausgeprägtere myokardiale Schädigung im Rahmen der hyperakuten Abstoßungsreaktion in der xenogenen WT-Gruppe im Vergleich zur hCD46- und autologen WT-Gruppe zu werten.

Somit spiegeln auch die serologischen Parameter die Verminderung der hyperakuten Abstoßung durch das hCD46-Transgen in xenogen perfundierten Schweineherzen wieder.

#### 5.3.4 Herzgewicht und Immunhistochemie

Durch Schäden nach der Reperfusion am Endothel kam es in allen Versuchsgruppen zu einer Gewichtszunahme. Wir gehen davon aus, dass es zu Schäden nach der Reperfusion am Endothel kam, welche zu Ödemen und Hämorrhagie im Myokard und somit zu einer Gewichtszunahme führten. Die größte Gewichtszunahme konnte in der xenogenen WT-Gruppe gesehen werden, so dass in dieser Gruppe die Schädigung am Endothel am größten war. Dies sehen wir als Folge der

hyperakuten Abstoßungsreaktion. Die transgene Gruppe zeigte eine deutlich geringere Gewichtszunahme und somit eine weniger ausgeprägte Ödem- und Hämorrhagiebildung. In der autolog perfundierten WT-Gruppe wurde lediglich eine sehr geringe Gewichtszunahme gesehen, welche am ehesten durch die Ischämiephase mit anschließendem Reperfusionsschaden interpretiert werden kann.

Die Ergebnisse der Gewichtszunahme konnten durch die histologische Auswertung erklärt werden.

Zunächst wurden insgesamt in den xenogen perfundierten WT-Präparaten eine vermehrt aufgelockerte Struktur der Kardiomyozyten, sowie Ödembildung und Hämorrhagie gesehen, was zu der oben beschriebenen Gewichtszunahme führte.

Betrachtet man die einzelnen Färbungen, so konnte die Hypothese, dass es durch das hCD46-Transgen zu einer verminderten Ablagerung von Komplement, insbesondere der Komponenten C5b-9, im kardialen Gewebe kommt und somit die hyperakute Abstoßungsreaktion geringer ausfällt, bestätigt werden.

hCD46 führt als Cofaktor der Plasmaserinprotease Faktor I zu einer Inhibierung des Komplementsystems durch Spaltung von C4 in seine Unterformen. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Spaltprodukten. C4d ist eines der anfallenden Spaltprodukte von C4 und wurde als Marker für die Inhibierung der Komplementkaskade verwendet. Die xenogene hCD46-Gruppe zeigte eine signifikant erhöhte Akkumulation von C4d im Vergleich zur xenogenen WT-Gruppe, was auf die Blockade des Komplementsystems zurückzuführen ist. Die autologe WT-Gruppe konnte nicht mit den restlichen beiden Gruppen verglichen werden, da der verwendete Antikörper porcines Komplement nicht bindet.

C5b-9 bildet die gemeinsame Endstrecke des klassischen-, alternativen- und Lektinweges der Komplementkaskade. Bei einer Blockierung der vorgeschalteten C3- und C5-Konvertasen, wie in unserem Fall durch die Plasmaserinprotease Faktor I mit dem Cofaktor hCD46, sollte es zu einer verminderten Expression der nachgeschalteten Komponenten der Komplementkaskade, sprich C5b-9 kommen. Die C5b-9-Färbung konnte dies nachweisen und zeigt die entsprechende Ablagerung des Komplements im kardialen Gewebe. Im Vergleich zur xenogenen WT-Gruppe konnte eine signifikant geringere Ablagerung von C5b-9 im Herzgewebe der hCD46-Präparate nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die für die Abstoßung mitverantwortliche Komplementreaktion geringer ausfällt, wenn Zellen hCD46 exprimieren.

Insgesamt konnten wir also zeigen, dass die Komplementkaskade, die eine große Rolle in der hyperakuten Abstoßungsrolle spielt, durch das hCD46-Transgen signifikant unterdrückt werden kann.

Betrachtet man die Präparate und die Gewichtszunahme in den unterschiedlichen Gruppen, sieht man als Konsequenz dieser unterdrückten Komplementkaskade eine Verminderung in Ödem- und Hämorrhagiebildung in Präparaten, welche das hCD46-Transgen exprimieren.

Wie Platt et al. feststellten, werden in Präparaten in denen es zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion kam vermehrt IgM-Ablagerungen gesehen [14]. Wir konnten in unseren Ergebnissen zeigen, dass die IgM-Ablagerungen in hCD46-Präparaten geringer ausfielen als in xenogen perfundierten WT-Präparaten. Signifikant weniger waren es jedoch in autolog perfundierten WT-Präparaten. Wir schließen daraus, dass die hyperakute Abstoßung durch das hCD46-Transgen verringert, jedoch nicht vollständig verhindert werden kann.

Zur Bestimmung der eingewanderten Pan-Leukozyten in das kardiale Gewebe wurde die CD45-Färbung verwendet. Diese zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl von Leukozyten im Gewebe der autolog perfundierten WT-Präparate. Die hCD46-Gruppe zeigte die geringste Leukozyten-Einwanderung. Die erhöhte Leukozyteneinwanderung in den autologen, daher mit Schweineblut perfundierten, WT-Präparaten erklären wir uns durch die im Vergleich zu menschlichem Perfusat (4,3-11 G/l) erhöhten Leukozytenzahlen im Schweineblut (11-25,4 G/l in Deutschen Landrasseschweinen) [73, 74]. Zusätzlich führt der bessere Koronarfluss in der autologen WT-Gruppe zu einer besseren Perfusion als in den xenogen perfundierten Gruppen. Dadurch könnte die Migration der Leukozyten in das Herzgewebe erleichtert und somit die Anzahl der Leukozyten im Gewebe höher sein. Die xenogene WT-Gruppe zeigt im Vergleich zur hCD46-Gruppe eine vermehrte Leukozyteneinwanderung, was man als Aktivierung der zellulären Immunantwort im Rahmen der hyperakuten Abstoßung deuten kann.

## 6 Zusammenfassung

Die Herztransplantation ist der Goldstandard in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz. Bei steigendem Organspendemangel und gleichzeitig zunehmendem Bedarf an Spenderherzen könnte die Xenotransplantation die Rettung für sehr viele lebensbedrohlich erkrankte Patienten sein.

In den letzten Jahren wurden auf diesem Forschungsgebiet große Fortschritte gemacht, sowohl im Verständnis der Pathophysiologie der Abstoßungsreaktionen, als auch verschiedener Möglichkeiten diese zu verhindern.

Ein entscheidender therapeutischer Ansatz ist die Expression eines humanen Komplementregulators auf dem Endothel der Schweineherzen. Dieser hemmt gezielt das Komplementsystem des Empfängers im Transplantat.

Unsere Arbeit untersucht die Wirkung des humanen Komplementregulators hCD46 auf die xenogene hyperakute Abstoßungsreaktion von porcinen Herzen. Dafür wurden genetisch veränderte Schweineherzen ex-vivo mit humanem Vollblut perfundiert. Das für diese Zwecke eigens entwickelte Perfusionsmodell erlaubt die Testung der Herzen unter physiologischer Vor- und Nachlast der Herzen und ermöglicht so auch eine Bestimmung der kardialen Funktion.

Zur Erfassung der hyperakuten Abstoßungsreaktion wurden unterschiedliche Parameter beobachtet. Die Herzfunktion wurde anhand von Herzindex, Koronarfluss, sowie anhand des Sauerstoffverbrauchs des Herzens gemessen. Der serologische Anstieg der Herzenzyme im Perfusat wurde zur Beurteilung der kardialen Schädigung herangezogen. Überdies konnte durch die Gewichtszunahme des Myokards und die histologische Untersuchung des Gewebes das Ausmaß der hyperakuten Abstoßung untersucht werden.

Es wurden drei Versuchsgruppen untersucht. In der ersten Gruppe wurden Wildtyp Schweineherzen autolog perfundiert (Negativ Kontrolle). In der zweiten Gruppe wurden transgene hCD46 Schweineherzen xenogen mit humanem Vollblut perfundiert. In der dritten Gruppe wurden Wildtyp Schweineherzen ebenfalls xenogen perfundiert.

Wir konnten mit unserem Modell zeigen, dass die Verwendung von hCD46-transgenen Schweineherzen zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung der Herzen und besseren kardialen Pumpfunktion führt. Der myokardiale Zelluntergang war geringer als in den xenogen perfundierten WT-Herzen. Auch immunhistochemisch und anhand der Gewichtszunahme des Myokards konnten wir zeigen, dass die hyperakute Abstoßung durch hCD46-Expression auf dem Endothel reduziert, aber nicht gänzlich verhindert wird.

Wir konnten zeigen, dass der Einfluss der genetischen Modifikation auf die xenogene Reaktion sowohl serologisch, histologisch als auch funktionell nachweisbar ist. Die gewonnenen Messungen dienen als Referenz um weitere genetische Modifikationen für die Xenotransplantation testen zu können. Unser Modell bietet somit eine gute Grundlage für die Untersuchung weiterer Umgehungsmöglichkeiten der hyperakuten Abstoßung.

Abschließend kann man sagen, dass die Verwendung von transgenen hCD46-Spenderherzen eine vielversprechende Komponente in der Umgehung der hyperakuten Abstoßung darstellt. Sie sollte allerdings mit anderen Lösungsansätzen kombiniert und deren gemeinsame Wirkung genauer untersucht werden, da die hyperakute Abstoßungsreaktion nicht vollständig durch das hCD46-Transgen behoben werden konnte.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Barnard, C.N., *The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town.* S Afr Med J, 1967. **41**(48): p. 1271-4.
2. Calne, R.Y., et al., *Prolonged survival of pig orthotopic heart grafts treated with cyclosporin A.* Lancet, 1978. **1**(8075): p. 1183-5.
3. Eurotransplant International Foundation. Leiden, N., [www.eurotransplant.org](http://www.eurotransplant.org).
4. Deutsche Stiftung Organtransplantation, F.a.M., Deutschland, [www.dso.de](http://www.dso.de).
5. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.* Eur J Heart Fail, 2016. **18**(8): p. 891-975.
6. Hardy, J.D., et al., *Heart Transplantation in Man. Developmental Studies and Report of a Case.* JAMA, 1964. **188**: p. 1132-40.
7. Deschamps, J.Y., et al., *History of xenotransplantation.* Xenotransplantation, 2005. **12**(2): p. 91-109.
8. Bailey, L.L., et al., *Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate.* JAMA, 1985. **254**(23): p. 3321-9.
9. Czaplicki, J., B. Blonska, and Z. Religa, *The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human.* J Heart Lung Transplant, 1992. **11**(2 Pt 1): p. 393-7.
10. De Salvatore, S., et al., *Role of xenotransplantation in cardiac transplantation.* J Card Surg, 2015. **30**(1): p. 111-6.
11. Samstein, B. and J.L. Platt, *Physiologic and immunologic hurdles to xenotransplantation.* J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(1): p. 182-93.
12. Schuurman, H.J., J. Cheng, and T. Lam, *Pathology of xenograft rejection: a commentary.* Xenotransplantation, 2003. **10**(4): p. 293-9.
13. Sprangers, B., M. Waer, and A.D. Billiau, *Xenotransplantation: where are we in 2008?* Kidney Int, 2008. **74**(1): p. 14-21.

14. Platt, J.L., et al., *Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model*. Transplantation, 1991. **52**(2): p. 214-20.
15. Galili, U., *The  $\alpha$ -gal epitope ( $\text{Gal}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc-R}$ ) in xenotransplantation*. Biochimie, 2001. **83**(7): p. 557-563.
16. Galili, U., et al., *Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora*. Infect Immun, 1988. **56**(7): p. 1730-7.
17. Calne, R.Y., *Organ transplantation between widely disparate species*. Transplant Proc, 1970. **2**(4): p. 550-6.
18. Pierson, R.N., 3rd, et al., *Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application*. Xenotransplantation, 2009. **16**(5): p. 263-80.
19. Banz, Y. and R. Rieben, *Endothelial cell protection in xenotransplantation: looking after a key player in rejection*. Xenotransplantation, 2006. **13**(1): p. 19-30.
20. Bach, F.H., et al., *Delayed xenograft rejection*. Immunology Today, 1996. **17**(8): p. 379-384.
21. Pino-Chavez, G., *Differentiating Acute Humoral from Acute Cellular Rejection Histopathologically*. Graft, 2001. **4**(1): p. 60-62.
22. Brenner, P., et al., *Combination of hDAF-transgenic pig hearts and immunoadsorption in heterotopic xenotransplantation of immunosuppressed baboons*. Transplant Proc, 2005. **37**(1): p. 483-6.
23. Watts, A., et al., *Plasma perfusion by apheresis through a gal immunoaffinity column successfully depletes anti-Gal antibody: experience with 275 aphereses in baboons*. Transplant Proc, 2000. **32**(5): p. 860.
24. Alper, C. and D. Balavitch, *Cobra venom factor: evidence for its being altered cobra C3 (the third component of complement)*. Science, 1976. **191**(4233): p. 1275-1276.
25. Menoret, S., et al., *Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination*. Transplantation, 2004. **77**(9): p. 1468-71.
26. Kuwaki, K., et al., *Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 29-31.

27. Yamada, K., et al., *Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 32-4.
28. Chen, G., et al., *Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1295-8.
29. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 1895. **61**(6): p. 291-332.
30. Skrzypiec-Spring, M., et al., *Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007. **55**(2): p. 113-26.
31. Neely, J.R., et al., *Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart*. Am J Physiol, 1967. **212**(4): p. 804-14.
32. Forty, J., D.G. White, and J. Wallwork, *A technique for perfusion of an isolated working heart to investigate hyperacute discordant xenograft rejection*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1993. **106**(2): p. 308-16.
33. Demmy, T.L., G.J. Magovern, and R.L. Kao, *Isolated biventricular working rat heart preparation*. Ann Thorac Surg, 1992. **54**(5): p. 915-20.
34. Le Friec, G. and C. Kemper, *Complement: coming full circle*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2009. **57**(6): p. 393-407.
35. Walport, M.J., *Complement*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(14): p. 1058-1066.
36. Gros, P., F.J. Milder, and B.J. Janssen, *Complement driven by conformational changes*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 48-58.
37. Venkatraman Girija, U., et al., *Structural basis of the C1q/C1s interaction and its central role in assembly of the C1 complex of complement activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(34): p. 13916-20.
38. Phillips, A.E., et al., *Analogous interactions in initiating complexes of the classical and lectin pathways of complement*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7708-17.
39. Pike, R.N. and L.C. Wijeyewickrema, *The molecular switches controlling the interaction between complement proteases of the classical and lectin pathways and their substrates*. Current Opinion in Structural Biology, 2013. **23**(6): p. 820-827.

40. Matsushita, M., Y. Endo, and T. Fujita, *Structural and functional overview of the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. **61**(4): p. 273-83.
41. Matsushita, M. and T. Fujita, *Ficolins and the lectin complement pathway*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 78-85.
42. Rohrer, B., et al., *The alternative pathway is required, but not alone sufficient, for retinal pathology in mouse laser-induced choroidal neovascularization*. Molecular Immunology, 2011. **48**(6-7): p. e1-e8.
43. Zipfel, P.F., et al., *Complement and diseases: Defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases*. Molecular Immunology, 2006. **43**(1-2): p. 97-106.
44. Morgan, B.P., *Inhibition of Complement in the Membrane Attack Pathway*, in *Therapeutic Interventions in the Complement System*, J. Lambris and V.M. Holers, Editors. 2000, Humana Press. p. 205-224.
45. Seya, T., et al., *Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999. **31**(11): p. 1255-1260.
46. Cardone, J., G. Le Friec, and C. Kemper, *CD46 in innate and adaptive immunity: an update*. Clin Exp Immunol, 2011. **164**(3): p. 301-11.
47. Liszewski, M.K., T.W. Post, and J.P. Atkinson, *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 431-55.
48. Seya, T., *Human Regulator of Complement Activation (RCA) Gene Family Proteins and Their Relationship to Microbial Infection*. MICROBIOLOGY and IMMUNOLOGY, 1995. **39**(5): p. 295-305.
49. Richards, A., et al., *Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12966-71.
50. Cattaneo, R., *Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet*. J Virol, 2004. **78**(9): p. 4385-8.
51. Riley-Vargas, R.C., et al., *CD46: expanding beyond complement regulation*. Trends in Immunology, 2004. **25**(9): p. 496-503.

52. Cardone, J., et al., *Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 862-71.
53. Kemper, C., et al., *Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 388-92.
54. Mohiuddin, M.M., et al., *Genetically engineered pigs and target-specific immunomodulation provide significant graft survival and hope for clinical cardiac xenotransplantation*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **148**(3): p. 1106-13; discussion 1113-4.
55. Längin, M., et al., *Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation*. Nature, 2018. **564**(7736): p. 430-433.
56. Asfour, H., et al., *NADH fluorescence imaging of isolated biventricular working rabbit hearts*. J Vis Exp, 2012(65).
57. Chinchoy, E., et al., *Isolated four-chamber working swine heart model*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(5): p. 1607-14.
58. Kumar, G., et al., *Is there a correlation between anti-pig antibody levels in humans and geographic location during childhood?* Transplantation, 2013. **96**(4): p. 387-93.
59. Buonomano, R., et al., *Quantitation and characterization of anti-Galalpha1-3Gal antibodies in sera of 200 healthy persons*. Xenotransplantation, 1999. **6**(3): p. 173-80.
60. Shi, S.S., et al., *Effect of open heart surgery with cardiopulmonary bypass on peripheral blood lymphocyte apoptosis in children*. Pediatr Cardiol, 2009. **30**(2): p. 153-9.
61. Mamikonian, L.S., et al., *Cardiopulmonary Bypass Is Associated With Hemolysis and Acute Kidney Injury in Neonates, Infants, and Children*. Pediatr Crit Care Med, 2014.
62. Lochner, W., W.K. Raff, and F. Kosche, *Koronarer Strömungswiderstand bei Herz- und Kreislaufinsuffizienz, in Herzhypertrophie*, R. Thauer and K. Pleschka, Editors. 1972, Steinkopff. p. 272-275.
63. Raff, W.K., et al., *Die extravasale Komponente des Coronarwiderstandes mit steigendem linksventrikulären Druck*. Pflügers Archiv, 1972. **333**(4): p. 352-361.
64. Eldridge, F., *Blood lactate and pyruvate in pulmonary insufficiency*. N Engl J Med, 1966. **274**(16): p. 878-83.

65. Andersen, L.W., et al., *Etiology and Therapeutic Approach to Elevated Lactate Levels*. Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic, 2013. **88**(10): p. 1127-1140.
66. Pinsky, M.R. and R. Schlichtig, *Regional oxygen delivery in oxygen supply-dependent states*. Intensive Care Medicine, 1990. **16**(2): p. S169-S171.
67. Guder, W.G., *Das Laborbuch für Klinik und Praxis*. 2009: Elsevier, Urban & Fischer.
68. Vincent, J.L., *The relationship between oxygen demand, oxygen uptake, and oxygen supply*. Intensive Care Medicine, 1990. **16**(2): p. S145-S148.
69. Wallimann, T., et al., *Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis*. Biochemical Journal, 1992. **281**(Pt 1): p. 21-40.
70. Puleo , P.R., et al., *Use of a Rapid Assay of Subforms of Creatine Kinase MB to Diagnose or Rule Out Acute Myocardial Infarction*. New England Journal of Medicine, 1994. **331**(9): p. 561-566.
71. Hayashi, H., et al., *Recent topics in pyridoxal 5'-phosphate enzyme studies*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 87-110.
72. Chazov, E.I., *Regulation of Myocardial Contractile Function and Metabolism, Teil 2*.
73. Kixmüller, *Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme ENzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie*. 2004.
74. T. Arndt, A.G., *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2012.

## 8 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jan-Michael Abicht ganz herzlich danken für die Möglichkeit, an diesem Projekt teilzunehmen, für die Einarbeitung in das spannende Thema, für die Hilfe bei der Versuchsdurchführung, für die unermüdliche und motivierende Unterstützung, für die wertvollen Ratschläge und die wiederholte Durchsicht der Manuskripte.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler bedanke ich mich für die Vergabe des Dissertationsthemas.

Herrn Prof. Ulrich Pohl danke ich für die Überlassung der Räumlichkeiten im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München.

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

Meinen großen Dank möchte ich Frau Dr. med. vet. Tanja Mayr aussprechen, für ihre geduldige Einweisung in das Forschungsgebiet, ihre herzliche Integration in die Arbeitsgruppe und für die wiederholte Korrektur meiner Entwürfe.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Bauer danke ich für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und für die Durchsicht der Ergebnisse.

Besonders möchte ich mich bei Frau Silvia Adam-Neumair bedanken für die Hilfe bei der Erstellung der immunhistochemischen Präparate am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität.

Für die Bearbeitung der serologischen Proben und die Bereitstellung der Laborparameter bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Daniel Teupser vom Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern.

Ein Dankeschön möchte ich Herrn Dr. Jürgen Peters für die Hilfe bei den statistischen Analysen in dieser Arbeit aussprechen.

Bei den Tierpflegern des Instituts für Chirurgische Forschung möchte ich mich für ihre fürsorgliche Versorgung der Versuchstiere bedanken.

Auch bei Frau Dr. med. Sonja Güthoff möchte ich mich für Ihre Ratschläge und Ihre Unterstützung bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Katja Gahle und Fabian Werner für die kollegiale Zusammenarbeit und die tolle gemeinsame Zeit.

Zuletzt gilt mein großer Dank meiner Familie für die großzügige moralische und finanzielle Unterstützung während meiner universitären Ausbildung. Insbesondere möchte ich mich bei Ron Regenauer für seine Geduld und Durchsicht meiner Dissertation bedanken.



## 9 Anhang

### 9.1 Verzeichnis der Abkürzungen

#### 9.1.1 Messeinheiten

C°	Grad Celcius
J	Joule
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
min	Minute
cm	Zentimeter

#### 9.1.2 Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin Complex
α-Gal	Galactose-α1-3-Galactose-Epitop
A. pulmonalis	Arteria pulmonalis
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AHXR	Akute humorale Abstoßung

ACXR	Akute zelluläre Abstoßung
BE	Base excess
$C_aO_2$	Koronarer Sauerstoffgehalt
$C_vO_2$	Koronarvenöser Sauerstoffgehalt
CI	Cardiac index, Herzindex
CK-MB	Kreatinkinase Isoenzym MB
CVF	Cobra Venom Factor
DAF	Decay-accelerating factor
$DO_2$	Sauerstoffangebot
EKG	Elektrokardiographie
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HAR	Hyperakute Abstoßung
Hb	Hämoglobinwert
hCD46	Humanes Cluster of differentiation 46
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheiten
LDH	Laktatdehydrogenase
MAC	Membranangreifender Komplex
MBL	Mannosebindende Lektin
NaCl	0,9 %-Natrium-Chlorid-Lösung
NTPDase	Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase
$O_2$	Sauerstoff
PBMCS	Peripheral Blood Mononuclear Cells

pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
SEM	Standard error of the mean
SWI	Stroke-work-index; Schlagarbeitsindex
TBS	Tris buffered saline
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
T <sub>regs</sub>	IL-10 sezernierende regulatorische T-Zellen
VO <sub>2</sub>	Sauerstoffverbrauch
WBEX	Walter-Brendel-Zentrum
WT	Deutsche Landrasseschweine vom Wild Typ

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Die Komplementkaskade mit klassischem, alternativem und Lektinweg. ....	15
<b>Abbildung 2:</b> hCD46 Struktur. ....	16
<b>Abbildung 3:</b> Kanülierung des Herzens. ....	21
<b>Abbildung 4:</b> Das Perfusionssystem. ....	22
<b>Abbildung 5:</b> Perfusion nach Langendorff. ....	24
<b>Abbildung 6:</b> Working-Heart-Perfusion. ....	25
<b>Abbildung 7:</b> Zeitpunkte im Versuchsverlauf. ....	27
<b>Abbildung 8:</b> Mittelwerte der Herzindices in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; * p <sub>WT autolog-hCD46</sub> = 0,04, ** p <sub>WT autolog-WT xenogen</sub> = 0,001, * p <sub>WT xenogen-hCD46</sub> = 0,04. ....	37
<b>Abbildung 9:</b> Verlauf des Herzindex in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe (keine statistische Auswertung). ....	38

<b>Abbildung 10:</b> Mittelwerte des Schlagarbeitsindex in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; * p= 0,02 .....	39
<b>Abbildung 11:</b> Mittelwerte des Koronarflusses in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe.....	40
<b>Abbildung 12:</b> Verlauf des Koronarflusses in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe .....	40
<b>Abbildung 13:</b> Mittelwerte der Laktatkonzentrationszunahme (zwischen T0 und T8) in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; ** p <sub>WT autolog-hCD46</sub> = 0,006, ** p <sub>WT autolog-WT xenogen</sub> = 0,005 .....	41
<b>Abbildung 14:</b> Verlauf des Laktats in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe .....	42
<b>Abbildung 15:</b> Mittelwerte des Sauerstoffverbrauchs in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; * p= 0,047 .....	43
<b>Abbildung 16:</b> Verlauf der CK-MB in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe .....	44
<b>Abbildung 17:</b> Verlauf der GOT in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe .....	44
<b>Abbildung 18:</b> Verlauf der LDH in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe .....	45
<b>Abbildung 19:</b> Verlauf des Harnstoffs in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe .....	46
<b>Abbildung 20:</b> Mittelwerte der prozentualen Gewichtszunahme in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; * p= 0,02 .....	47
<b>Abbildung 21:</b> Semiquantitative Auswertung der C4d-Ablagerung in xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; * p= 0,04 .....	48
<b>Abbildung 22:</b> Autologes WT-Präparat nach C4d-Färbung in 20-facher Vergrößerung.....	48
<b>Abbildung 23:</b> Xenogenes hCD46-Präparat nach C4d-Färbung in 20-facher Vergrößerung...	49

**Abbildung 24:** Xenogenes WT-Präparat nach C4d-Färbung in 20-facher Vergrößerung. .... 50

**Abbildung 25:** Mittelwerte der C5b-9-Ablagerung in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \* p= 0,0197, \*\* p= 0,0012 ..... 51

**Abbildung 26:** Autologes WT-Präparat nach C5b-9-Färbung in 20-facher Vergrößerung. .... 51

**Abbildung 27:** Xenogenes hCD46-Präparat nach C5b-9-Färbung in 20-facher Vergrößerung. 52

**Abbildung 28:** Xenogenes WT-Präparat nach C5b-9-Färbung in 20-facher Vergrößerung. .... 53

**Abbildung 29:** Mittelwerte der IgM-Ablagerung in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe; \*  $p_{WT\ autolog - WT\ xenogen} = 0,0179$ , \*  $p_{WT\ autolog - hCD46} = 0,026$  ..... 54

**Abbildung 30:** Autologes WT-Präparat nach IgM-Färbung in 20-facher Vergrößerung. .... 54

**Abbildung 31:** Xenogenes hCD46-Präparat nach IgM-Färbung in 20-facher Vergrößerung. ... 55

**Abbildung 32:** Xenogenes WT-Präparat nach IgM-Färbung in 20-facher Vergrößerung. .... 56

**Abbildung 33:** Mittelwerte der gezählten CD45-positiven Leukozyten in autologer WT-, xenogener hCD46- und xenogener WT-Gruppe. .... 57

**Abbildung 34:** Autologes WT-Präparat nach CD45-Färbung in 10-facher Vergrößerung. .... 57

**Abbildung 35:** Xenogenes hCD46-Präparat nach CD45-Färbung in 10-facher Vergrößerung. 58

**Abbildung 36:** Xenogens WT-Präparat nach CD45-Färbung in 10-facher Vergrößerung. .... 58

### 9.3 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Primärantikörper nach IHC-Protokoll ..... 33

**Tabelle 2:** Sekundärantikörper nach IHC-Protokoll ..... 34

**Tabelle 3:** Negativkontrollen ..... 34

**Tabelle 4:** Positivkontrollen ..... 35

**Tabelle 5:** Wertungssystem der histologischen Untersuchung ..... 35

## **9.4 Lebenslauf**

Stephanie Amalie Wilhelmina Andrea Maria Vandewiele

Geburtsdatum: 20.02.1991

Geburtsort: Mersch / Luxemburg

### **Berufserfahrung**

Seit April 2017 Facharztausbildung Kinder- und Jugendmedizin am Dr. von Haunerschen Kinderspital (LMU)

### **Praktisches Jahr**

Innere Medizin: MUHC McGill University Montreal

Innere Medizin: Barts Heart Centre London

Chirurgie: Stadtspital Triemli Zürich

Kinder- und Jugendmedizin: Dr. von Haunersches Kinderspital München

### **Bildungsweg**

Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München Oktober 2010 bis Dezember 2016

- 3. Staatsexamen im Dezember 2016
- 2. Staatsexamen im Oktober 2015
- 1. Staatsexamen im September 2012

Erlangung der Hochschulreife am Lycee Michel Rodange Luxemburg im Juli 2010

Grundschule Ecole Jean-Marx Mamer, Luxemburg September 1997 bis Juli 2003

## 10 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Xenogene ex-vivo Perfusion von transgenen hCD46 Schweinen“

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

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

München, den 4. Mai 2020

Stephanie Vandewiele