Der „Combi-Effekt“ im xenogen diskordanten Kleintiermodell, eine tierexperimentelle Untersuchung.

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Niemann, Frank Antonius
aus Coesfeld

Gießen 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Klinik für Allgemein- ,Viszeral- , Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie

Direktor:
Prof. Dr. med. Winfried Padberg
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD. Dr. med. Kelm

Gutachter: Prof. Dr. med. Bein

Tag der Disputation: 09.12.2004

Meinen Eltern
Anni und Rudolf Niemann
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung **1**

B. Problemstellung und Zielsetzung **10**

C. Materialien und Methodik **11**

1. Transplantationsmodell 11
    - 1.1. Versuchstiere 11
    - 1.2. Operationstechnik 11

2. Medikamente 21
    - 2.1. Tacrolismus (FK 506) 21
    - 2.2. Cobra-Venom-Faktor (CVF) 22
    - 2.3. Cyclophosphamid (CP) 23

3. Versuchsaufbau 24
    - 3.1. Vorversuche 24
    - 3.2. Hauptversuche 24

4. Messparameter 25
    - 4.1. Serumwerte 25
    - 4.2. Histologie und Immunhistologie 32

5. Versuchsgruppen 35

6. Statistik 35

D. Ergebnisse **37**

1. Vorversuche 37
    1.1. Splenektomie 38

2. Isogene Transplantation 39
    2.1. Serumwerte 39
    2.2. Histologie und Immunhistologie 40

3. Xenogene Transplantation ohne Immunsuppression 41
    3.1. Überlebenszeit 41
    3.2. Serumwerte 41
    3.3. Histologie und Immunhistologie 46

4. „Combi-Effekt“ und Immunsuppression 50

    4.1. Tacrolismus (FK 506) 50
        4.1.1. Überlebenszeit 50
        4.1.2. Serumwerte 50
        4.1.3. Histologie und Immunhistologie 55

    4.2. Cobra-Venom-Faktor (CVF) 55
        4.2.1. Überlebenszeit 55
        4.2.2. Serumwerte 56
        4.2.3. Histologie und Immunhistologie 57

    4.3. Cyclophosphamid (CP) 58
        4.3.1. Überlebenszeit 58
        4.3.2. Serumwerte 59
        4.3.3. Histologie und Immunhistologie 59

    4.4. Splenektomie (SPx) 60
        4.3.4. Überlebenszeit 60

4.3.5. Serumwerte 61
4.3.6. Histologie und Immunhistologie 62

4.5. Zusammenfassung 62

5. Spezifität des „Combi-Effektes“ 64

5.1. Doppelherz-Transplantation 64
5.1.1. Überlebenszeit 64
5.1.2. Serumwerte 65
5.1.3. Histologie und Immunhistologie 68

5.2. Kombinierte Herz-Nieren- und Herz-Lungen-Nieren-Transplantation 69
5.2.1. Überlebenszeit 69
5.2.2. Serumwerte 70
5.2.3. Histologie und Immunhistologie 70

E. Diskussion 74

F. Zusammenfassung, Summary 89

G. Literaturverzeichnis 95

H. Anhang: Daten und Tabellen 109

I. Danksagung 118

Erklärung zur Dissertation:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe, und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Abgaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig –Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Höxter 2004,

Frank Niemann

Abkürzungsverzeichnis

HTx	isolierte Herztransplantation
HLTx	kombinierte Herz-Lungen-Transplantation
HLTx-P	kombinierte Herz-Lungen-Transplantation, Blutentnahme peripher
HLTX-Z	kombinierte Herz-Lungen-Transplantation, Blutentnahme zentral
HNTx	kombinierte Herz-Nieren-Transplantation
HLNTx	kombinierte Herz-Lungen-Nieren-Transplantation
HLNTx-P	kombinierte Herz-Lungen-Nieren-Transplantation Blutentnahme peripher
HLNTx-Z	kombinierte Herz-Lungen-Nieren-Transplantation Blutentnahme zentral
DHTx	Doppel-Herz-Transplantation
CP	Cyclophosphamid
CVF	Cobra-Venom-Faktor
CSA	Cyclosporin A
FK-506	Tacrolismus
SPx	Splenektomie
d	Tag
IL-2	Înterleukin-2
h	Stunde
min.	Minute
n.s.	nicht signifikant
präop.	präoperativ

A. Einleitung

Bei Patienten deren Organe durch Krankheit oder infolge eines Unfalls irreversible Schäden erlitten haben, hat sich die Organtransplantation als Mittel der Wahl zunehmend etabliert. Sie ermöglicht in vielen Fällen dem Patienten ein Leben mit hoher Lebensqualität. Im Zuge dieser Entwicklung ist das Verständnis für transplantationsimmunologische Zusammenhänge umfassender geworden. Insbesondere die chirurgischen Operationstechniken, Gewebstypisierungen und die Organerhaltung durch eine immunsuppressive Medikation wurden verfeinert. Trotz all dieser Bemühungen bleiben viele Probleme akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen ungeklärt.

Bereits im Jahre 1906 transplantierte Jaboulay in Frankreich eine Schweineniere auf einen Patienten (50). Damals wie heute konnte diese Form der Transplantation, eine Transplantation zwischen nicht verwandten Spezies, aufgrund schwerster unbeherrschbarer Abstoßungsreaktionen nicht zum Erfolg führen.

Man erkannte, dass die allogene Transplantation, die Transplantation innerhalb einer Spezies, aber von genetisch verschiedenen Individuen, erfolgversprechender wäre. Die Behandlung akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen nach allogener Transplantation hat sich kontinuierlich verbessert.

Die immunsuppressive Behandlung der Abstoßung nach allogener Transplantation ist aber weiter verbesserungswürdig, nicht zuletzt wegen der zum Teil erheblichen Nebenwirkungen für den Patienten. Selbst wenn die akute Abstoßungsreaktion erfolgreich therapiert wird, liegt das Risiko für einen chronischen Transplantatschaden zwischen 15%-25% (31).

Tab.1: Überblick über die Transplantationsaktivitäten im Eurotransplant-Bereich vom 1. Januar – 31. Dezember 2001 (22)

a)

	Niere		Leber		Split-Leber		Pankreas + Niere	
	2000	**2001**	**2000**	**2001**	**2000**	**2001**	**2000**	**2001**
Österreich	357	362	135	123	12	1	30*e*	28*a*
Belgien/Lux	468	388	186	202	8	3	31*f*	25*b*
Deutschland	1874	1963	603	595	88	64	248*g*	220*c*
Niederlande	387	360	118	107	8	2	20*h*	24*d*
Slowenien	44	47	10	9	0	0	0	0
Sonstige	10	4	2	2	0	0	0	0
Total	3158	3124	1054	1038	116	70	329	297

a: nur: 7 Pankreas
b: nur: 2 Pankreas
c: nur: 18 Pankreas
d: nur: 1 Pankreas
e: nur: 1 Pankreas
f: nur: 2 Pankreas
g: nur: 16 Pankreas
h: nur: 2 Pankreas

b)

	Herz		Herz-Lunge		Lunge (doppelt)		Lunge (einzeln)	
	2000	**2001**	**2000**	**2001**	**2000**	**2001**	**2000**	**2001**
Österreich	85	62	2	2	27	29	28	28
Belgien/Lux	84	80	6	4	24	29	10	14
Deutschland	406	395	11	13	92	96	48	29
Niederlande	39	35	1	2	12	18	3	7
Slowenien	7	4	0	0	0	0	0	0
Sonstige	3	5	0	0	0	2	2	0
Total	624	581	20	21	155	174	91	78

Tab.2: Übersicht über die in Deutschland durchgeführten Transplantationen in den Jahren 2002 und 2003 (31)

	Niere		Pankreas + Niere		Herz	
	2002	**2003**	**2002**	**2003**	**2002**	**2003**
Warteliste	9623	9479	150	117	359	473
Transplantationen	1882	2111	140	173	395	374

	Herz + Lunge		Lunge		Leber	
	2002	**2003**	**2002**	**2003**	**2002**	**2003**
Warteliste	36	37	347	397	994	1266
Transplantationen	15	20	199	192	667	772

(Lebertransplantationen inclusive Splitleber)

Die Erfolge der allogenen Transplantation mit 1-Jahresfunktionsraten der transplantierten Organe von bis zu 90% (Tab.1 a,b und 2), führten zu einer kontinuierlichen Zunahme der Transplantationen. Durch den bestehenden Organmangel, bei gleichzeitig vermehrter Indikationsstellung, erhöhte sich zwangsläufig die Wartezeit für die Patienten. Die ständig verbesserte Organisation von Organbanken hat zwar die Verteilung der vorhandenen Organe wesentlich vereinfacht, kann aber an der Problematik der Organknappheit dennoch nichts ändern.

Eine Möglichkeit, diesem Problem zu begegnen, ist die Verwendung von Xenotransplantaten. Bereits heute werden in der Kardiochirurgie denaturierte Schweineherzklappen „Xenografts“ verwendet. Ebenso ist die Verwendung von Schweinehaut zum Decken größerer Hautdefekte bei Verbrennungspatienten weit verbreitet und die subkutane Injektion von Schweineinsulin beim diabetischen Patienten ist inzwischen Routine.

Bei der Auseinandersetzung mit dem Thema der Xenotransplantation gilt es zwei Dinge zu beachten:
1. Xenotransplantation ist nicht gleich Xenotransplantation und *2.* klinische Xenotransplantationen haben längst begonnen und sind keine Zukunftsvisionen mehr (36).

Innerhalb der Xenotransplantation muß, zwischen der Übertragung vaskularisierter Organe (Herz, Niere, Leber, Pankreas, Lunge) und der Übertragung kleiner Gewebe- und Zellverbände (Nervenzellen, Langerhanszellen, Nebenschilddrüsen) unterschieden werden. Vaskularisierte Organe benötigen den Wiederanschluß an versorgende Blutgefäße und werden dann vom Blut des Empfängers durchströmt und mit Nährstoffen versorgt. Nervenzellen, Langerhansinselzellen und Nebenschilddrüsen benötigen keinen Gefäßanschluß und werden durch einfachen Stoffaustausch von Zelle zu Zelle ernährt und mit Sauerstoff versorgt (Tab.3).
Dieser entscheidende Unterschied verursacht unterschiedlich starke immunologische Abwehrreaktionen, die wiederum unterschiedliche Konzepte zur Immunsuppression erfordern. Gewebe und Zellen sind vor einer Transplantation in vitro manipulierbar, also in ihrer Immunogenität (immunologische Fremdheit) reduzierbar.

Tab.3: Immunreaktionen nach xenogener Transplantation vaskularisierter Organe und nicht vaskularisierter Zellen und Gewebe und Strategien sie zu verhindern (101)

Art der Immun-reaktion	**Zeitpunkt ihres Auftretens**	**Betroffenes Organ/Gewebe**		**Praeventions-strategien**
		Vaskularisiert: z.B. Herz, Niere, Leber Pankreas, Lunge, Dünndarm	**Nicht – Vaskularisiert: z.B. Langerhansinseln, Neuronen, Hepatozyten, Nebenschilddrüsen**	
Hyperakute Abstoßung (verursacht durch Antikörper und Komplement, oder Komplement allein)	Minuten bis Stunden	Ja	Nein	1.Genetisch veränderte Spendertiere 2. Antikörper-Ab-sorptionstechniken 3. Neue immun-suppressive Pharmaka 4. Konzepte zur Induktion von Toleranz
Akute vaskuläre Abstoßung (verursacht durch Antikörper und Komplement)	Tage	Ja	Ja	Siehe 1-4 oben 5. Mikrover-kapselung von Geweben und Zellen
Akute zellvermittelte Abstoßung (verursacht durch unterschiedliche Zelltypen)	Tage	Ja	Ja	Siehe 1-5 oben
Chronische Abstoßung (verursacht durch unspezifische und Xeno-antigen-spezifische Faktoren)	Wochen, Monate, Jahre	Ja	???	Noch nicht verfügbar

Ein Problem der klinisch-experimentellen Xenotransplantation sind die damit verbundenen ethischen Bedenken. Viele Patienten könnten sich mit der Vorstellung der (Teil)- Transplantation eines tierischen Organs nur sehr schwer oder auch gar nicht abfinden. Neben den ethischen Bedenken stellt auch die mögliche Übertragung von tierischen Pathogenen auf den Menschen, insbesondere porziner endogener Retroviren bei Xenotransplantaten vom Schwein, ein weiteres Problem da (36,41,42,75).
Das Risiko der Übertragung von artfremden Pathogenen, besonders des mit Leukämie assoziierten porcinen endogenen Retrovirus (PERV), auf den Menschen, bleibt unklar (89). Die Erbinformationen des PERV sind im porcinen Genom permanent integriert und können bei einem Befall von Keimzellen vererbt werden (96). Obwohl eine Übertragung auf den Menschen bisher nicht nachgewiesen werden konnte (45,78), wurde die Übertragbarkeit von PERV aus porcinen Zellen auf menschliche Zellen in vitro (77,96,104,113) und auf xenotransplantierte diabetische Mäuse in vivo (104) bereits gezeigt.

Das Hauptproblem der klinisch-experimentellen Xenotransplantation aber ist die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR-: Hyper Akute Rejection) (5,9,10,22,39).

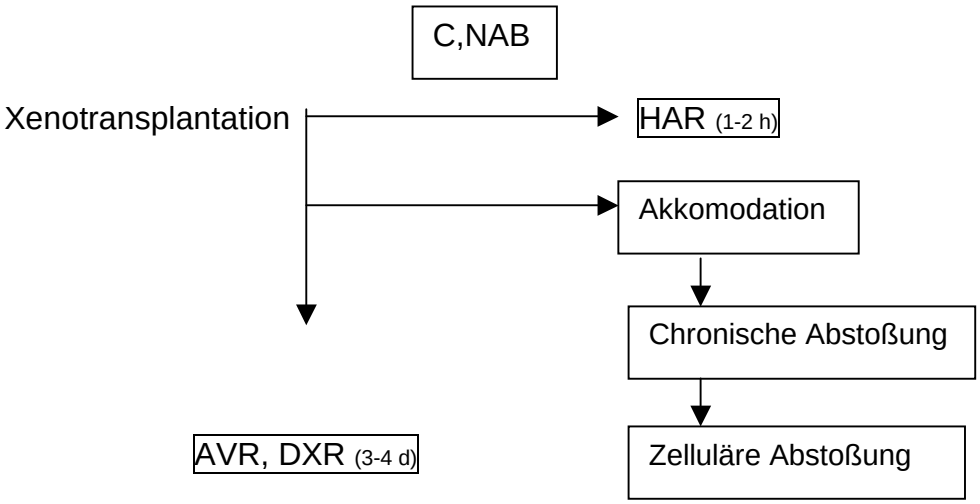
Nach Calne wird die Abstoßungsreaktion nach xenogener Transplantation, abhängig vom Ablauf der Abstoßung, in eine konkordante und eine diskordante Abstoßung unterteilt (18):
Die diskordante Abstoßung zwischen gering verwandten Spezies ist charakterisiert durch eine innerhalb von wenigen Minuten auftretende HAR.
Die HAR ist Folge der Bildung natürlicher Antikörper gegen Kohlenhydratepitope, die auf Zellen phylogenetisch weit entfernter (diskordanter) Arten expremiert werden (88,99).
Sie ist komplementabhängig und beruht auf der Bildung von gerinnungsfördernden und plättchenaggregierenden Substanzen durch Endothelzellen (88). Klassische Beispiele diskordanter Transplantationen sind die Transplantationen Schwein auf Mensch und Meerschweinchen auf Ratte.

Die xenogene diskordante Abstoßungsreaktion wird in 3 Phasen unterteilt (7,11,43,61,80,81,88) (Abb.1):

1. die *hyperakute Abstoßungsreaktion*, die nach wenigen Minuten entsteht
2. die *akute vaskuläre Abstoßung (AVR= acute vascular rejection);* wird verzögert nach Supprimierung der Komplementaktivierung und der natürlichen Antikörper beobachtet,
3. eine *Akkomodation;* nach abgelaufener Akutphase bleibt das Transplantat trotz Rückkehr der natürlichen Antikörper funktionsfähig,

Wenn die hyperakute Abstoßungsreaktion überstanden wird kann sich eine *zelluläre und chronische Abstoßung* anschließen. Diese ist vergleichbar mit der Abstoßung nach allogener Transplantation, nur wesentlich stärker ausgeprägt.

Abb.1: Ablauf der xenogenen diskordanten Abstoßung (C= Komplement, NAB= natürliche Antikörper, AVR= acute vascular rejection, DXR= delayed xenogenic rejection, HAR= hyperacute rejection)



modifiziert nach Platt (81)

Auf den Menschen bezogen wäre der Schimpanse für eine konkordante Xenotransplantation der am besten geeignete Spender. Bei der konkordanten Abstoßung zwischen eng verwandten Spezies, ohne natürliche Antikörper, wie zum Beispiel Hamster-Ratte und Schimpanse-Mensch, lässt sich die hyperakute Abstoßung nicht beobachten. Noch bis in die 90er Jahre hinein waren daher Affen, als dem Menschen eng verwandte Tiere die bevorzugten Spender von Organen für die klinische Xenotransplantation. Ethische Erwägungen, Artenschutz, hohe Kosten für Zucht und Haltung und das Risiko, mit den Organen auch gefährliche Krankheiten vom Affen auf den Menschen zu übertragen- HIV ist hierfür wahrscheinlich ein Lehrbeispiel- machten dieses Konzept recht bald obsolet.

An die Stelle der Primaten trat das Schwein, dessen Verwendung, da es sich um ein zum Verzehr gezüchtetes Nutztier handelt, auch heute als ethisch unbedenklich gilt (99). Seine Physiologie ähnelt der des Menschen, so unterscheidet sich das porzine Insulin lediglich in einer Aminosäure vom humanen Insulin. Porzine Organe könnten in belieber Zahl und gleichbleibender Qualität gezüchtet werden, die Kosten für Zucht und Haltung sind vergleichsweise gering, zumindest solange, wie die Tiere zum Zwecke der klinischen Xenotransplantation nicht unter Barrierebedingungen gehalten werden müssen.

Aus immunologischer Sicht ist das Schwein jedoch die ungünstigere Wahl. Es weist eine größere immungenetische Distanz zum Menschen auf als die dem Menschen näher verwandten Primaten, weshalb porzine Organe vom menschlichen Körper immunologisch sehr viel heftiger attakiert werden als die Organe vom Affen. (29,30,47).

Aus der klinischen Praxis der Transplantationschirurgie ist bekannt, dass die Abstoßungsreaktion der Herzen nach einer kombinierten Herz-Lungen-Transplantation weniger stark abläuft als nach einer isolierten Herztransplantation (13,51). Experimentell konnte ein ähnlicher Effekt nach allogener Transplantation beobachtet werden (108,58). Dieser Effekt wurde von Westra „Combi-Effekt“ genannt. Die Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit zeigte sich mit und ohne gleichzeitige Cyclosporin A Medikation (110).

Der Versuch, diesen Effekt auch im xenogen konkordanten Modell, Hamster-Ratte, nachzuweisen, gelang nicht. Ganz im Gegenteil, es zeigte sich sogar eine Verkürzung der Transplantatüberlebenszeit nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation (116).

Diese überraschende Beobachtung hat mich zur Durchführung dieser Arbeit veranlaßt. Ich stellte mir die Frage, ob sich der „ Combi-Effekt“ auch im xenogen diskordanten Kleintiermodell nachweisen lässt; und in wie weit das transplantierte Lungengewebe eine spezifische ursächliche Bedeutung hierbei einnimmt.

B. Problemstellung und Zielsetzung

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

1. *Untersuchung des Effektes einer simultanen Lungentransplantation* auf die Herztransplantatüberlebenszeit im Meerschweinchen-Ratte-Modell.

2. *Überprüfung der Hypothese*, dass der protektive Effekt (bezogen auf die Herztransplantatüberlebenszeit) der simultanen Lungentransplantation, auch unter immunsuppressiver Therapie nachweisbar ist.
Hierzu wurden xenogen diskordante kombinierte Herz-Lungen-Transplantationen nach Gabe von: Tacrolismus, Cyclophosphamid, Cobravenom-Faktor und nach Splenektomie durchgeführt.

3. *Überprüfung, in wie weit das transplantierte Lungengewebe selbst* für die Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit verantwortlich ist.
Um diese Frage zu klären, transplantierte ich anstelle der Lunge, ein zweites Herz, eine Niere, oder Niere und Lunge.

C. Materialien und Methoden

1.Transplantationsmodell

Alle Tierversuche waren gemäß § 8 Absatz 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt. Die Empfehlungen der tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V. wurden eingehalten.

1.1. Versuchstiere und Tierhaltung

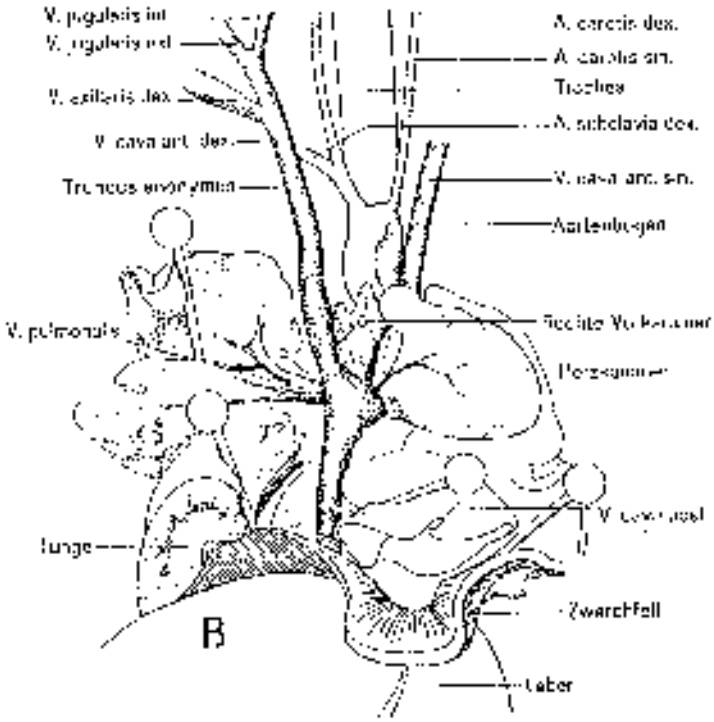
In allen Experimenten wurden männliche Inzuchtratten (Lewis-Ratten, S.P.F.-Ratten, Lew, SsNHsd) mit einem mittleren Gewicht von 180-250g verwendet. Lewis-Ratten dienten als Empfänger der Herz-, Herz-Lungen- und Nierentransplantate (bei den isogenen Vorversuchen auch als Spender der Herz-, bzw. Herz-Lungen-Transplantate), männliche Meerschweine (S.P.F.-Meerschweinchen, Auszuchtstamm, Dunkin-Hartley-Pirbright White, Full Barrier, HsdPoc:DH) mit einem mittleren Gewicht von 200-250g, als Spender der Transplantate. Alle Versuchstiere wurden von Harlan-Winkelmann, (Borchen, Deutschland), bezogen.
Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer in Gruppen von 4 Tieren pro Käfig, in einem klimatisierten Tierstall mit konstantem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Während der gesamten Haltung wurden die Tiere mit einer Fertignahrung und mit Trinkwasser ad libitum ernährt.

1.2. Operationstechnik

Alle operativen Eingriffe erfolgten in einer Äthernarkose. Die Tiere wurden zunächst in einer mit Äther angereicherten Glaskammer betäubt. Für die Dauer der Operation wurde die Narkose mit Hilfe eines Zentrifugenröhrchens (50ml), das mit Äther getränkte Kompressen enthielt, welches ich über Maul und Nase stülpte , aufrechterhalten.

Bei allen operativen Eingriffen verwendete ich gereinigte, nicht sterilisierte, chirurgische und mikrochirurgische Instrumente. Die Gefäßanastomosen nähte ich mit Hilfe einer Lupenbrille (Opti-Visor, Donegan Optical Company, Lenaxa, KA, USA; Vergrößerung 2,5fach). Zum Anschlingen der Gefäße wurden 4/0 Seidenfäden und zur Naht der Gefäßanastomosen 7/0 Polypropylenfäden (Ethicon, Sommerville, NJ, USA) benutzt. Der Bauchverschluß erfolgte zweizeitig mit 3/0 Vicryl (Ethicon, Sommerville, NJ, USA). Direkt praeoperativ wurden die narkotisierten Tiere im Bereich des Op-Gebietes rasiert und die Haut mit Alkohol desinfiziert (Empfänger: Abdomen, Spender: Thorax und Abdomen).

Abb.2:Übersicht über die Anatomie der intrathorakalen Organe der Ratte



Herz und Gefäßstamm der Ratte. Die Lungenlappen sind seitlich festgesteckt. Das Herz ist nach links aus seiner Normallage herausgezogen und dabei so um die Längsachse gedreht, daß ein Teil seiner Dorsalseite sichtbar wird. (Modifiziert nach Biologie-Script, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Isolierte Herztransplantation (Htx), Spenderorganentnahme und Transplantation:

Es wurde die von Ono und Lindsay (74) beschriebene Technik der heterotopen Herztransplantation in leicht modifizierter Form angewandt (4).
Nach medianer Laparatomie der Empfängerratte, verlagerte ich die Darmschlingen in den linken Oberbauch und präparierte dann die Vena cava inferior sowie die Aorta abdominalis. Beide Gefäße wurden kaudal der Nierengefäßabgänge und proximal der Iliakalbifurkation mit 4/0 Seide angeschlungen und mit Klemmen in der Muskulatur fixiert. Um eine sichere Blutleere im arteriellen Anastomosenbereich zu gewährleisten, setzte ich einen Gefäßklipp kaudal der Nierenarterien auf die Aorta abdominalis . Dann erfolgte eine etwa 0,7 Zentimeter lange Längsinzision der Aorta abdominalis und in die Schnittenden wurden 7/0 Polyppropylenfäden, von innen nach außen, eingebracht.
Nun erfolgte die Spenderorganentnahme. Eine Übersicht über die Anatomie des Ratten-Thorax gibt die Abbildung 2.
Nach Sternotomie und Hochklappen der ventralen Brustwand, erfolgte die Thymektomie und Eröffnung des Pericards. Als nächstes ligierte ich die Vena cava superior direkt vor ihrer Einmündung in den rechten Vorhof und die Venae pulmonales kurz vor der Einmündung in den linken Vorhof. Nach Absetzen von Aorta ascendens und Arteria pulmonalis, erfolgte die Spülung des Herzens, über die Aorta und die Arteria pulmonalis mit 8ml 4℃ kalter Ringerlösung. Mit dieser Spülung konnte das Blut aus den Vorhöfen, Kammern und Koronargefäßen entfernt werden. Bei dieser Maßnahme war peinlich darauf zu achten keine Luftembolien durch Luftblasen in der Spüllösung zu verursachen.

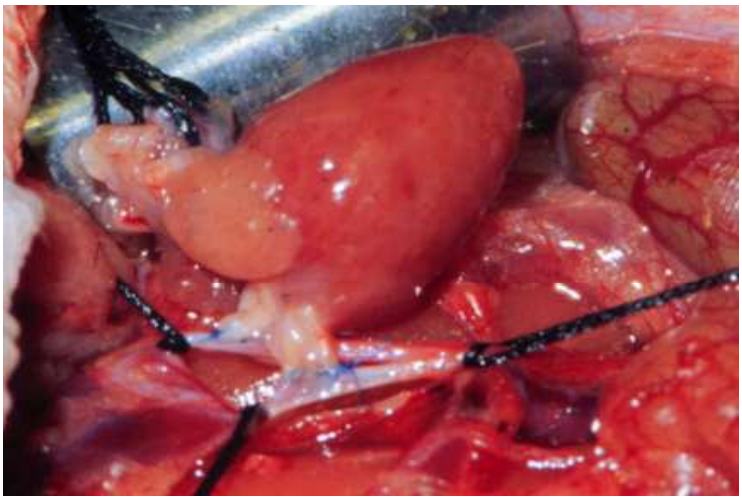
Das entnommene Meerschweinherz (Abb.3) wurde in das Abdomen des Empfängertieres hinein gelegt, und durch End-zu-Seit-Anastomosen an die Bauchgefäße angeschlossen (Aorta ascendens-Stumpf an Aorta abdominalis und Arteria pulmonalis-Stumpf an Vena cava inferior) (Abb. 4).
Nach Nähen der Anastomosen wurden zunächst die venösen Ligaturen (zuerst kranial, dann kaudal) gelöst. Eventuelle Blutungen sistierten in der

Regel nach Kompression mittels eines Wattestäbchens, so dann wurden die arteriellen Ligaturen und der Gefäßklipp entfernt, auch hier zunächst die kaudale Ligatur und dann die kraniale bzw. der Gefäßklipp.
Bei Bedarf erfolgte erneut eine Blutstillung mittels Kompression durch Wattestäbchen. Mit zunehmender Blutfüllung des Herzens, begann es nach wenigen Sekunden wieder zu schlagen. Je nach zu erwartender Überlebenszeit des transplantierten Herzens, verschloss ich das Abdomen in fortlaufender Nahttechnik in zwei Schichten.

Die durchschnittliche Operationsdauer betrug 45 Minuten, die Ischämiezeit des Transplantates im Mittel 15 Minuten.

Abb.3: Herztransplantat (Meerschweinchen) nach Entnahme und Vorbereitung zur Transplantation

Abb.4: Isolierte diskordante heterotope Herztransplantation, Übersicht des intraoperativen Situs nach Fertigstellung der Anastomosen



Kombinierte Herz-Lungen-Transplantation (HLtx), Spenderorganentnahme und Transplantation

Es wurde die von Lee (62) beschriebene Technik der heterotopen Transplantation, modifiziert nach Romangnoli, Fox-Montorsi, angewandt (34,63,87).

Die Vorbereitung des Empfängertieres wurde bereits bei der isolierten HTx beschrieben.

Bei der Entnahme von Herz und Lunge wurde beim Spendertier, durch Sternotomie und Hochklappen der ventralen Brustwand, das Herz freigelegt. (Abb 2). Nach Thymektomie und Eröffnung des Pericards ligierte ich die Vena cava superior kurz vor der Einmündung in den rechten Vorhof . Im Anschluß daran wurde die Aorta ascendens abgesetzt und eine Venenverweilkanüle (Vasoscan-Braunüle, 18G, B. Braun Melsungen AG) in der Vena cava inferior mittels 4/0 Seide fixiert. Jetzt erfolgte die Spülung des

Herzens und der Lunge durch den Aortenstumpf mit 10ml 4℃ kühler Ringerlösung unter Zusatz von 0,1ml Heparin (entspricht 1000 IE, Heparin-Natrium, Hoffmann-La Roche).

Durch die eingebrachte Braunüle konnte das Blut aus den Vorhöfen, Kammern, Koronargefäßen und der Lungenstrombahn entfernt werden. Beide Lungenflügel wurden durch diese Spülung hellrosa und das Effluat aus der Aorta klar.

Nach Entfernung der Braunüle aus der Vena cava inferior ligierte ich das Gefäß und setzte es ab, die Trachea wurde durchtrennt und die rechte Lunge (Bronchien und Gefäße) hilusnah ligiert und abgesetzt.

Das entnommene Transplantat, Herz und linke Lunge, (Abb.5) legte ich in das Abdomen des Empfängertieres und anastomosierte es mittels einer End-zu-Seit-Anastomose an die Aorta abdominalis (Abb.6,7). Nach Nähen der Anastomose entfernte ich zunächst die kaudale Ligatur und dann die kraniale bzw. den Gefäßklipp. Bei Bedarf erfolgte eine Blutstillung durch Kompression der Anastomose mit einem Wattestäbchen.

Das Herz begann nach wenigen Sekunden zu schlagen. Je nach zu erwartender Überlebenszeit wurde das Abdomen in fortlaufender Nahttechnik in zwei Schichten verschlossen. Die durchschnittliche Operationsdauer betrug 45 Minuten, die Ischämiezeit des Herz-Lungen-Transplantates im Mittel 15 Minuten.

Abb.5: Herz-Lungen-Transplantat (Meerschweinchen) nach Entnahme und Vorbereitung zur Transplantation

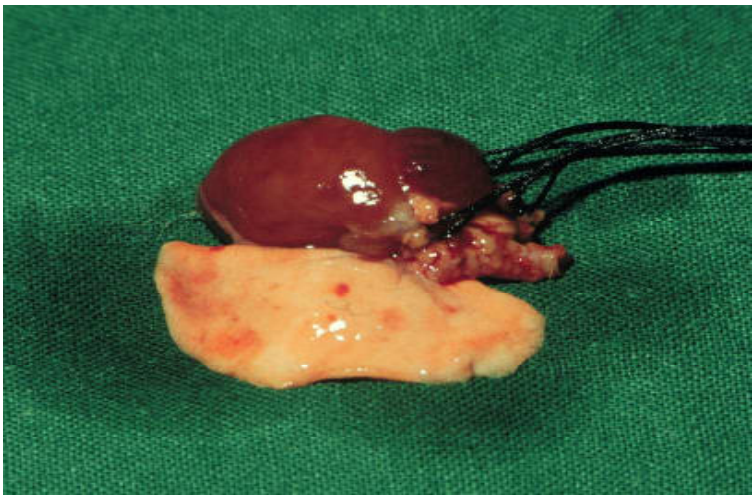


Abb.6: Kombinierte diskordante heterotope Herz-Lungen-Transplantation, Übersicht des intraoperativen Situs nach Fertigstellung der Anastomosen

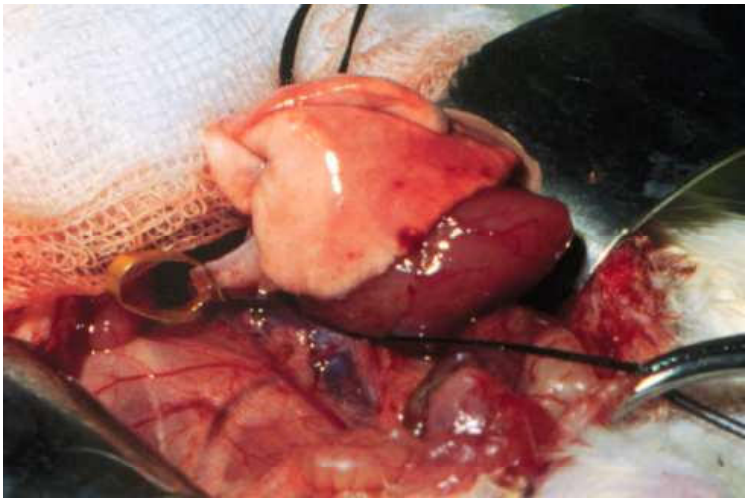
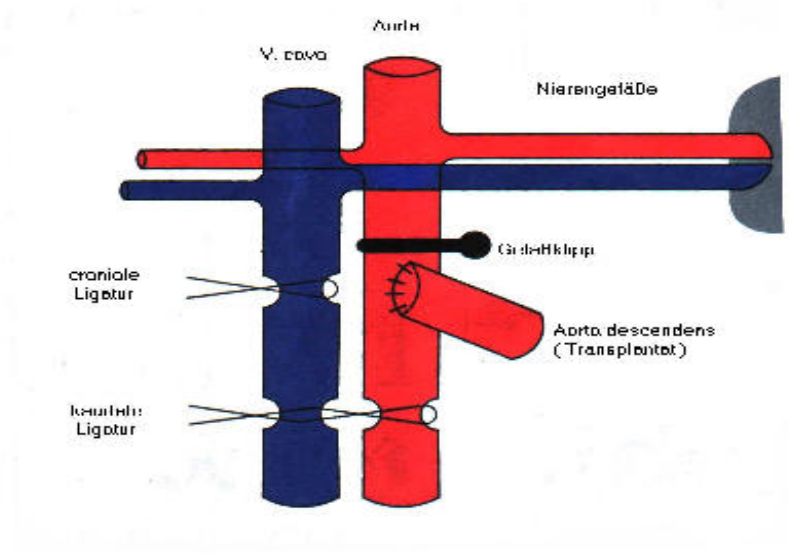


Abb.7: Schematische Übersicht, kombinierte diskordante Herz- Lungentransplantation



Kombinierte Herz-Nieren-Transplantation (HNtx), Spenderorganentnahme und Transplantation

Unter dem Operationsmikroskop (Zeiss Universal S3, Vergrößerung 12,5 fach) erfolgte die mediane Laparatomie des Meerschweinchens und die Präparation der Aorta abdominalis und der Vena cava inferior. Nach Darstellung der linken Arteria und Vena renalis wurden beide Gefäße abgangsnah mit 4/0 Seide ligiert und abgesetzt. Der Ureter wurde ebenfalls ligiert und durchtrennt. Anschließend spülte ich die Niere mit 10ml 4℃ kühler Ringerlösung, um das noch vorhandene Blut aus der Nierengefäßstrombahn zu entfernen. Bis zur Transplantation wurde die Niere in 4℃ kühler Rin - gerlösung aufbewahrt.

Zur selben Zeit entnahm ein zweiter Operateur bei der Empfängerratte die linke Niere. Nach Präparation der Nierengefäße und Entfernen des periva- salen Bindegewebes erfolgte die, möglichst weit distale, Absetzung der Nierengefäße. Nach Plazierung der Spenderniere im Abdomen anastomo- sierte ich die Nierengefäße End-zu-End mit 7/0 Polypropylenfäden mittels Einzelknopfnähten unter dem Operationsmikroskop. Abschließend wurde die

transplantierte Niere, unter Belassen der Gefäßligaturen, mit einem in gekühlter Ringerlösung getränkten Tupfer abgedeckt.

Direkt im Anschluß an die Transplantation der Niere erfolgte, wie bereits oben beschrieben (isolierte diskordante Herztransplantation), die Entnahme des Spenderherzens.
Zeitgleich bereitete ein zweiter Operateur das Empfängertier für die Herz-Nieren-Transplantation vor.
Nach Fertigstellung der Anastomosen wurde zunächst der Blutfluß zur Niere freigegeben. Dann löste ich die venösen Ligaturen. Eventuelle Sickerblutungen ließen sich mittels Kompression mit einem Wattestäbchen stillen. Alsdann entfernte ich die arteriellen Ligaturen und den Gefäßklipp, auch hier die kaudalen vor den kranialen. Etwaige Blutungen konnten gut durch Kompression mit einem Wattestäbchen gestillt werden.
Mit zunehmender Blutfüllung des Herzens begann es nach wenigen Sekunden zu schlagen und die Niere wurde zunehmend perfundiert. Die Operationsdauer betrug 90 Minuten, die Ischämiezeit der Niere im Mittel 35 Minuten, die des Herzens 15 Minuten.

Kombinierte Herz-Lungen-Nieren-Transplantation (HLNTx), Spenderorganentnahme und Transplantation

Die Operation erfolgte, wie die bereits im Abschnitt *kombinierte Herz-Nieren-Transplantation* beschrieben, nur das hier zusätzlich die linke Lunge mit transplantiert wurde (siehe hierzu auch den Abschnitt: Kombinierte Herz-Lungen-Transplantation). Die Operationsdauer betrug 90 Minuten, die Ischämiezeit der Niere im Mittel 35 Minuten, die des Herz-Lungen-Transplantates 15 Minuten.

Doppel-Herztransplantation (D-Htx), Spenderorganentnahme und Transplantation

Das Vorgehen bei der isolierten Herztransplantation wurde bereits beschrieben. Auch die doppelte Herztransplantation führte ich in der von Ono und Lindsay (74) beschriebenen Technik, in leicht modifizierter Form, durch. Während die Anastomosen des ersten Herzens fertiggestellt wurden, entnahm ein zweiter Operateur gleichzeitig einem zweiten Meerschwein das Herz, welches sodann kranial vom zuerst transplantierten Herzen implantiert wurde. Bis zur Fertigstellung aller Anastomosen wurde die Blutleere aufrecht erhalten und das Organ mit einem, in 4℃ kalter Ring erlösung getränkten, Tupfer abgedeckt.Schließlich entfernte ich die Ligaturen und den Gefäßklipp, wie bereits beschrieben. Mit zunehmender Blutfüllung begannen beide Herzen nach wenigen Sekunden zu schlagen. Die Operationdauer betrug 55 Minuten, die Ischämiezeit des zuerst transplantierten Herzens 25 Minuten, die des zweiten 15 Minuten.

Splenektomie

Nach medianer Laparatomie in Rückenlage, wurde die Milz mittels zweier Wattestäbchen mobilisiert und hervorluxiert, hilusnah mit 4/0 Seide ligiert und entnommen.
Anschließend wurde das Abdomen fortlaufend in zwei Schichten verschlossen.

Kontrolle der Transplantatfunktion

Die Kontrolle der Transplantatfunktion erfolgte intraoperativ visuell, wobei Kontraktionskraft und das Aussehen des Myokards, bzw. der Niere, berücksichtigt wurden. Eine Urinproduktion der transplantierten Niere wurde nicht erfaßt, bzw. gemessen.
Wie bereits oben beschrieben, erfolgte abhängig von der zu erwartenden Überlebenszeit des transplantierten Herzens, der Verschluß des Abdomens.

In diesem Fall erfolgte die Kontrolle der Transplantatfunktion durch Palpation des Abdomens. Ein Herz galt dann als abgestoßen, wenn sich keine Kontraktion mehr palpieren ließ und nach Laparatomie keine Kontraktion mehr sichtbar waren.

2. Medikamente

Um die hyperakute Abstoßung zu verlangsamen, wurden Tacrolismus (FK-506), Cobra Venom Faktor (CVF) und Cyclophosphamid eingesetzt, und auf ihre Wirkung hin überprüft.
Cobra Venom Faktor verlangsamt die hyperakute Abstoßung über die Inhibition der Komplementaktivierung, während Cyclophosphamid über eine Reduktion der präformierten natürlichen Antikörper wirkt (6,10,38,40,61,105).
Tacrolismus erreicht eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit durch Hemmung der Freisetzung von Interleukin 2 (102).

2.1. FK-506 Tacrolismus

Durch die Einführung von Cylosporin, und später von Tacrolismus (FK 506) zur Verhinderung der akuten Abstoßungsreaktion, erlangte die Transplantationsmedizin ihren heutigen Stellenwert.
Tacrolismus ist ein Makrolidantibiotikum und wird aus dem Bodenpilz Streptomyces tsukubaensis gewonnen (57,98).
Neben dem Cyclosporin, einem aus 11 Aminosäuren bestehendem lipophilen cyclischen Peptid, ist Tacrolismus der einzige therapeutisch eingesetzte Protein-Phosphatase-Inhibitor (92).
Tacrolismus besitzt einen spezifischen Angriffsort im Zytosol. Am stärksten wirkt es in den CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten, den antigenspezifischen Zellen.
Zur initialen T-Zell-Aktivierung bedarf es antigenaufbereitete Zellen (zum Beispiel Makrophagen), die nach vorangegangener Proteolyse, Antigenfragmente gemeinsam mit dem Histokompatibilitätskomplex (MHC)-II-Molekül präsentieren. Diese agieren mit dem antigenspezifischen Rezeptor

des T-Lymphozyten, der auf der Zelloberfläche gemeinsam mit einem CD4- und einem CD3-Glykoprotein lokalisiert ist. Beide Glykoproteine unterstützen die Antigenerkennung und intrazelluläre Signaltransduktion. Nach Rezeptorstimulation wird die Phopholipase C aktiviert, nachfolgend erfolgt die Freisetzung von den membranösen Phospholipiden Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) (35).
Diese beiden Botenstoffe sorgen für eine Aktivierung der Gen-Transkription. IP3 setzt Calcium aus zytosolischen Speichern frei welches zusammen mit dem Calmodulin Calcineurin, ein phophataseaktives Enzym, aktiviert.
Tacrolismus bindet sich an ein Bindungsprotein (FKBP-12), um kompetetiv eine Verbindung mit Calcineurin einzugehen und dessen Wirkung zu hemmen (35). Dadurch wird die Transkriptionsinduktion der mRNA für Interleukin 2 (IL2) gehemmt. Hierbei ist die Wirkung des Tacrolismus etwa 10-100 fach stärker ausgeprägt als beim Cylosporin. Erklärt wird dieser Effekt durch die wesentlich höhere Affinität des Tacrolismus zu FKBP-12 im Vergleich von Cylosporin zu Cyclophyllin (91).

Den Empfängertieren wurde 24 Stunden vor der Transplantation die gebrauchsfertige Lösung FK-506, in einer Dosierung von 1-2 mg/kg Körpergewicht, in den Oberschenkelmuskel injiziert. Die gewählte Dosierung führt nach allogener Transplantation zu ähnlich guten Ergebnissen wie 15-20 mg/kgKG Cyclosporin A (48,54,90,99).
Das bei den Versuchen verwendete Tacrolismus wurde von der Firma Fujisawa GmbH (P.O. Box 800628, 81606 München) zur Verfügung gestellt.

2.2. Cobra-Venom Faktor (CVF)

Das Gift der Kobraschlange enthält ein strukturelles und funktionelles Analogon des Komplementfaktors C3, den sogenannten Cobra Venom Faktor (CVF). Genau wie der Faktor C3 ist CVF in der Lage eine C3-Konvertase auszubilden, indem es den Faktor B bindet.
Nach Applikation wird nach kurzer initialer Stimulation die Komplementaktivierung unterdrückt. Da das Komplementsystem ein wesentlicher Be-

standteil der hyperakuten Abstoßung ist (19,20) wird durch Inhibition dieses Systems die Herztransplantatüberlebenszeit nach xenogener Herztransplantation wesentlich verlängert (1,64,78).
Die Applikation von CVF erfolgte 12 Stunden vor Durchführung der Transplantation, intravenös über die Penisvene, in einer Dosierung von 60 Units/kgKG. Diese Dosierung und die einmalige praeoperative Gabe von CVF wurden gewählt, da sie nach Candinas ähnlich gute Ergebnisse liefert wie die Gabe von zunächst 60 U/kgKG (12 Stunden, praeoperativ) und von anschließend 30 U/kgKG i.v. alle 24 Stunden nach Transplantation (19,20).
Das bei den Versuchen verwendete CVF (A 600, F 05701), wurde von der Firma Quiddel Autoimmune & Complement – Regional Office (p.O. Box 25, Betchworth, Surrey RH3 7YP, United Kingdom)- bezogen.

.

2.3. Cyclophosphamid

Cyclophosphamid gehört zu den alkylierenden Zytostatika. Durch kovalente Quervernetzung von DNA-Strängen kommt es zur Hemmung der Replikation aller sich teilender Zellen, nachfolgend zu Funktionsverlust und Zelltod.
Durch Cyclophosphamid wird die Zahl von T- und B- Lymphozyten gleichermaßen vermindert, so daß sowohl die humorale (Antikörperproduktion) als auch die zelluläre Immunreaktion, welche neben der Komplement Aktivierung hauptsächlich für die hyperakute Abstoßungsreaktion nach xenogener diskordanter Transplantation verantwortlich gemacht wird (6,38,40,61), beeinflusst.

Den Empfängertieren wurde 24 Stunden vor der Transplantation die gebrauchsfertige Lösung Cyclophosphamid, in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal injiziert. Ich wählte diese Dosierung , da im konkordanten Hamster-Ratte Modell eine deutliche Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit nach Applikation der oben beschriebenen Dosis erreicht werden konnte (19,20).
Das in den Versuchen verwendete CP wurde von der Firma ASTA Medica AG (Weismüllerstrasse 45, Postfach 100105, 6000 Frankfurt / Main 1), bezogen.

3. Versuchsaufbau

3.1. Vorversuche

In den Vorversuchen wurden durch Blutentnahmen bei unbehandelten Lewisratten (n=5) die Normalwerte der Messparameter bestimmt. Des weiteren erfolgte die histologische und immunhistologische Beurteilung von Schnittpräparaten unbehandelter, nicht transplantierter Herzen, Lungen und Nieren von Lewisratten und Meerschweinchen.

Zum Vergleich zwischen isogener und xenogener Transplantation, führte ich bei jeweils 5 Lewisratten eine isogene heterotope Herztransplantation bzw. kombinierte Herz-Lungen-Transplantation durch.
Die Blutentnahmen erfolgten praeoperativ und zu den Abstoßungszeitpunkten, nach 12 min, 30 min und 6 Stunden (bei der isolierten Herztransplantation), sowie nach 30 min und nach 12 Stunden (bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation).
Außerdem wurden histologische und immunhistologische Schnittpräparate angefertigt und ausgewertet.

Um den Einfluß einer vorausgegangenen Splenektomie auf die Transplantatüberlebenszeit untersuchen zu können, musste zunächst der günstigste Zeitpunkt für eine Transplantation nach Splenektomie bestimmt werden. Hierzu wurde bei drei Lewisratten eine Splenektomie durchgeführt und praeoperativ, sowie an den 5 folgenden Tagen, jeweils die Konzentration der Immunglobuline G und M bestimmt (Abb.10).
(Siehe hierzu auch Abb. 10 im Kapitel Ergebnisse).

3.2. Hauptversuche

Nach Durchführung der Vorversuche führte ich die isolierte xenogene diskordante heterotope HTx und die kombinierte HLTx mit und ohne Immunsuppression durch.

Die Transplantationen nach SPx, und HNTx bzw. HLNTx, sowie die Doppel-Herz-Tx (D-HTx) schlossen sich an und wurden mit den xenogenen isolierten und kombinierten Herz-, bzw. Herz-Lungen-Transplantationen verglichen.

4. Messparameter

4.1. Serumwerte

Zur Ermittlung von Vergleichswerten wurden unbehandelten, nicht transplantierten Ratten, etwa 200 µl Blut entnommen.
Nach Transplantation erfolgte die Blutentnahme zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung (definiert durch das Sistieren der Herzaktion), sowie zu weiteren definierten Zeitpunkten (dem Abstoßungszeitpunkt der Vergleichsgruppe entsprechend), um den Verlauf beurteilen zu können (siehe hierzu auch Tabelle 4).
Es wurden etwa 200 µl Blut aus der Aortenbifurkation der Ratte entnommen. Bei gleichzeitiger Transplantation der Lunge erfolgte eine zusätzliche Blutentnahme aus dem linken Vorhof des transplantierten Herzen, so dass zwischen dem peripheren Kreislauf des Empfängertieres und dem Transplantatkreislauf verglichen werden konnte.
Im Rahmen der Vorversuche erfolgte bei den 5 isogenen Transplantationen die Blutentnahme zu Vergleichszwecken nach 12 und nach 30 Minuten, da im xenogenen Modell ohne Immunsuppression (xenogene HTx, xenogene HLTx) die Transplantate zu diesem Zeitpunkt abgestoßen wurden.
Weitere Blutentnahmen führte ich 6 und 12 Stunden nach Transplantation durch, da die Abstoßung in der Gruppe unter CVF bei der isolierten Herztransplantation im Mittel nach 6 Stunden und bei der kombinierten Herz-Lungentransplantation im Mittel nach 12 Stunden erfolgte.
Nach xenogener Transplantation erfolgte die Blutentnahme jeweils zum Zeitpunkt der Abstoßung (entspricht 12 Minuten in den Abbildungen und Tabellen bei der isolierten HTx und 30 Minuten nach der kombinierten HLTx). Um die Veränderungen der Konzentrationen der einzelnen Messparameter schon im Verlauf zu dokumentieren, entnahm ich bei der

xenogenen isolierten HTx zusätzlich nach 10 Minuten und bei der xenogenen kombinierten HLTx nach 12 Minuten zusätzlich Blutproben (Tab. 4).

Tab.4: Zeitpunkt der Blutentnahmen

		Präop.	10 min	12 min	30 min	6 h	12 h
Kontrolle		**X**					
isogene	**HTx**			**X**		**X**	
	HLTx				**X**		**X**
xenogene	**HTx**		**X**	**X**			
	HLTx			**X**	**X**		
xenogene (CVF)	**HTx**					**X**	
	HLTx						**X**

In den Blutproben wurden folgende Werte bestimmt:

- Thrombozytenzahl
- Leukozytenzahl
- Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) Konzentration
- Histaminkonzentration
- Komplementkonzentration

1. Thrombozyten

Zur Zählung der Thrombozyten wurden 980 µl 3% Procainhydrochlorid (Hersteller Carl Roth, Karlsruhe) in Eppendorf-Cups gefüllt und mit 20 µl EDTA-Blut vermischt (Verdünnung 1:50). Nach einer fünf minütigen Durchmischung auf dem Rüttler erfolgte dann die Beschickung der Neubauer Zählkammer. Die Zählkammer wurde für etwa fünfzehn Minuten in eine feuchte Kammer gelegt (Petrischale mit feuchtem Tuch). Dann erfolgte die Auszählung von fünf Gruppenquadraten unter dem Mikroskop bei 40 facher Vergrößerung.
Um die Gesamtzahl zu erhalten mußten die gezählten Zellen mit dem Faktor 2500 multipliziert werden.

2. Leukozyten

Zur Zählung der Leukozyten wurden 380 µl 3% Essigsäure (Hersteller Merk KG, Darmstadt) in Eppendorf-Cups gefüllt und mit 20 µl EDTA-Blut vermischt (Verdünnung 1:20). Nach einer fünf minütigen Durchmischung auf dem Rüttler erfolgte die Beschickung der Neubauer Zählkammer. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden dann 4 Eckquadrate unter dem Mikroskop bei 20 facher Vergößerung ausgezählt und die Summe mit dem Faktor 50 multipliziert.

3. IgG und IgM

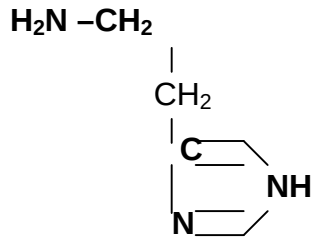
Die Immunglobuline G und M sind bei der HAR nach xenogen diskordanter Transplantation von großer Bedeutung (6,38,61).
Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline G und M (IgG, IgM) erfolgte mittels des Prinzips der Immunodiffusion (Radial Immunodiffusion Kit für Ratten, Hersteller Fa. Serotec).
Auf Platten, die mit einem Agarosegel beschichtet sind, welches die spezifischen Antikörper enthält, wurden die antigenhaltigen Proben in runden Stanzlöchern aufgetragen. Die Diffusion der Antigene erfolgt im Bereich der Äquivalenzzone, eine kreisförmige Präzipitation bildet sich aus.
Die verwendeten Platten wurden vor Gebrauch bei 5℃ gelagert. Gefriergetrocknete werden bei 5℃ und bereits aufgelöste bei –20℃ gelagert. Das benötigte Probenvolumen zur IgG-Bestimmung beträgt 5µl und das für die IgM-Bestimmung 10µl. Die Inkubationszeit für die IgG-Proben beträgt 72 Stunden, die für die IgM-Proben 96 Stunden, jeweils bei Raumtemperatur.
Nach Ansetzen der Standardlösung (zum Vergleich), pipettiert man den Standard in die ersten drei Stanzlöcher und die Probenlösung in die verbleibenden. Im Anschluß daran erfolgt die Verdünnung der Standards und Proben mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10. Vor der weiteren Verarbeitung werden die Proben nun 5-10 Minuten stehengelassen um die Bildung von Kondenswasser zu vermeiden. Zur quantitativen Bestimmung der Immunglobuline wird dann der Ringdurchmesser der Diffusionszone

abgelesen und mit einer Referenztabelle verglichen (Hersteller des verwendeten Testkits: Serotec®, Oxford, England).

4. Histamin

Das Gewebshormon Histamin entsteht durch Decarboxylierung aus dem biogenen Amin Histidin (46,70, Abb.8). Es ist in den meisten tierischen Geweben in einer Konzentrationen von 0,01mg/g Frischgewebe nachzuweisen.

Abb.8: Strukturformel Histamin



Bei Histamin handelt es sich um ein vasoaktives Amin. Es wirkt über die Bindung an Rezeptoren der Zielzelle, wobei unterschiedliche Zellarten ganz bestimmte Klassen von Rezeptoren (z.B.H_1, H_2, H_3) aufweisen. Nach der Rezeptorbindung löst Histamin intrazelluläre Prozesse aus. Bei den Endothelzellen der Gefäße bewirkt die Histaminbindung durch die Synthese von Relaxantien der glatten Gefäßmuskulatur wie Prostazyklin und Stickoxid, eine Vasodilatation. Diese Histamineffekte führen zur Quaddel- und Erythemreaktion der Soforttypüberempfindlichkeit (70,86).
Histamin bewirkt zudem die Konstriktion der glatten Muskulatur des Magen-Darm- und des Bronchialtraktes.
Nach Ewenstein gehört Histamin ebenso wie Thrombin, Komplement und verschiedene Leukotriene zu den Agonisten der Endothelzell-Aktivierung vom Typ I (32). Durch die vermehrte Gefäßpermeabilität entstehen Ödeme. Gemeinsam mit dem PAF (Platelet-activating-factor) führt P-Selektin zur Stimulation der Leukozyten- und Thrombozyten-Aktivierung, welches wiederum zur hyperakuten Abstoßung führt (32).

5. Komplement

Das Komplementsystem und seine Aktivierung ist ein wesentlicher Bestandteil der hyperakuten Abstoßungsreaktion (9,16).

Die Proteine des Komplementsystems sind im Blut in inaktiver oder höchstens schwach aktivierter Form vorhanden. Die Aktivierung des Komplementsystems läuft in der Regel streng lokalisiert ab. Hierbei wird zwischen dem klassischen Weg der Komplementaktivierung und dem alternativen Weg der Komplementaktivierung unterschieden.

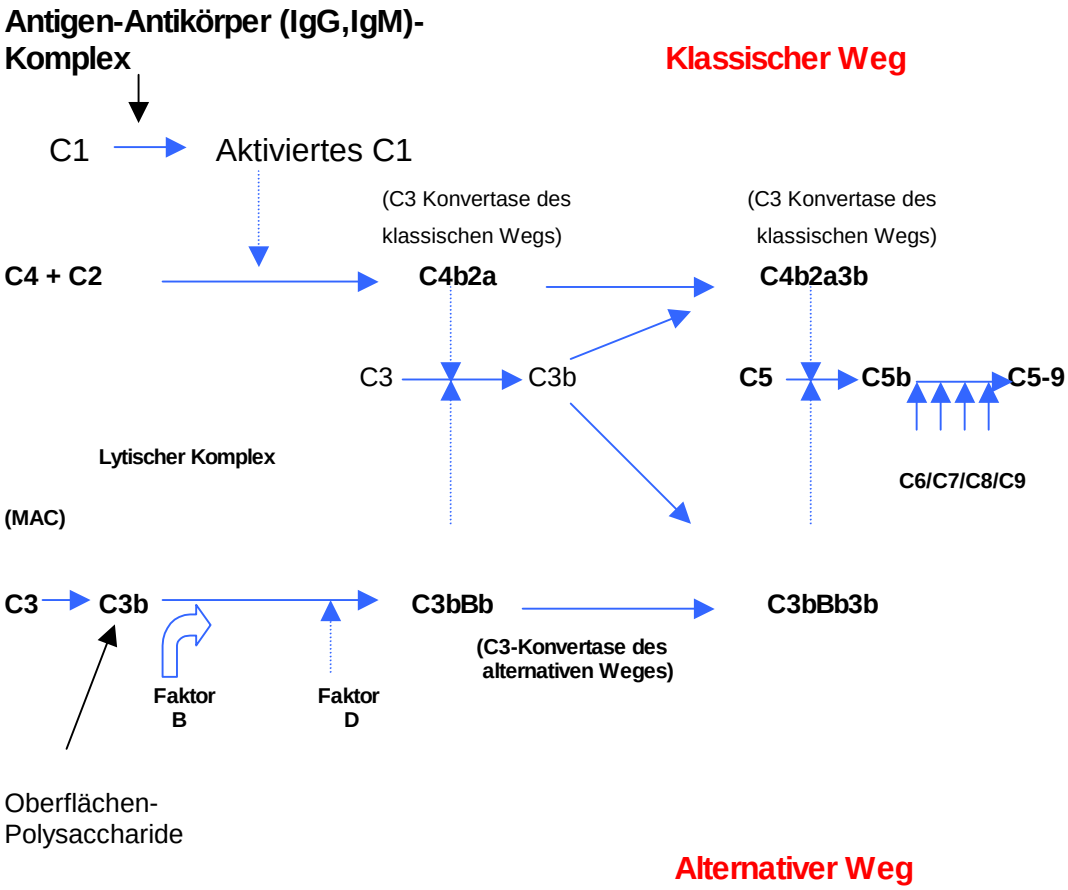
Die Aktivierungsreihenfolge einzelner Komplementkomponenten, die durch Immunkomplexe ausgelöst wird, bezeichnet man als den **klassischen Weg** der Komplementaktivierung.

Die Aktivierungssequenz des Komplements, die sich ohne Beteiligung von Antikörpern an der Oberfläche von „körperfremdem“ Material (z.B.Bakterien oder transplantiertes Gewebe) abspielt, wird als **alternativer Weg** der Komplementaktivierung bezeichnet. Die Bezeichnung «alternativ» geht darauf zurück, dass dieser Aktivierungsweg zeitlich nach der klassischen Sequenz entdeckt wurde.

Beide Aktivierungswege unterscheiden sich nur in der Auslösung.

In den letzten Stufen der Sequenz und in der Effektorfunktion bestehen keine Unterschiede (Abb.9).

Abb.9: Übersicht über die Wege der Komplementaktivierung
(modifiziert nach Ahearn (2))



Der klassische Weg wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe initiiert. Diese binden an $C1_q$ unter Mithilfe von C2 und C4.

Zur Initialisierung des alternativen Aktivierungsweges sind keine Antigen-Antikörper-Komplexe notwendig. Hier kommt es zu einer direkten Aktivierung von C3, unterstützt durch die Faktoren B und D.

Beide Aktivierungswege münden gemeinsam auf der Stufe des C3b in die Kaskade ein. Ab dieser Sequenz läuft der weitere Prozess identisch ab.

Am Ende der Kaskade wird der sogenannte „Membran Attack Factor“ gebildet. Dieser zytosolische membranschädigende Komplex führt zur Porenbildung und zum passiven Austausch von kleinen Molekülen, Ionen und Wasser. Die Folge ist ein Wassereintritt in die Zelle mit nachfolgender Lyse (21,76).

Bei der xenogenen Transplantation ist die Art des Aktivierungsweges abhängig von der transplantierten Spezies. Im Meerschweinchen-Ratte-Modell wird überwiegend die alternative Komplement-Aktivierung beschrieben (52).

Mit Hilfe des hämolytischen Systems (Hammelerythrozyten und Ambozeptor) wird die Komplementkonzentration einer Probe bestimmt (modifizierte Komplementbindungsreaktion).
Diejenige Komplementkonzentration ist ausschlaggebend, die noch ausreicht, um eine Hämolyse des hämolytischen Systems zu verursachen.

Herstellung des Ansatzes:

Hammelerythrozyten: Fünf ml Hammelblut mit fünf ml Natriumchloridlösung mischen und fünf Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren. Danach die Erythrozyten noch zwei mal mit jeweils zehn ml Natriumchloridlösung waschen und den Überstand absaugen. Dann aus dem Pellit eine fünf prozentige Erythrozytenlösung herstellen. Die Erythrozyten werden dann in der Neubauer- Zählkammer ausgezählt (fünf Gruppenquadrate).
Ambozeptor: Stammlösung: 0,1 ml Ambozeptor (Verdünnung 1:6000) werden mit 0,4 ml Mayer-Puffer und 0,1 ml Glycerin vermischt und zu 0,4 ml fünf prozentiger Phenol-Saline-Lösung (fünf g Phenol auf 95 ml 0,85% Natriumchloridlösung) gegeben.
Gebrauchslösung: Die Stammlösung wird mit dem Mayer-Puffer 1:12,5 verdünnt.
Hämolytisches System: Die Hammelerythrozyten-Suspension und die Ambozeptor-Gebrauchslösung werden fünf Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Dann werden beide zu gleichen Anteilen gemischt und erneut 30 Minuten lang im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Zellzahl beträgt nun 5×10^8 Erythrozyten/ ml.

Auswertung:

Berechnung:

$$\frac{\text{Ext. Probe} - \text{Ext. 0-Wert}}{\text{Ext. 100 Wert} - \text{Ext. 0-Wert}} \times 100 = \text{Lysegrad des Komplements in \%}$$

CH 50: Der Lysegrad in Prozent wird gegen die Verdünnung aufgetragen. Bei der Hälfte des höchsten Lysegrades wird die entsprechende Verdünnung abgelesen, dieses entspricht CH 50.

0-Wert	650 µl Mayer-Puffer plus 100µl Hämolytisches System
100-Wert	100µl Hämolytisches System

Mit den Serumproben und den Kontrollen wird eine geometrische Verdünnungsreihe erstellt. Dann werden alle Ansätze 30 Minuten lang im 37℃ warmen Wasserbad inkubiert und anschließend bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Küvette gegeben und bei 546 nm am Photometer gegen Aqua dest. gemessen.
Es wurde die Komplement-Konzentration abgelesen, die ausreicht, um eine 50 prozentige Hämolyse des Systems zu verursachen (CH-50) (69).

4.2. Histologie und Immunhistologie

Die Untersuchung der Organe (Herz, Lunge, Niere) erfolgte an Haematoxylin-Eosin gefärbten Präparaten. Wie auch bei den Serumwerten erfolgte zur Vergleichbarkeit die Untersuchung von unbehandeltem, nicht transplantiertem Gewebe. Die Entnahme der Organe erfolgte jeweils zum Zeitpunkt der Abstoßung. Bei den mittransplantierten Meerschweinnieren (HNTx und HLNTx) erfolgte die Organentnahme zum Zeitpunkt der Abstoßung des Herzens.

Um die Anreicherung von mononukleären Zellen und die Bindung von Immunglobulin G und M, sowie Komplement zu untersuchen, wurden mononukleäre Antikörper verwendet.
Es wurde die isolierte xenogene HTx mit der kombinierten xenogenen HLTx verglichen und in Bezug zu den Vergleichsgruppe der isogenen HTx und HLTx, sowie zur nicht transplantierten Kontrollgruppe gesetzt.
Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, erfolgte die semiquantitative Auswertung durch Auszählung unter dem Mikroskop.

Unter 40-facher Vergrößerung wurden aus jeder Versuchsgruppe mindestens 3 Präparate durchgemustert, jeweils 4 Gesichtsfelder pro Präparat.
Eine Kontrolle der Untersuchungen erfolgte durch Mitarbeiter des Institutes für Pathologie der Justus Liebig Universität (Leiter: Prof. Dr. Schulz).
Die Ergebnisse der semiquantitativen Untersuchung wurden in 6 Klassen eingeteilt:

Negativ	**-**
Schwach positiv	**(+)**
Positiv, einzelne Zellen auffindbar	**+**
Deutlich positiv, 5-10 Zellen / Gesichtsfeld	**++**
Stark positiv, 10-20 Zellen / Gesichtsfeld	**+++**
Ubiquitär positiv, > 20 Zellen / Gesichtsfeld	**++++**

Die Präparate wurden mittels der Alkalischen-Phosphatase-Anti-Alkalischen-Phosphatase-Methode (APAAP) gefärbt.
Hierbei wurden die gefriergetrockneten (flüssiger Stickstoff), mit dem Mikrotom geschnittenen und die Präparate mit einem primären monoklonalen Antikörper über 30 Minuten inkubiert. Danach werden sie gewaschen und mit einem zweiten Antikörper (Kanninchen-Anti-Maus-Immunglobulin Brückenantikörper) markiert.
Nach wiederholtem Waschen erfolgte dann die Inkubation mit dem APAAP-Komplex und abermaliges Waschen.

Im vorletzten Schritt wurde mit einem Phosphatase-Substrat inkubiert und schließlich nach Waschung die Gegenfärbung mittels Hämalaun durchgeführt.

Die Immunhistologischen Untersuchungen wurden mit folgenden Antikörpern (Maus-anti-Ratte) durchgeführt (Hersteller Fa. Serotec).

IgG:	1:500
IgM:	1:500
NKR-P1:	Natürliche Killerzellen, Neutrophile
ED-11:	Komplement C3, 1:5000
OX-19:	Thymozyten, T-Zellen 1:500
OX-39:	Interleukin-2 (IL-2), 1:500
ED-1:	Makrophagen, Monozyten, 1:5000
W3/13:	T-Zellen,Plasmazellen, Neutrophile, natürliche Killerzellen 1:1000

5. Versuchsgruppen

Inklusive der Vorversuche wurden insgesamt 9 Gruppen gebildet:

I: Kontrollgruppe (n=5)

II: isogene Herz-, und Herz-Lungen-Transplantation (n=5)

III: xenogene Herz-, und Herz-Lungen-Transplantation (n=5)

IV: xenogene Herz-, und Herz-Lungen-Transplantation unter FK-506 Immunsuppression (n=5)

V: xenogene Herz-, und Herz-Lungen-Transplantation unter CVF Immunsuppression (HTx n=5, HLTx n=6)

VI: xenogene Herz-, und Herz-Lungen-Transplantation unter CP Immunsuppression (n=5)

VII: xenogene Herz-, und Herz-Lungen-Transplantation nach Splenektomie (n=5)

VIII: xenogene Doppel-Herz-Transplantation (n=5)

IX: kombinierte xenogene Herz-Nieren- (n=5) und kombinierte xenogene Herz-Lungen-Nieren-Transplantation (n=5)

6. Statistik

Die Planung des Versuchsaufbaus, die Erfassung der statistischen Daten und die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, erfolgte unter Beratung von Mitarbeitern des Fachbereichs Informatik und Statistik der Fachhochschule Gießen.

Die Bearbeitung der Daten erfolgte auf einem PC mittels eines speziellen Statistikprogrammes (PC-Statistik, Version 2.05, Herausgeber O. Hoffmann, Fa. Top Soft, Hannover).

Alle generierten Zahlenwerte sind im Text der vorliegenden Arbeit als Mittelwerte angegeben und im Anhang der Arbeit mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben.

Die Berechnung und graphische Darstellung der Überlebenszeiten der Transplantate erfolgte nach der 1958 entwickelten Kaplan-Meier-Methode (53) in leicht modifizierter Form.

Die Vergleichbarkeit der Transplantatüberlebenszeiten der einzelnen Gruppen wurde mittels der Mantel-Haenszel-Procedur realisiert.

Beim Auftreten signifikanter Unterschiede in der Varianzanalyse der Serum- und Blutwerte, wurde ein Vergleich der Mittelwerte mittels des T-Tests für unabhängige Stichproben bei normalverteilter Grundgesamtheit und der Wilcoxon-Test durchgeführt.

Das Kriterium für die Beibehaltung oder Ablehnung der Nullhypothese bildete die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit „p“. Hierbei kennzeichnete ein „p“ kleiner 0,05 einen statistisch signifikanten Unterschied (68).

D. Ergebnisse

1. Vorversuche (Gruppe I)

Die Normalwerte im Serum und Blut der Lewisempfängerratten zeigt die Tabelle 5.
Die Werte wurden durch Blutentnahmen bei unbehandelten Tieren ermittelt.

Tab.5: Normalwerte im Blut und Serum der Empfängerratten

	Histamin µg/ml	CH-50 U/l	IgG mg/l	IgM mg/l	Thromboz. /µl	Leukozyt. /µl
n=5	1,3 +/-0,422	405 +/-55,7	2318 +/-511	1140 +/-259	714800 +/-110488	9366 +/-1446

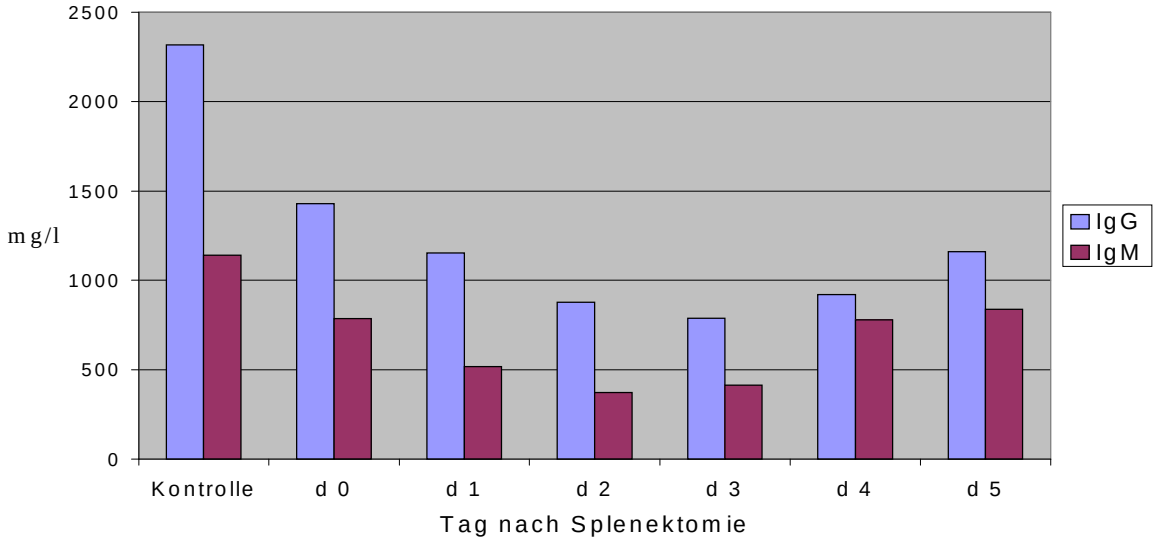
Die spezifische mikroskopische Struktur von unbehandeltem Ratten- und Meerschweinchengewebe, einschließlich immunhistologischer Untersuchungen, wurde an gesundem, Herz-, Lungen- und Nierengewebe studiert.

In den **Herzpräparaten** gesunder Ratten ließen sich vereinzelt Makrophagen, Monozyten, C3 und IL-2 nachweisen, während natürliche Killerzellen und T-Zellen häufiger zu finden waren. IgM konnte im Gegensatz zu IgG nachgewiesen werden.
Beim Meerschweinchen fielen alle immunhistologischen Untersuchungen erwartungsgemäß negativ aus. Insbesondere gelang kein Nachweis von C3 oder IgM.
In den **Lungenpräparaten** der unbehandelten Ratten fanden sich viel C3, T-Zellen, IL-2, IgM, Makrophagen und Monozyten, weniger natürliche Killerzellen.
Beim Meerschweinchen zeigten sich nur vereinzelt T-Zellen und Makrophagen, sowie ganz vereinzelt IgG, C3 und IL-2. In den **Nierenpräparaten** unbehandelter Meerschweinchen ließ sich vereinzelt Komplement und Immunglobulin M nachweisen, ansonsten war kein Nachweis von Makrophagen, T-Zellen, Interleukin-2 oder natürlichen Killerzellen möglich.

1.1. Splenektomie

Um den günstigsten Zeitpunkt für eine Transplantation, nach vorausgegangener Splenektomie zu bestimmen, führte ich bei drei Lewisratten eine Splenektomie durch. Bei allen Tieren erfolgten Blutentnahmen praeoperativ und an fünf Tagen nach der Splenektomie. Es wurden jeweils die Konzentrationen der Immunglobuline IgG und IgM im Rattenserum bestimmt. Folgender Verlauf wurde hierbei sichtbar: Die IgG-Konzentration sank bis zum dritten postoperativen Tag stetig ab, um dann langsam wieder anzusteigen (Abb.10). Die Immunglobulin-M-Konzentration hatte bereits am zweiten postoperativen Tag den tiefsten Wert erreicht (Abb.10). Aus diesem Grund wurde der zweite Tag nach Splenektomie als günstigster Tag für die xenogene Transplantation ausgewählt.

Abb.10: Veränderung der Konzentration von IgG- und IgM im Rattenserum nach Splenektomie (n=3)



2. Isogene Transplantation (Gruppe II)

2.1. Serumwerte

(Tabellen 6 und 7 im Anhang H)

Nach **isolierter isogener Herztransplantation** stiegen die Werte für Histamin nach 12 Minuten an und erreichten nach 6 Stunden ihr Maximum. Komplement stieg zunächst leicht an und fiel nach 6 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau ab (Abb.12 und 13)

Immunglobulin G fiel während des beobachteten Zeitraum kontinuierlich ab und war nach 6 Stunden mit nur noch etwa 75% des Ausgangswertes zu messen. Ein ganz ähnlicher Verlauf zeigte sich beim Immunglobulin M, auch hier fiel die Konzentration kontinuierlich ab (Abb. 14 und 15).

Die Thrombozytenzahl sank zunächst leicht, um dann nach 6 Stunden auf Werte oberhalb des Ausgangsniveaus anzusteigen. Die Leukozytenzahl sank kontinuierlich ab (Abb. 16 und 17).

Nach **kombinierter isogener Herz-Lungen-Transplantation** stiegen die Serumwerte für Histamin nach 30 Minuten deutlich an, und auch nach 12 Stunden war noch mal ein deutlicher Anstieg der Konzentration zu verzeichnen. Im Vergleich der peripher zu den zentral gemessenen Konzentrationen zeigte sich ein Abfall der zentral gemessenen Werte im Zeitraum zwischen 30 Minuten und 12 Stunden, während die peripher gemessenen Werte stetig stiegen (Abb. 12). Die Komplementkonzentration blieb nach 30 Minuten zunächst stabil, um dann nach 12 Stunden signifikant abzufallen ($p<0,01$). Hierbei verhielten sich die peripher und zentral gemessenen Konzentrationen gleichsinnig (Abb. 13).

Die Konzentration von Immunglobulin G stieg während des gesamten Beobachtungszeitraumes an. Der Anstieg der zentral gemessenen Werte war hierbei stärker ausgeprägt, als der der peripheren (Abb. 15).

Die gemessenen Werte für Immunglobulin M waren keiner ausgeprägten Veränderung unterworfen. Zentral und peripher waren die Werte stabil (Abb. 14).

Die Thrombozytenzahl sank kontinuierlich ab (Abb. 16). Der Abfall war etwas ausgeprägter in den peripher gewonnenen Proben zu verzeichnen.
Die Leukozytenzahl fiel nach 30 Minuten zunächst recht deutlich ab, um nach 12 Stunden annähernd wieder die Werte der Kontrollgruppe zu erreichen. Besonders ausgeprägt war dieses bei den peripheren Werten zu beobachten (Abb.17).

2.2. Histologie und Immunhistologie

(Tabellen 11 und 12 im Anhang H)

Die histologische Untersuchung der Herztransplantate **nach isolierter Herztransplantation** zeigte in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ein mäßig ausgeprägtes intrazelluläres Oedem sowie sehr vereinzelt Narbengewebe. Das Ergebnis der *Immunhistolgischen* Betrachtung war insgesamt vergleichbar mit den Kontrollschnitten. Es gelang ein stärkerer Nachweis von IgM im transplantierten Herzgewebe während sich nur wenige IgG Zellen darstellen ließen. C3 positive Zellen waren nur sehr gering nachweisbar.

Bei der *histologischen* Untersuchung des Herzgewebes nach **kombinierter Herz-Lungen-Transplantation** kamen in der HE-Färbung nur wenige zelluläre Infiltrate und ein schwach ausgeprägtes intrazelluläres Oedem zur Darstellung. Die Untersuchung des Lungengewebes zeigte Atelektasen, nekrotische Bezirke waren nicht zu erkennen. In der *immunhistologischen* Untersuchung des Herzgewebes zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollschnitten mehr Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und angelagerte Immunglobuline und eine stärkere Anlagerung von Komplement und IgM. Im Lungengewebe zeigten sich in starker Ausprägung Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und CD-5 Zellen. Wie bei den Kontrollschnitten ließ sich eine deutliche Anlagerung von IgM, Komplement und Interleukin-2 nachweisen.

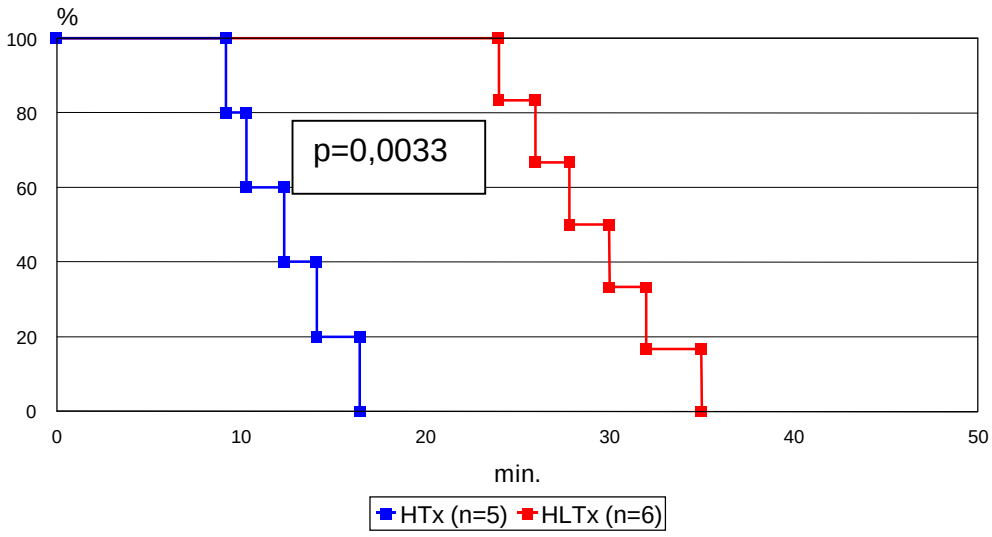
Insgesamt betrachtet war das Herzgewebe nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation etwas besser erhalten als nach isolierter Herztransplantation. Deutliche Unterschiede zu den Kontrollschnitten zeigten sich nicht.

3. Xenogene Transplantation ohne Immunsuppression (Gruppe III)

3.1. Überlebenszeit

Nach xenogener diskordanter Herz-Lungen-Transplantation war die Überlebenszeit des Herztransplantates signifikant verlängert gegenüber der isolierten xenogenen Herztransplantation (25 min zu 12 min, $p<0,01$, Abb.11).

Abb.11: Herztransplantatüberlebenszeit nach xenogener HTx und HLTx (nach Kaplan-Meier)



3.2. Serumwerte

(Tabelle 8 im Anhang H)

Nach isolierter **xenogener Herz-Transplantation** stieg die Konzentration von Histamin zunächst auf das Dreifache (nach 10 Minuten) an, um dann wieder abzufallen (Abb.12). Verglichen mit den Histaminwerten bei der isogenen

Herz-Transplantation lagen die Meßwerte höher, ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht festgestellt werden.
Bis zur 10. Minute zeigte sich für Komplement praktisch keine Änderung. Nach 12 Minuten hatten sich die Meßwerte dann fast halbiert, während sie bei der isogenen Transplantation fast unverändert blieben (Abb. 13).
IgG stieg zunächst recht deutlich an, um dann wieder leicht zu fallen. Verglichen mit der isogenen HTx zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Werte (Abb.15).
IgM zeigte einen parallelen Verlauf wie das IgG, nach leichtem Anstieg folgte auch hier ein Absinken der Werte, ein signifikanter Unterschied zur isogenen HTx wurde nicht beobachtet (Abb.14 und 15).
Nachdem die Thrombozytenzahl nach 10 Minuten zunächst deutlich absank, stieg sie bis zum Zeitpunkt der Organabstoßung wieder an, allerdings ohne den Ausgangswert wieder zu erreichen (Abb.16).
Die Leukozytenzahl war keinen größeren Schwankungen unterworfen (Abb.17).

Nach der **kombinierten xenogenen Herz-Lungen-Transplantation** zeigte sich beim Histamin zunächst ein sehr deutlicher Anstieg der Konzentration. Ähnlich wie bei der isolierten xenogenen HTx sank diese aber bis zum Zeitpunkt der Abstoßung wieder ab. Im Vergleich zur isogenen HLTx war dieser Abfall besonders ausgeprägt in den zentral gemessenen Werten (Abb.12).
Einen ganz ähnlichen Verlauf wie bei der isolierten HTx zeigte die Komplementkonzentration. Nach 12 Minuten war der Wert bereits auf ein ähnliches Niveau gesunken, um dann bis zum Zeitpunkt der Abstoßung (nach 30 Minuten) nochmals deutlich abzufallen. Die Werte lagen hier signifikant unter denen der isogenen HLTx (Abb.13).
IgG stieg im Verlauf deutlich an, zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zur IgG-Konzentration bei der isogenen HLTx (Abb.15).
Bei der IgM-Konzentration waren keine größeren Schwankungen zu beobachten (Abb.14).
Die Thrombozytenzahl fiel zunächst deutlich ab, erholte sich aber wieder leicht bis zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung nach 30 Minuten und er-

reichte damit fast das Niveau der Thrombozytenzahlen der isogenen HLTx. Lediglich die zentral gemessenen Werte lagen deutlich niedriger (Abb.16). Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Leukozytenzahl. Nach 12 Minuten halbierte sich die Zahl, um nach 30 Minuten fast wieder bis auf den Ausgangswert anzusteigen (Abb.17).

Die zentral gemessenen Werte waren zum Großteil höher als die peripher gemessenen. Zum Zeitpunkt der Abstoßung ließen sich für Histamin und Komplement signifikant höhere Werte und für die Leukozyten signifikant niedrigere Werte, peripher als zentral nachweisen.

Abbildungen 12-17 zeigen die Konzentrationen bzw. Zellzahlen als Mittelwerte nach xenogener Herz- und Herz-Lungen-Transplantation (n=5)

Abb.12: Histamin

Abb.13: Komplement (CH-50)

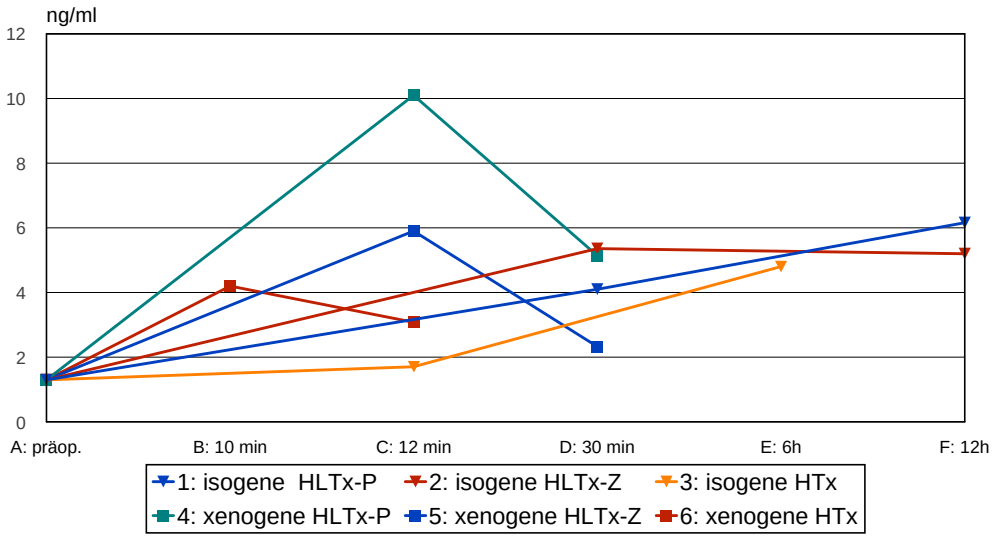
Abb.14: Immunglobulin M (IgM)

Abb.15: Immunglobulin G (IgG)

Abb.16: Thrombozytenzahl

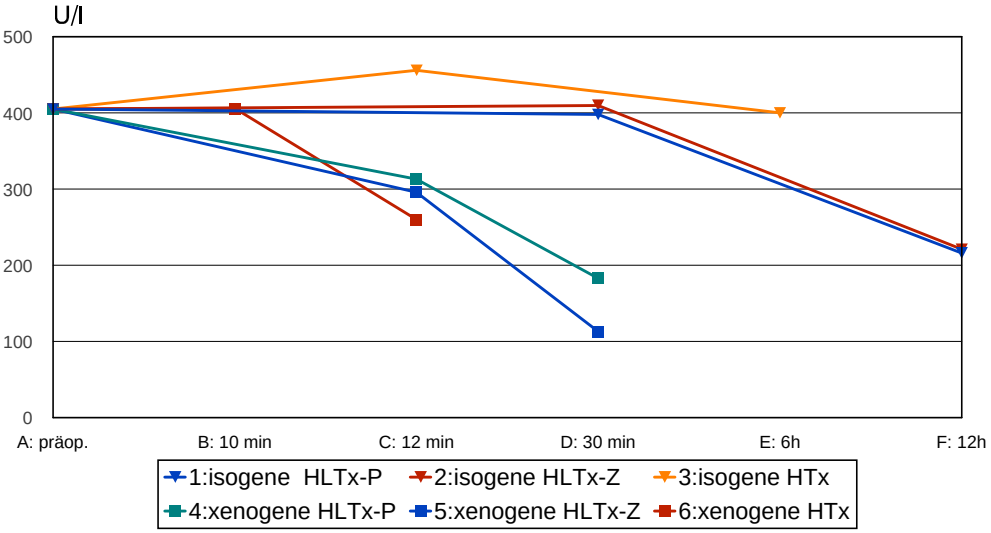
Abb.17: Leukozytenzahl

Abb.12: Histamin



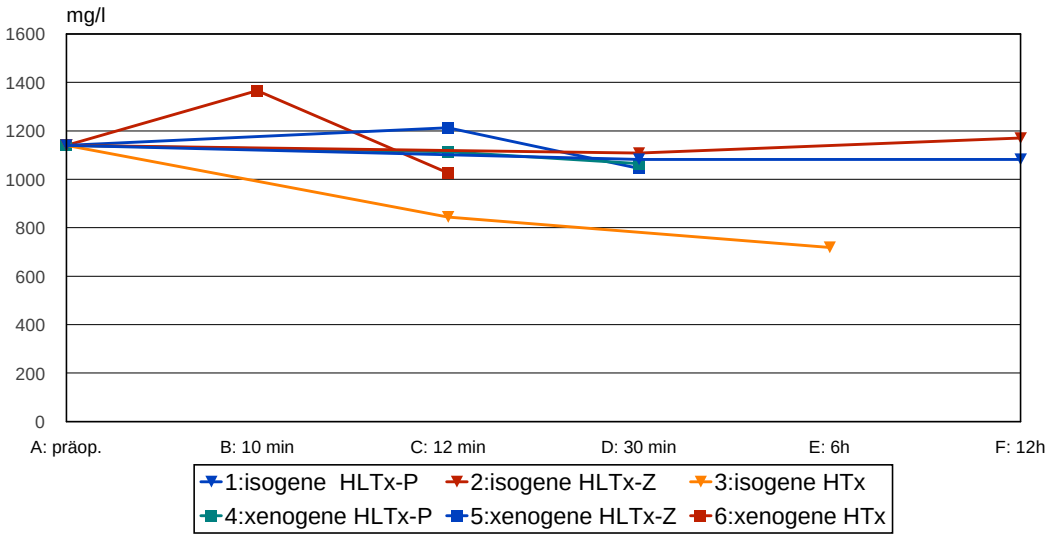
(Standardabweichungen und Varianzanalyse in Tabelle 6,7,8 und 13 im Anhang H)

Abb.13: Komplement (CH-50)



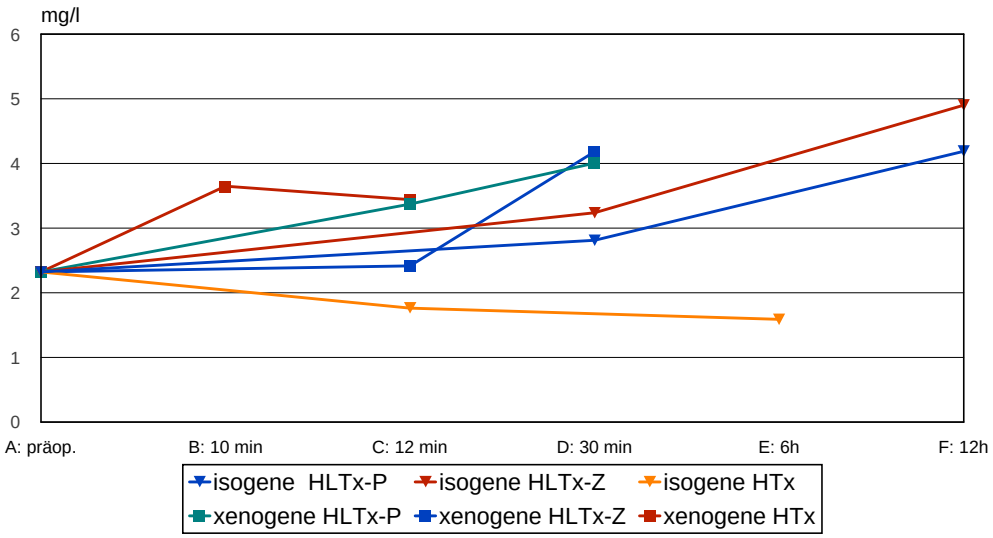
(Standardabweichungen und Varianzanalyse in Tabelle 6,7,8 und 13 im Anhang H)

Abb.14: Immunglobulin M (IgM)



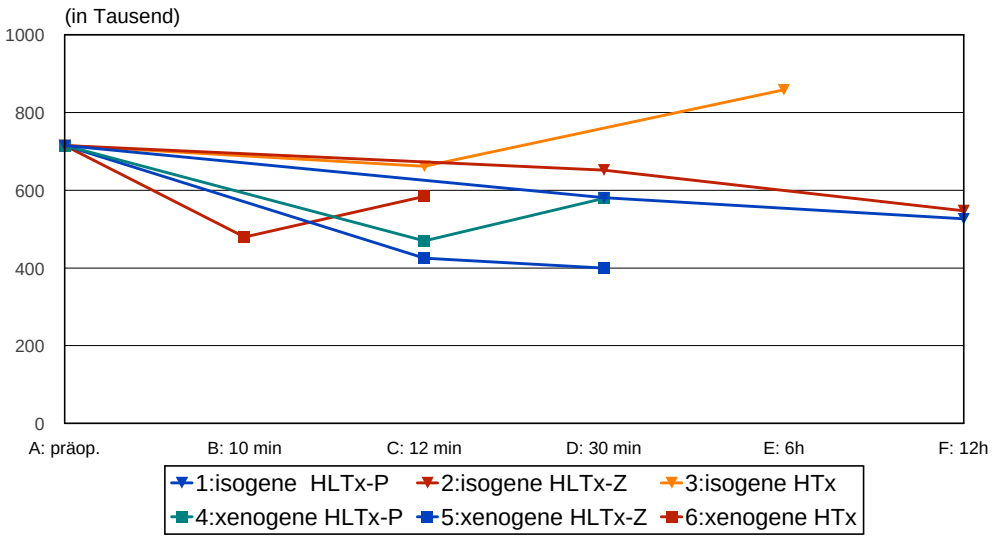
(Standardabweichungen und Varianzanalyse in Tabelle 6,7,8 und 13 im Anhang H)

Abb.15: Immunglobulin G (IgG)



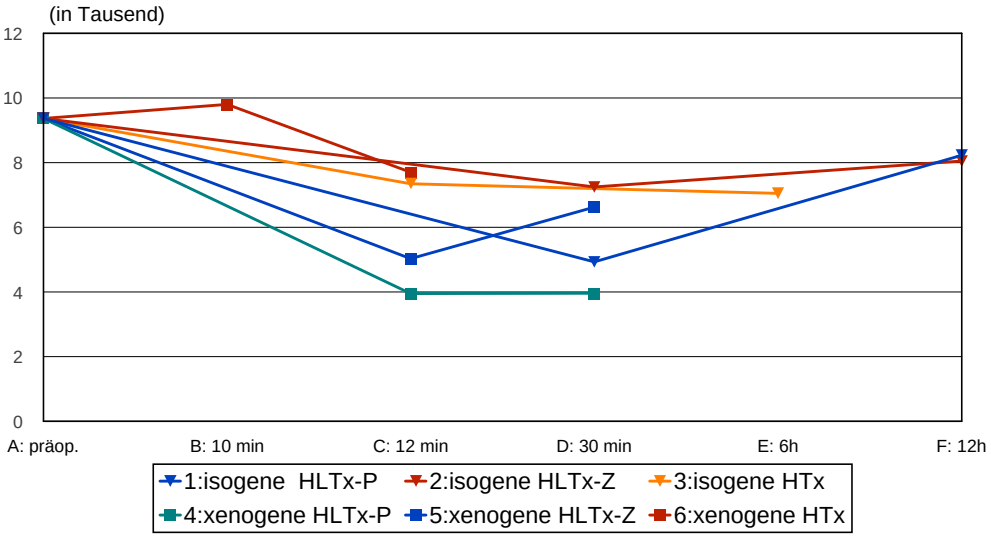
(Standardabweichungen und Varianzanalyse in Tabelle 6,7,8 und 13 im Anhang H)

Abb.16: Thrombozytenzahl



(Standardabweichungen und Varianzanalyse in Tabelle 6,7,8 und 13 im Anhang H)

Abb.17: Leukozytenzahl



(Standardabweichungen und Varianzanalyse in Tabelle 6,7,8 und 13 im Anhang H)

3.3. Histologie und Immunhistologie

(Tabellen 11 und 12 im Anhang H)

Bei den kurzen Transplantatüberlebenszeiten nach xenogener Herz- und Herz-Lungen-Transplantation waren bei allen diskordanten Präparaten nur sehr vereinzelt Nekrosen nachweisbar.

Nach **isolierter xenogener Herztransplantation** ließen sich in der HE-Färbung der Herzpräparate ausgeprägte Ödeme nachweisen (Abb.18,19).
Vereinzelt zeigten sich hämorrhagische Zellverbände und Kernpyknosen, Nekrosen waren nicht zu erkennen. Wie nicht anders zu erwarten, war das Herzgewebe vor der Abstoßung (nach 10 min) besser erhalten, als zum Zeitpunkt der bereits erfolgten Abstoßung.

In der *immunhistologischen Untersuchung* zeigte sich eine deutliche Bindung von Komplement (ED-11) und Immunglobulin M, sowohl nach 10 Minuten als auch zum Zeitpunkt der Abstoßung (Abb.23,26). T-Zellen, Makrophagen, CD-5-Zellen und natürliche Killerzellen ließen sich nur vereinzelt

nachweisen, während Interleukin 2 und Immunglobulin G nicht zu finden waren. Diese Beobachtung galt für beide Zeitpunkte.

Nach **xenogener Herz-Lungen-Transplantation** fiel auf, dass das Herzgewebe sowohl nach 12 Minuten als auch zum Zeitpunkt der Abstoßung nach 30 Minuten deutlich besser erhalten war, als nach isolierter xenogener Herztransplantation (Abb.20).
Wiederum ließen sich kaum Nekrosen nachweisen. Sehr ausgeprägt waren intra- und interzelluläre Ödeme. Bei erhaltener Struktur zeigten sich in den Lungenpräparaten dystelektatische Areale mit fokalem intraalveolärem Ödem und Hämorrhagien (Abb.21,22).

In der *immunhistologischen Untersuchung* wurde nach HLTx im Herzgewebe deutlich weniger C3 und IgM gefunden als im Lungengewebe und nach isolierter HTx (Abb.24,25,27,28).
Im Lungengewebe waren stärkere Anlagerungen von C3 und IgM zu finden, als in den Präparaten nicht transplantierter Meerschweinchenlungen. T-, CD-5-Zellen, Monozyten und Makrophagen kamen im Lungengewebe stärker zur Darstellung als im Herzgewebe.

In der **Gesamtbeurteilung** fand sich eine deutlich stärker ausgeprägte Bindung von C3 und IgM in den abgestoßenen Transplantaten als in den nicht transplantierten Kontrollorganen.
Im Vergleich der Herzgewebe nach isolierter HTx und kombinierter HLTx, zeigte sich eine deutlich stärkere Bindung von C3 und IgM in den abgestoßenen Organen nach isolierter HTx.

Abb.18: Meerschweinchen-Herz, Kontrollschnitt, nicht transplantiert, normale Histologie HE-Färbung, 200 fache Vergrößerung

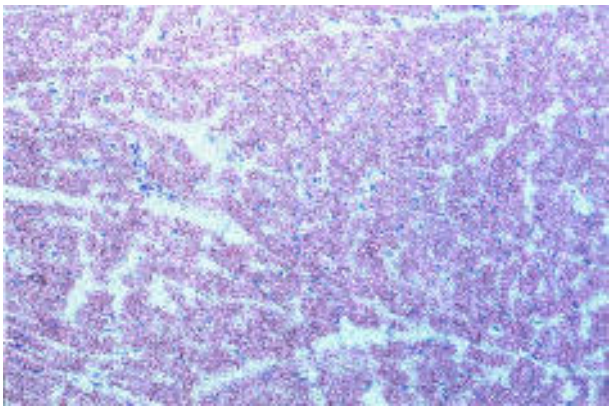


Abb.19:

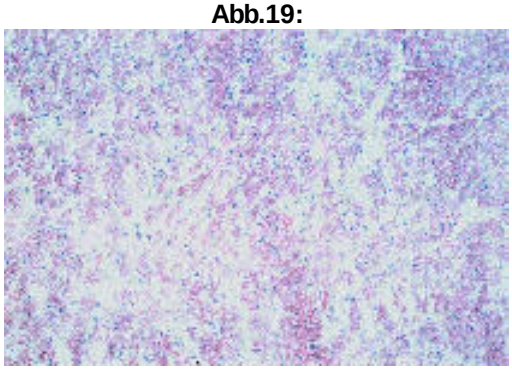


Abb.20:

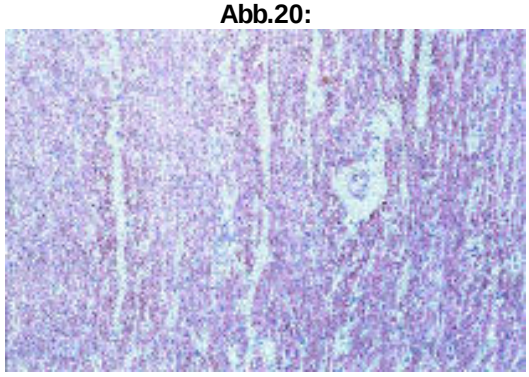


Abb.21:

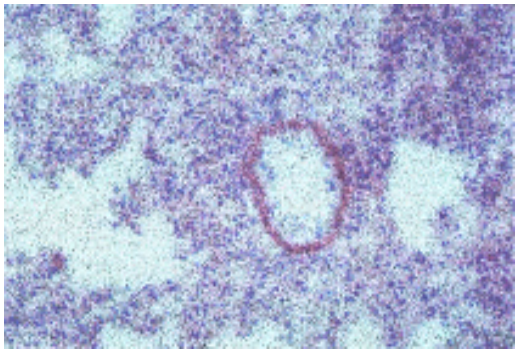
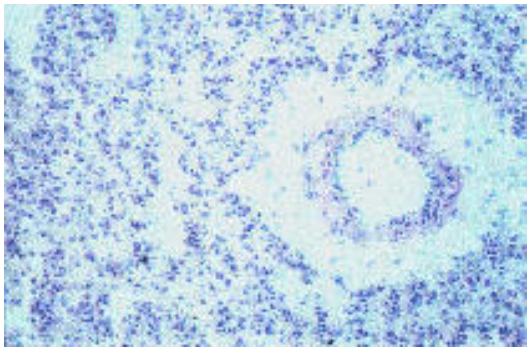


Abb.22:



Abbildungen 19–22:

Abb.19: Meerschweinherz, nach xenog. HTX, HE-Färbung

Abb.20: Merrschweinherz, nach xenog. HLTx, HE-Färbung

Abb.21: Meerschweinlunge, nicht transplantiert, HE-Färbung

Abb.22: Meerschweinlunge, nach xenog. HLTx, HE-Färbung

(alle 200 fache Vergrößerung)

Abb.23–28: Meerschweinchenherzen und –Lungen nach xenogener Herz- und Herz-Lungen-Transplantation.

Abb.23:

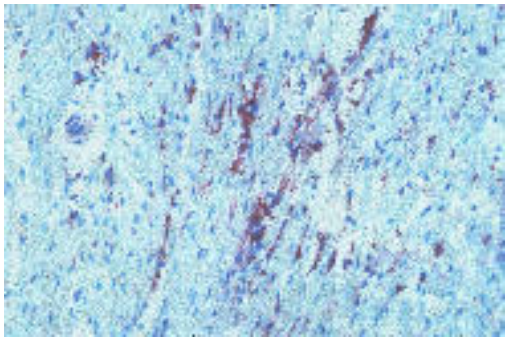


Abb.24:

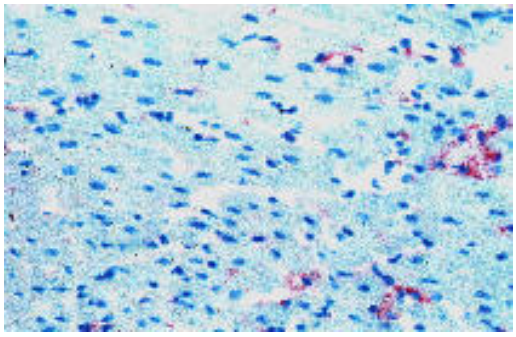


Abb.25:

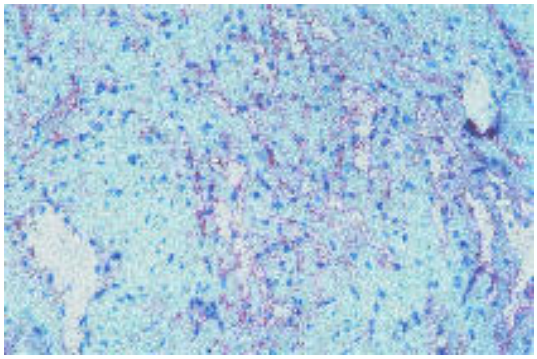


Abb.26:

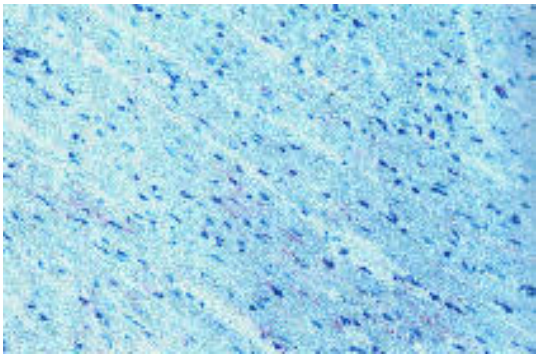


Abb.27:

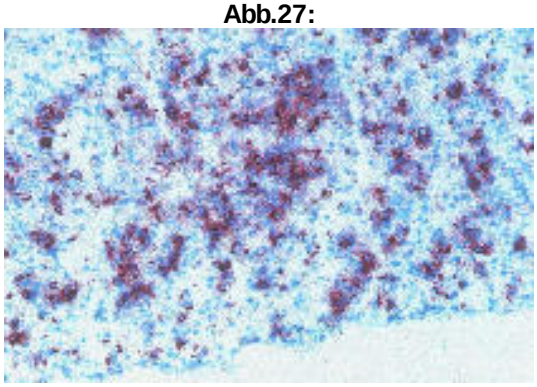
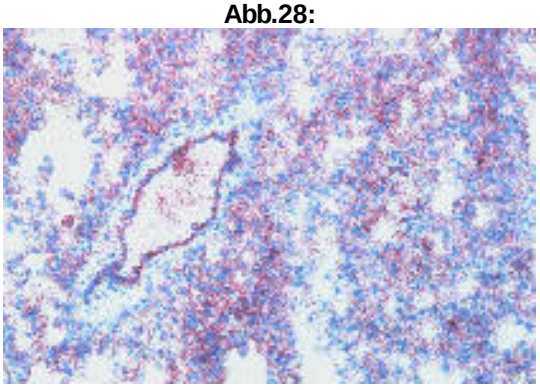


Abb.28:



Abbildungen 23-28: (alle 200 fache Vergrößerung)

Abb.23: Meerschweinherz nach xenog. HTx, deutliche C3 (ED-11) – Anlagerung

Abb.24: Meerschweinherz nach xenog. HLTx, schwache C3 (ED-11) – Anlagerung

Abb.25: Meerschweinherz nach xenog. HTx, deutliche IgM - Bindung

Abb.26: Meerschweinherz nach xenog. HLTx, schwache IgM - Bindung

Abb.27: Meerschweinlunge nach xenog. HLTx, starker C3 (ED-11) Nachweis

Abb.28: Meerschweinlunge nach xenog. HLTx, sehr starker IgM – Nachweis

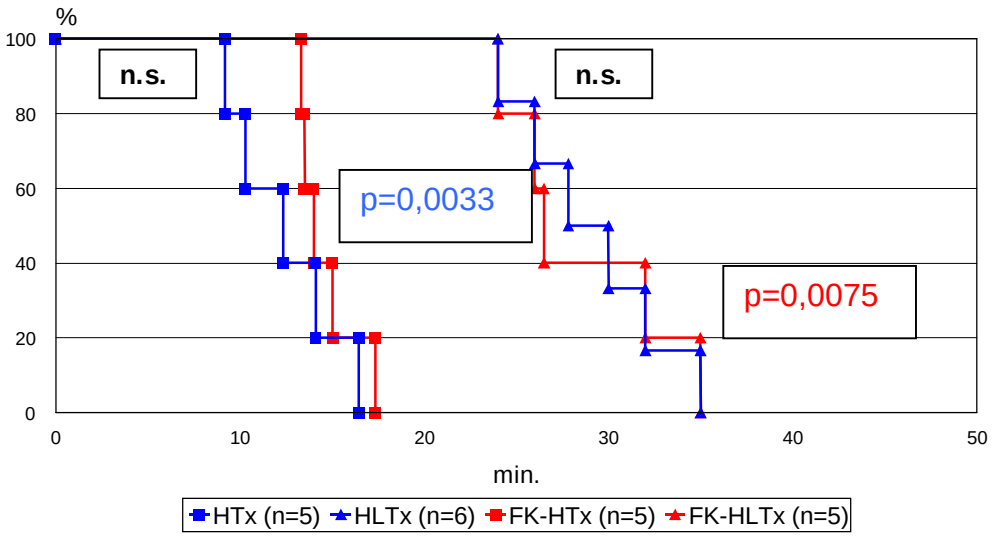
4. „Combi-Effekt“ und Immunsuppression

4.1. Tacrolismus (FK-506) (Gruppe IV)

4.1.1. Überlebenszeit

Im Vergleich zur xenogenen Transplantation von Herz, oder Herz und Lunge ließ sich durch die präoperative Gabe von Tacrolismus keine Verlängerung der Herz-Transplantat-Überlebenszeit erreichen.
Allerdings zeigte sich die schon bekannte Verlängerung der Herztransplantat-Überlebenszeit bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation im Vergleich zur isolierten Herz-Transplantation (28,7 min. zu 14,6 min., p<0,0075) (Abb.29).

Abb.29: Herztransplantatüberlebenszeit nach xenogener HTx und HLTx mit und ohne FK-506 (nach Kaplan-Meier)



4.1.2. Serumwerte

(Tabelle 9 im Anhang)

Bei der **isolierten xenogenen Herztransplantation** (Abb.30-35) nach der Gabe von Tacrolismus fanden sich deutlich höhere Histaminkonzentrationen als nach isogener und unbehandelter xenogener Transplantation. Beim

Komplement wurden höhere Konzentrationen als nach xenogener Transplantation und niedrigere als nach isogener Transplantation gemessen. IgM war nur gegenüber der isogenen HTx geringfügig erhöht.

Nach **kombinierter xenogener Herz-Lungen-Transplantation** (Abb.30-35) nach der Gabe von Tacrolismus, fanden sich höhere Konzentrationen von Histamin als nach xenogener HLTx ohne vorangegangene Behandlung. Gleichartige Veränderungen zeigten sich für das Komplement. Verglichen mit der isogenen HLTx, fielen höhere Messparameter für Histamin und niedrigere Messparameter für Komplement auf.

Beim *Vergleich der zentral und peripher* gemessenen Werte zeigten sich signifikant höhere Werte für Histamin und niedrigere Werte für die Leukozyten im peripher gewonnenen Blut gegenüber dem zentral gewonnenen Blut.

Signifikante Unterschiede der Histamin- und IgM-konzentration zeigten sich beim **Vergleich der isolierten HTx mit der kombinierten HLTx** nach Gabe von Tacrolismus. Die Histaminkonzentration war deutlich niedriger nach isolierter HTx, als nach kombinierter HLTx, während die IgM-Konzentration deutlich höher war.

Abbildungen 30-35 zeigen die Konzentrationen bzw. Zellzahlen als Mittelwerte nach xenogener HTx und HLTx im Vergleich mit und ohne Immunsuppression (n=5).

Abb.30: Histamin

Abb.31: Komplement

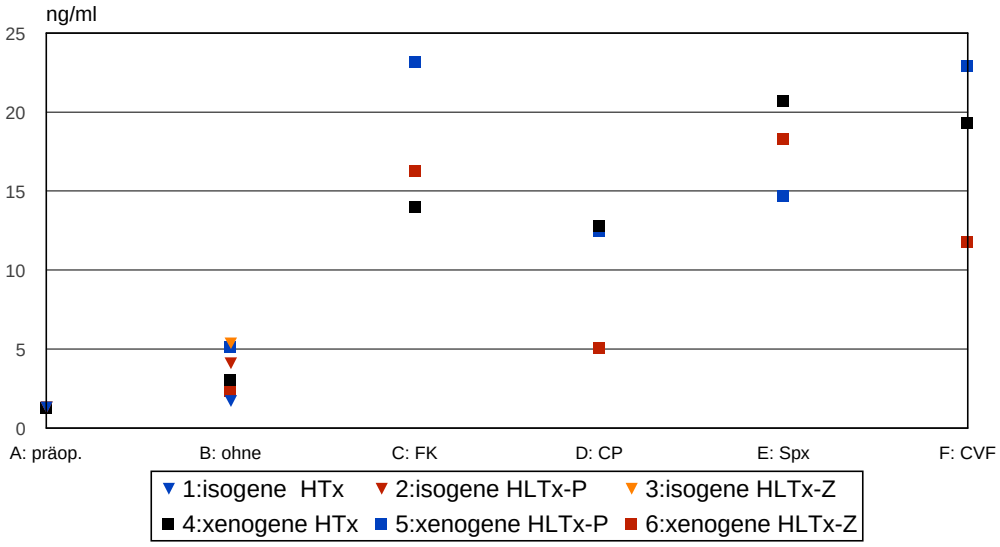
Abb.32: Immunglobulin M (IgM)

Abb.33: Immunglobulin G (IgG)

Abb.34: Thrombozyten

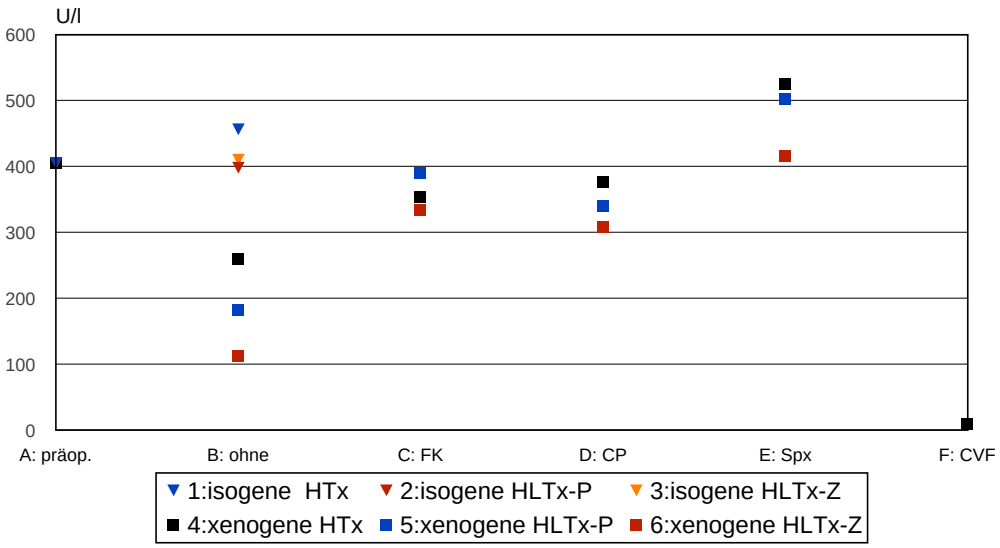
Abb.35: Leukozyten

Abb.30: Histamin



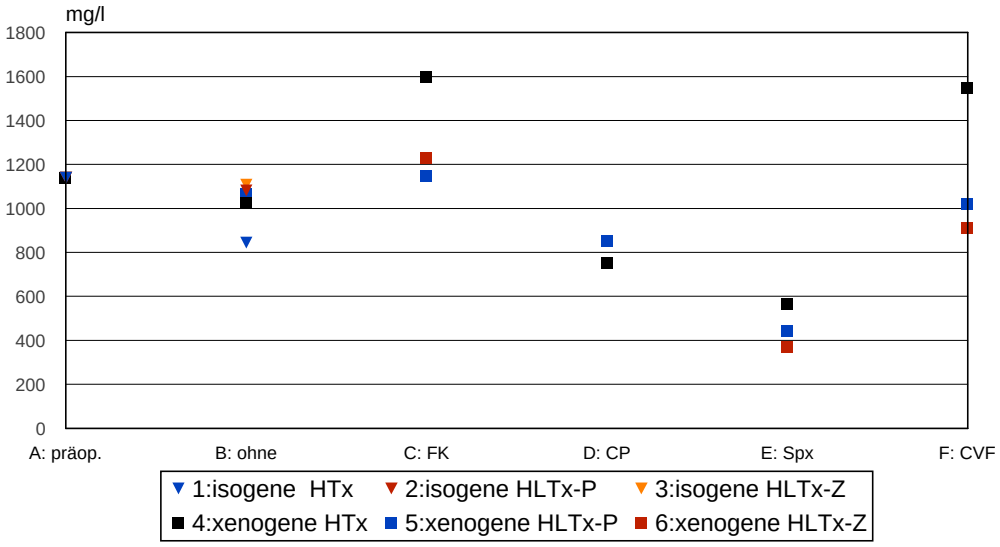
(Varianzanalyse in Tabelle 14 im Anhang H)

Abb.31: Komplement(CH-50)



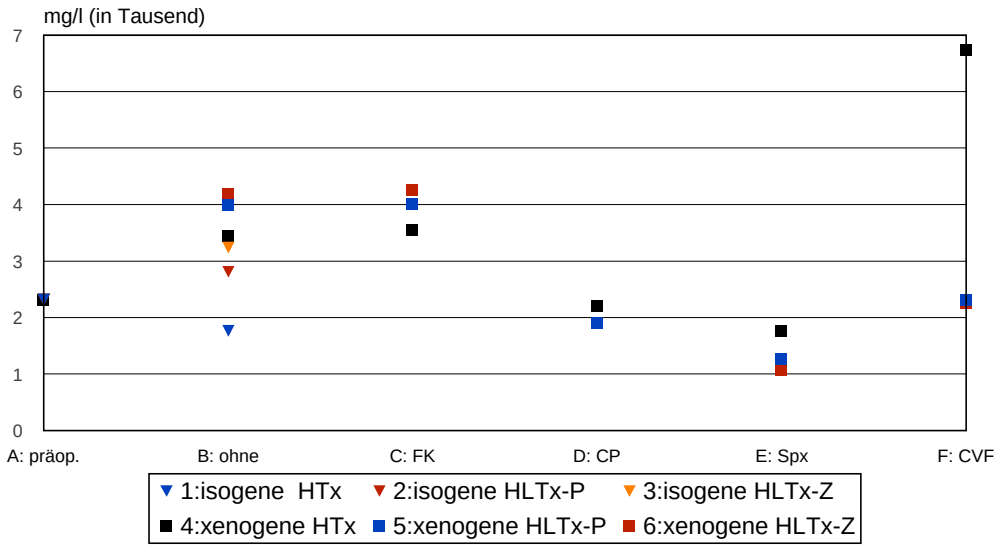
(Varianzanalyse in Tabelle 14 im Anhang H)

Abb.32: Immunglobulin M (IgM)



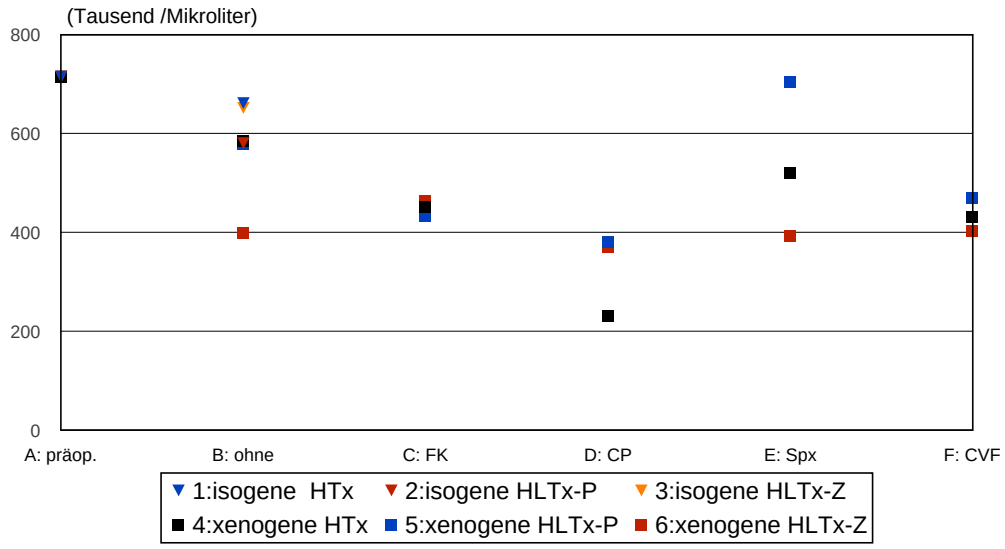
(Varianzanalyse in Tabelle 14 im Anhang H)

Abb.33: Immunglobulin G (IgG)



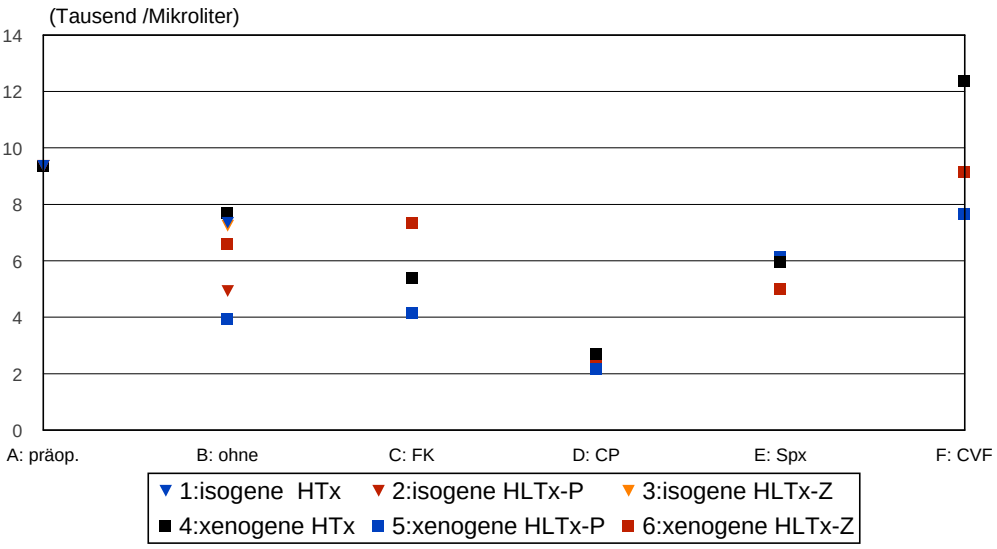
(Varianzanalyse in Tabelle 14 im Anhang H)

Abb.34: Thrombozytenzahl



(Varianzanalyse in Tabelle 14 im Anhang H)

Abb.35: Leukozytenzahl



(Varianzanalyse in Tabelle 14 im Anhang H)

4.1.3. Histologie und Immunhistologie

Beim Vergleich der Transplantation von Herz bzw. Herz- und Lunge mit und ohne Tacrolismus waren keine größeren Unterschiede in den histologischen und immunhistologischen Untersuchungen nachzuweisen.

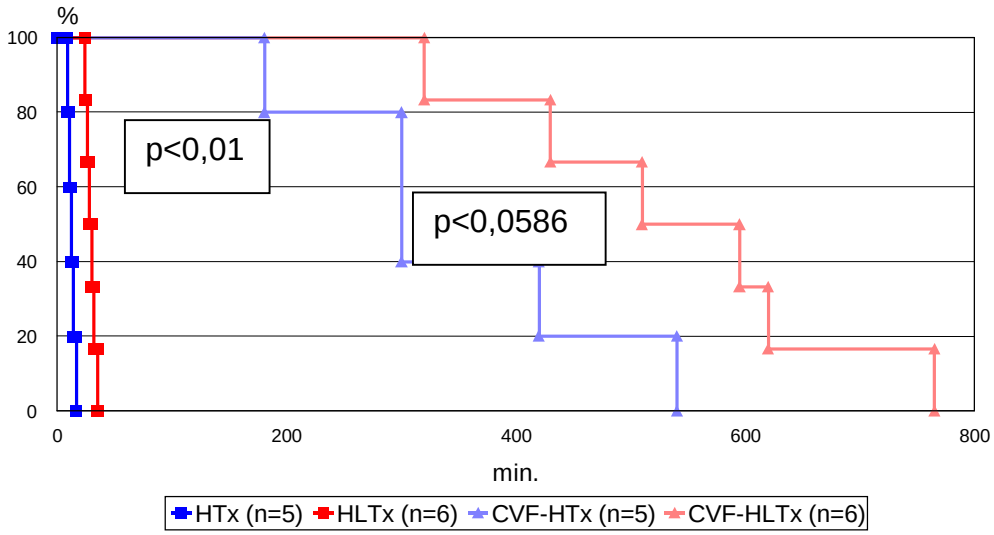
4.2. Cobra-Venom-Factor (CVF) (Gruppe V)

Die Durchführung dieser Versuchsreihe wurde wesentlich durch intra- und postoperative Komplikationen wie unklare Herzstillstände und Blutungen erschwert. Häufiger noch als bei der isolierten Herztransplantation, traten, diese Probleme bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation auf.

4.2.1. Überlebenszeit

In dieser Versuchsreihe zeigte sich sowohl für die isolierte HTx nach CVF-Gabe (348 min.), als auch für die kombinierte HLTx nach CVF-Gabe (540 min.), eine deutlich verlängerte Transplantatüberlebenszeit gegenüber der xenogenen HTx (12 min.) und HLTx (25min. $p<0,01$) ohne Immunsuppression.
Außerdem zeigte sich wiederum ein deutlicher Unterschied bezüglich der Herztransplantatüberlebenszeit zwischen der HTx und HLTx unter CVF, der allerdings nicht statistisch signifikant war ($p=0,058$) (Abb.36).

Abb.36: Vergleich der Herztransplantatüberlebenszeit nach xenogener HTx und HLTx mit und ohne Cobra-Venom Faktor (CVF) (nach Kaplan-Meier)



4.2. Serumwerte

(Tabelle 9 im Anhang)

Durch die praeoperative Gabe von CVF wurde wie erwartet, das Komplement fast vollständig inhibiert, und es konnten nur noch Werte von < 10 U/l gemessen werden. Daraus resultiert ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Komplementkonzentration zwischen isogener und xenogener HTx und HLTx ohne CVF und nach CVF Gabe.

Verglichen mit der isogenen und xenogenen Herztransplantation ohne CVF waren die Konzentrationen von Histamin, IgG und IgM nach **isolierter xenogener Herztransplantation** unter CVF signifikant höher und die Thrombozytenzahl niedriger (Abb.:30-35).

Bei der kombinierten **xenogenen Herz-Lungen-Transplantation** nach Gabe von CVF zeigten sich wesentlich höhere Konzentrationen von Histamin (zentral und peripher) und niedrigere Konzentrationen von IgG (zentral) verglichen mit der isogenen und der xenogenen HLTx ohne CVF. Hierbei lagen die Werte für die periphere Histaminkonzentration höher als die zentral gemessenen.

Im Verhältnis zur **isolierten xenogenen Herztransplantation** unter CVF fielen bei der **kombinierten xenogenen Herz-Lungen-Transplantation** unter CVF niedrigere Konzentrationen von IgG (peripher und zentral) und IgM (zentral) nach HLTx ,als nach HTx auf.
Die übrigen Messparameter zeigten allenfalls geringfügige nicht signifikante Unterschiede.

4.2.2. Histologie und Immunhistologie

Aufgrund der wesentlich längeren Transplantatüberlebenszeit bei der isolierten Herztransplantation und der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation nach CVF, im Vergleich zur xenogenen unbehandelten HTx und HLTx, ergaben sich histologisch und immunhistologisch deutliche Unterschiede.

Bei der **isolierten xenogenen Herztransplantation** ließen sich in der HE-Färbung des *Herzgewebes* vereinzelte Nekrosen, teilweise ein multifokales Ödem und gelegentliche Hämorrhagien nachweisen.
Gegenüber der xenogenen HTx ohne CVF zeigte sich in der immunhistologischen Untersuchung kaum gebundenes C3. Dafür stellten sich erheblich mehr Makrophagen, Monozyten, CD-5 Zellen, T-Zellen und IgM dar.

Bei der **kombinierten xenogenen Herz-Lungen-Transplantation** ließen sich in der HE-Färbung des *Herzgewebes* vereinzelte Nekrosen und ein stellenweise flächiges sowohl interstitielles als auch intrazelluläres Ödem darstellen.
In der immunhistologischen Untersuchung zeigte sich auch hier sehr wenig C3.
Gegenüber der HLTx ohne CVF fanden sich mehr Makrophagen, Monozyten, natürliche Killerzellen, T-Zellen und insgesamt wenig Interleukin-2.

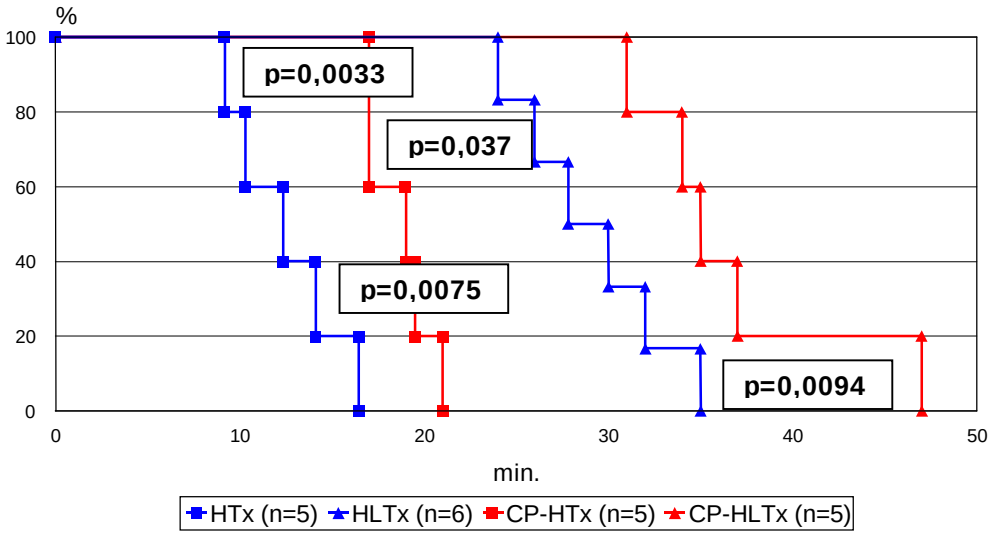
Im Vergleich mit dem Herzgewebe nach isolierter HTx unter CVF waren weniger Nekrosen, Makrophagen und Monozyten zu finden. Außerdem zeigte sich eine noch geringere Bindung von IgM im Herzgewebe.
Bei der Untersuchung des *Lungengewebes* kamen einzelne pneumonische Herde und perivaskuläre Infiltrate zur Darstellung. Außerdem zeigte sich eine zum Teil zerstörte histologische Struktur mit intraalveolärem Ödem.
Immunhistologisch stellte sich sehr wenig C3 dar. Ansonsten zeigten sich die gleichen Zellen wie im Herzgewebe.

4.3. Cyclophosphamid (CP) (Gruppe VI)

4.3.1. Überlebenszeit

Auch bei der Transplantation nach CP-Gabe zeigte sich die schon bekannte Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit durch die kombinierte Herz-Lungen-Transplantation (37 min.) im Vergleich zur isolierten Herztransplantation (19 min.) (p=0,0094).
Außerdem verlängerte sich die Transplantatüberlebenszeit durch die Vorbehandlung mit CP, im Vergleich zur xenogenen HTx und HLTx ohne Vorbehandlung signifikant (HTx: p= 0,0075, HLTx: p=0,037) (Abb.37).

Abb.37: Vergleich der Herztransplantatüberlebenszeit nach xenogener HTx und HLTx mit und ohne Cyclophosphamid (CP) (nach Kaplan-Meier)



4.3.2. Serumwerte

(Tabelle 9 im Anhang)

Nach **isolierter xenogener Herztransplantation** unter Cyclophosphamid (CP) wurde eine geringere Thrombozyten- und Leukozytenzahl als nach isogener und xenogener HTx ohne CP beobachtet. Dagegen zeigten sich höhere Histaminkonzentrationen. Die Komplementkonzentration war deutlich höher als bei der xenogenen Transplantation ohne CP, aber niedriger als die nach isogener Transplantation. IgM ließ sich in höherer Konzentration als bei der xenogenen HTx nachweisen.

Nach **kombinierter xenogener Herz-Lungen-Transplantation** nach Gabe von CP wurden geringere Konzentrationen für IgG, IgM und niedrigere Leukozytenzahlen als nach xenogener unbehandelter HTx nachgewiesen.

Die nachweisbaren Histamin- und Komplementkonzentrationen waren dagegen deutlich höher.

Im Vergleich mit der isogenen Transplantation waren die Thrombozyten- und Leukozytenzahlen ebenfalls niedriger, während die Histamin- und Komplementkonzentrationen höher als bei der unbehandelten xenogenen HTx zu messen waren.

Beim *Vergleich der peripher gemessenen Werte mit den zentral gemessenen Werten* fiel lediglich eine niedrigere zentrale Histaminkonzentration auf ($p<0,05$).

Beim Vergleich der isolierten Herztransplantation mit der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation nach CP, zeigten sich höhere Werte für Histamin und niedrigere Thrombozytenzahlen nach isolierter HTx, gegenüber der kombinierten HLTx.

4.3.3. Histologie und Immunhistologie

(Tabellen 11 und 12 im Anhang)

Bei der histologischen Untersuchung des Herzgewebes nach **isolierter xenogener Herztransplantation** unter CP, waren insgesamt weniger Zellen

als bei der unbehandelten xenogenen HTx nachweisbar. Darüber hinaus zeigte sich ein ausgeprägtes interstitielles Ödem.
In der immunhistologischen Untersuchung fanden sich weniger T-Zellen, Makrophagen und Monozyten als nach isolierter unbehandelter HTx.
Die Bindung von C3 und IgM war vergleichbar ausgeprägt wie bei der unbehandelten HTx.

Keine größeren Unterschiede zeigten sich beim Vergleich der Herzgewebe der **kombinierten xenogenen Herz-Lungen-Transplantation** unter CP, mit dem Herzgewebe nach unbehandelter kombinierter HLTx. Insgesamt waren weniger Zellen zu sehen.

Beim *Vergleich der isolierten Herztransplantation mit der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation* unter CP, fiel eine stärkere Bindung von C3 und IgM im Herzgewebe nach isolierter HTx auf.

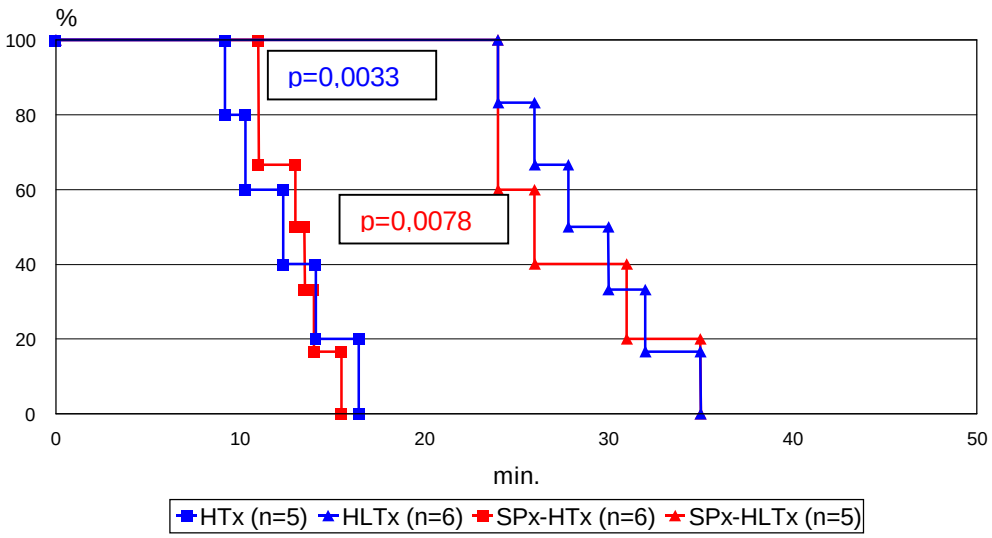
4.4. Splenektomie (SPx) (Gruppe VII)

Im Rahmen der Vorversuche wurde bereits im Kapitel 1.1. beschrieben, dass am zweiten postoperativen Tag nach Splenektomie die IgM-Konzentration am niedrigsten war und dieser Tag deshalb als bestmöglicher Zeitpunkt für die xenogene Transplantation gewählt wurde (siehe Abb.10).

4.4.1.Überlebenszeit

Die Herztransplantatüberlebenszeit nach vorausgegangener Splenektomie (SPx) der Transplantatempfängertiere, war bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation mit 28min. gegenüber der isolierten Herztransplantation mit 13 min. signifikant verlängert (p=0,0078).
Im Vergleich zur xenogenen HTx und HLTx ohne vorausgegangene Spx zeigte sich keine Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit (Abb.38).

Abb.38: Vergleich der Herztransplantatüberlebenszeit nach xenogener Htx und HLTx mit und ohne vorheriger Splenektomie (SPx) (nach Kaplan-Meier)



4.4.2. Serumwerte

Bei der **isolierten xenogenen Herztransplantation** 2 Tage nach Splenektomie wurden signifikant höhere Konzentrationen von Histamin und Komplement gemessenen, als nach xenogener HTx ohne vorherige SPx.
Die Konzentration von Histamin und Komplement war auch im Vergleich zur isogenen HTx signifikant erhöht.
Während sich die IgM-Konzentration niedriger als bei der isogenen und der xenogenen unbehandelten HTx darstellte, waren die Thrombozytenzahlen nur im Vergleich mit der isogenen HTx niedriger (Abb.30-35).

Die Konzentration von Histamin und Komplement war bei der **kombinierten xenogenen Herz-Lungen-Transplantation** 2 Tage nach vorheriger Splenektomie, ebenfalls deutlich gegenüber denen der isogenen HLTx und der unbehandelten xenogenen HLTx erhöht. IgG und IgM waren dagegen in deutlich geringerer Höhe zu messen.
Im Vergleich zur isogenen HLTx lagen die zentral gemessenen Thrombozytenzahlen niedriger, während die Leukozyten höher lagen.

Beim Vergleich der peripher und zentral gemessenen Zahlen und Konzentrationen zeichneten sich keine einheitlichen Veränderungen ab.

Der *Vergleich innerhalb der Gruppe,* zeigte höhere Konzentrationen für Komplement, IgG, IgM und die Thrombozyten nach isolierter xenogener HTx nach SPx, gegenüber den zentral gewonnenen Werten der HLTx nach SPx. Eine gleichartige Veränderung zeigte sich für die peripher gewonnenen Werte von Histamin und IgM.

4.4.3. Histologie und Immunhistologie
(Tabellen 11 und 12 im Anhang)

Ähnlich wie nach unbehandelter xenogener HLTx , war das Herzgewebe nach kombinierter xenogener HLTx nach SPx wieder deutlich besser erhalten als nach isolierter HTx. Ansonsten zeigten sich in der *Histologie* der abgestoßenen Herzen und Lungen kaum Unterschiede zu den unbehandelten Transplantaten.
Wie zu erwarten, zeigte sich in der *immunhistologischen Untersuchung* eine geringere Anreicherung von IgM in den Schnitten von Herz und Lunge.
Genau wie bei der unbehandelten kombinierten xenogenen HLTx, stellte sich in den Herzpräparaten wesentlich weniger C3 dar als in den Präparaten nach isolierter HTx.

4.5. Zusammenfassung

Die Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit durch die kombinierte Herz-Lungen-Transplantation gegenüber der isolierten Herztransplantation wurde auch nach „immunsuppressiver“ Therapie, durch die präoperative Gabe von Tacrolismus, Cyclophospamid und Cobra-Venom-Faktor, sowie nach vorausgegangener Splenektomie beobachtet.
Im Vergleich zur unbehandelten xenogenen Herz- und Herz-Lungen-Transplantation ließ sich eine zusätzliche signifikante Verlängerung der

Herztransplantatüberlebenszeit durch die präoperative Gabe von Cyclophosphamid und Cobra-Venom-Faktor erzielen. Dieser Effekt war sowohl nach isolierter HTx als auch nach kombinierter HLTx zu beobachten.
Die präoperative Behandlung durch Gabe von Tacrolismus, beziehungsweise die vorausgegangene Splenektomie, führte dagegen nicht zu einer signifikanten Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit, weder bei der isolierten HTx, noch bei der kombinierten HLTx.
Bei der Betrachtung der Serumwerte zeigte sich im Vergleich zur xenogenen HLTx, eine durchweg vorhandene Histaminkonzentrationserhöhung, welche sich, bezogen auf die Normalwerte, mehr als verdreifachte. Diese Veränderung war in der Gruppe VI (Cyclophosphamid) nicht ganz so stark ausgeprägt.
Wie nicht anders zu erwarten, war die Komplementkonzentration in der Gruppe V (CVF) deutlich erniedrigt, beziehungsweise nicht messbar. Ansonsten zeigte sich eine durchweg vorhandene signifikante Erhöhung der Komplementkonzentration.
Die Veränderung der Immunglobuline G und M war dagegen nicht einheitlich. Lediglich in den Gruppen VI und VII (Cyclophosphamid und SPx) waren ähnlich niedrige Konzentrationen zu beobachten.
Wie erwartet ,zeigten sich die niedrigsten Thrombozyten- und Leukozytenzahlen in der Cyclophosphamidgruppe.

Gemeinsamkeiten der Gruppen in der *histologischen Untersuchung* waren die durchweg besser erhaltene histologische Struktur der abgestoßenen Herzpräparate nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation, als nach isolierter Herztransplantation.
Aufgrund der deutlich verlängerten Transplantatüberlebenszeit in der Gruppe V (CVF) kamen in den Präparaten Nekrosen zur Darstellung.

In der *immunhistologischen Untersuchung* zeigte sich erwartungsgemäß praktisch keine Anlagerung von C3 in der CVF-Gruppe. Bis auf die CP-Gruppe, war in den übrigen Gruppen eine einheitlich schwächere Bindung von C3 im Herzgewebe nach kombinierter HLTx, als nach isolierter HTx, zu beobachten.

CP führte zu der erwarteten Verringerung der Zellzahlen und die Splenektomie zur verminderten Bindung von IgM im transplantierten Gewebe.
Die Betrachtung des IgM in den übrigen Gruppen, zeigte einheitlich eine verminderte Anlagerung im transplantierten Herzgewebe bei der kombinierten HLTx im Vergleich zur isolierten HTx.

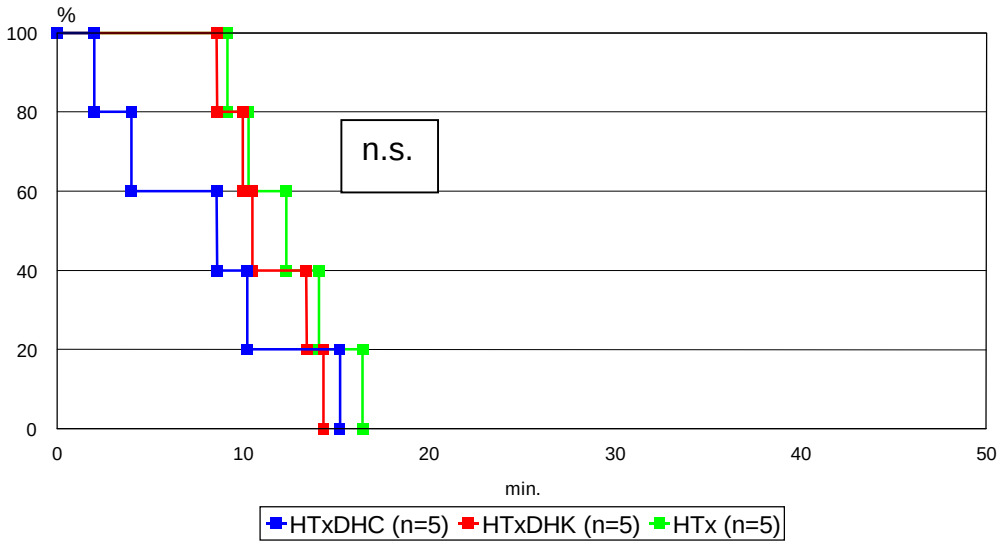
5. Spezifität des „Combi-Effektes“ (Gruppe VIII-X)

5.1. Doppelherz-Transplantation (Gruppe VIII)

5.1.1. Überlebenszeit

Die Überlebenszeit des oberen, kranial implantierten, Herzens betrug im Mittel 7 Minuten und 53 Sekunden, die des unteren, kaudal implantierten, im Mittel 11 Minuten und 27 Sekunden (p=0,71). Damit zeigte sich im Vergleich zur isolierten xenogenen HTx kein positiver Effekt auf die Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit (Abb.39).

Abb.39: Vergleich der Herztransplantatüberlebenszeit nach xenogener Doppelherz-Transplantation mit xenogener HTx und xenogener HLTx (HTxDHC=craniales Herz, HTxDHK=kaudales Herz) (nach Kaplan-Meier)



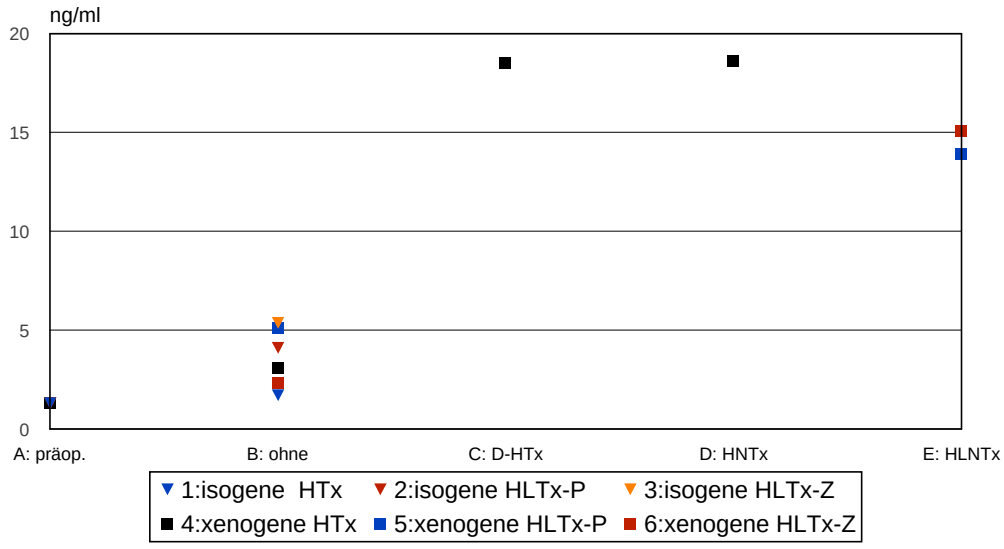
5.1.2. Serumwerte

Nach der zusätzlichen Transplantation eines zweiten Herzens, waren signifikant erhöhte Konzentrationen von Histamin und Komplement zu messen. Außerdem zeigten sich eine niedrigere IgG-Konzentration und eine geringere Leukozytenzahl im Vergleich zur isolierten xenogenen HTx (Abb.40-45).

Abbildungen 40-45 zeigen die Konzentrationen bzw. Zellzahlen als Mittelwerte nach xenogener HTx und HLTx im Vergleich mit der Doppelherz-Transplantation (D-HTx, n=5), der Herz-Nieren-Transplantation (HNTx, n=5) und der Herz-Lungen-Nieren-Transplantation HLNTx, n=5).

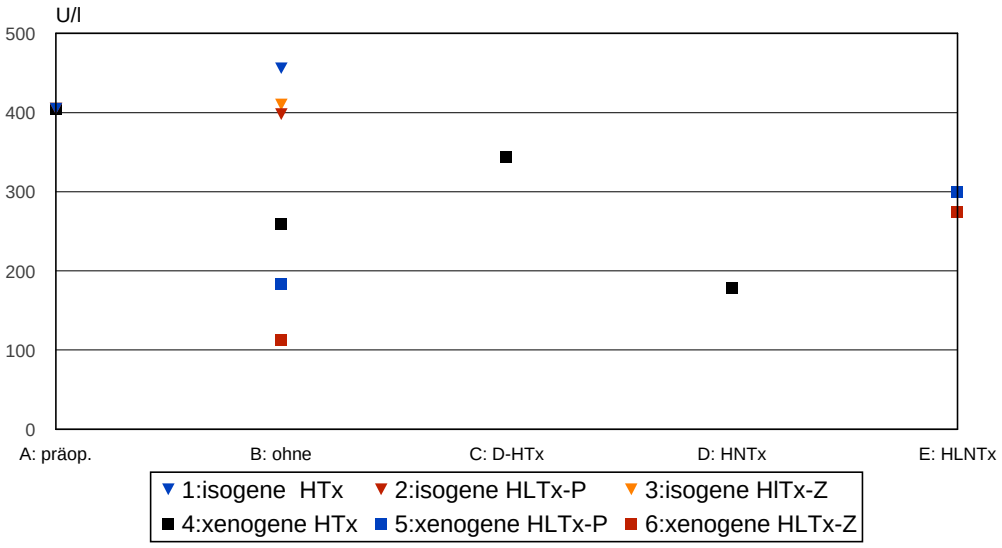
Abb.40: Histamin
Abb.41: Komplement (CH-50)
Abb.42: Immunglobulin M (IgM)
Abb.43: Immunglobulin G (IgG)
Abb.44: Thrombozytenzahl
Abb.45: Leukozytenzahl

Abb.40: Histamin



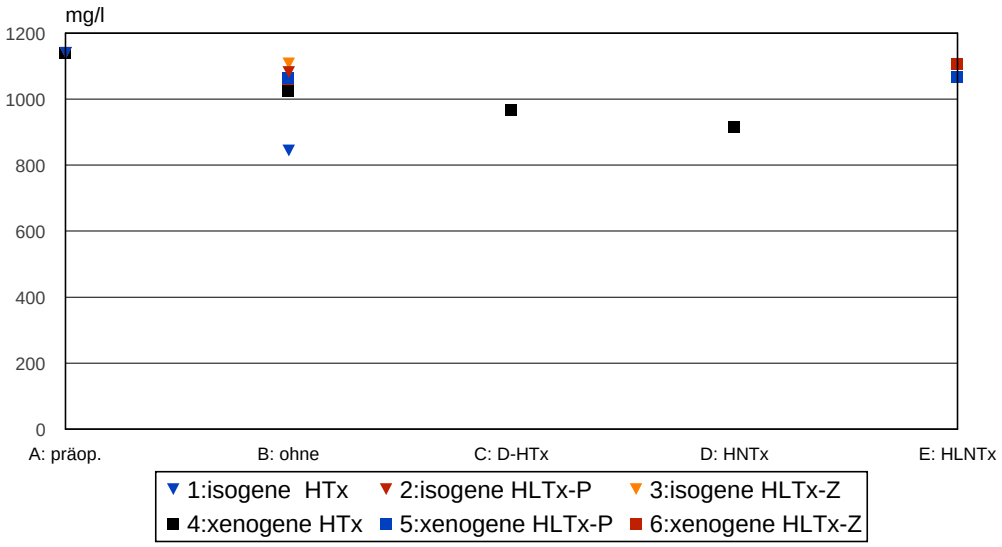
(Varianzanalyse in Tabelle 15 im Anhang H)

Abb.41: Komplement (CH-50)



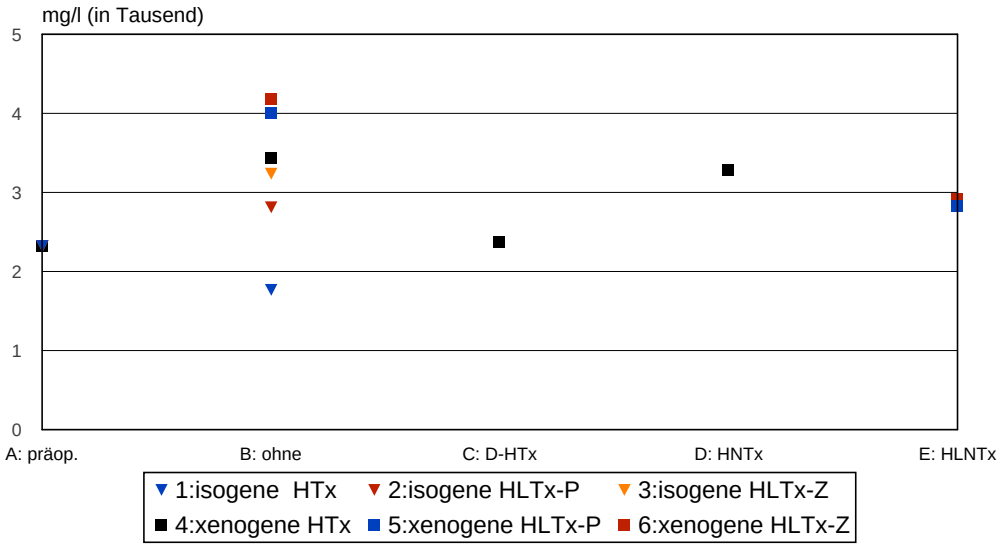
(Varianzanalyse in Tabelle 15 im Anhang H)

Abb.42: Immunglobulin M (IgM)



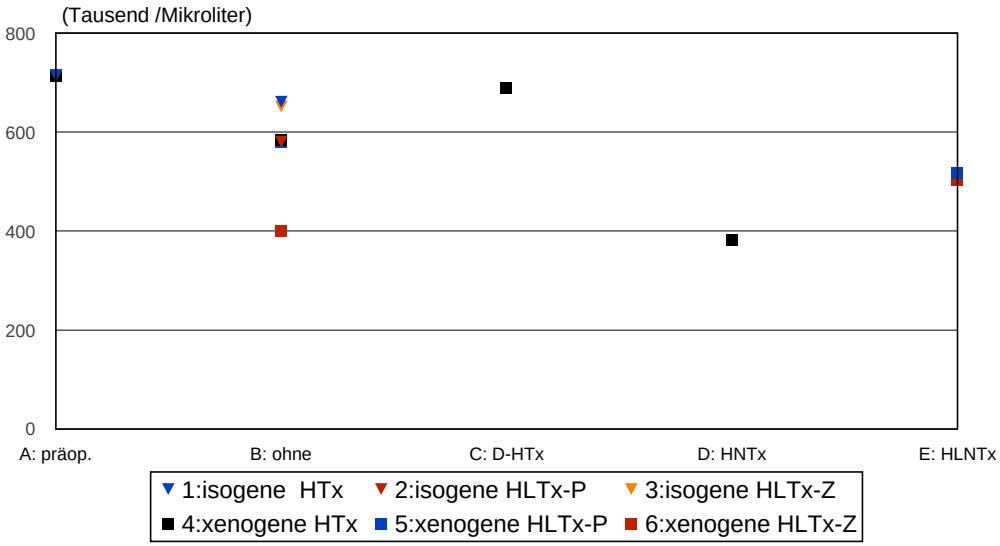
(Varianzanalyse in Tabelle 15 im Anhang H)

Abb.43: Immunglobulin G (IgG)



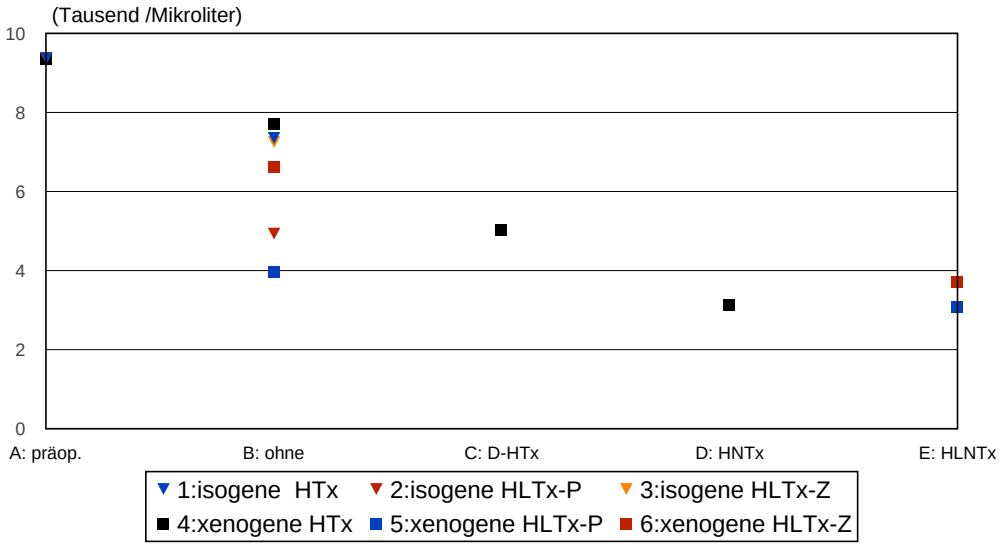
(Varianzanalyse in Tabelle 15 im Anhang H)

Abb.44: Thrombozytenzahl



(Varianzanalyse in Tabelle 15 im Anhang H)

Abb.45: Leukozytenzahl



(Varianzanalyse in Tabelle 15 im Anhang H)

5.1.3. Histologie und Immunhistologie
(Tabellen 11 und 12 im Anhang)

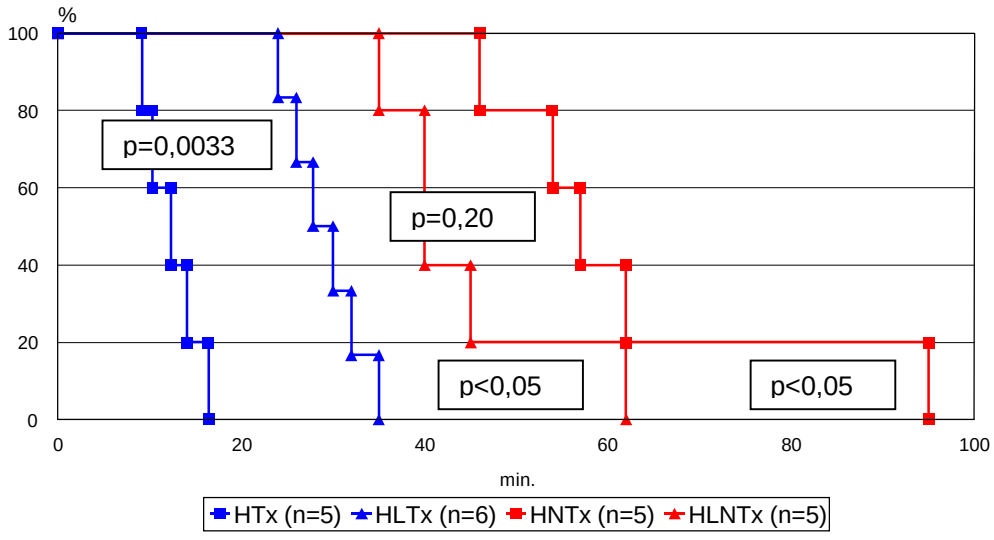
Im Vergleich von kaudalem und cranialem Herzen, fand sich eine stärker ausgeprägte Ödembildung im kaudalen Herzen. Zudem waren einzelne Einblutungen und eine stärkere Anlagerung von C3 nachweisbar. Wesentliche Unterschiede zur Histologie und Immunhistologie der xenogenen isolierten HTx bestanden nicht.

5.2. Kombinierte xenogene Herz-Nieren-Transplantation und kombinierte Herz-Lungen-Nieren-Transplantation (Gruppe IX und X)

5.2.1. Überlebenszeit

Durch die zusätzliche Transplantation einer Niere wurde die Herztransplantatüberlebenszeit gegenüber der isolierten xenogenen Herztransplantation und der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation signifikant verlängert (63 min. zu 12 min. und 25 min., Abb.46).
Die Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit war allerdings bei der Herz-Nieren-Transplantation (HNTx) ausgeprägter als bei der Herz-Lungen-Nieren-Transplantation (HLNTx) zu beobachten (63 min. zu 44 min., Abb. 46). Damit war die Herztransplantatüberlebenszeit aber immer noch gegenüber der xenogenen isolierten HTx und der xenogenen kombinierten HLTx verlängert. Innerhalb der Versuchsgruppe bestand hinsichtlich der Transplantat-überlebenszeit zwar der oben beschriebene Unterschied, allerdings war er statistisch nicht signifikant.

Abb.46: Herztransplantatüberlebenszeit nach xenogener HTx und HLTx im Vergleich mit der HNTx (Herz-Niere) und HLNTx (Herz-Lunge-Niere) (nach Kaplan-Meier).



5.2.2. Serumwerte
(Tabelle 10 im Anhang)

Bei der **xenogenen Herz-Nieren-Transplantation** fiel zum Zeitpunkt der Herztransplantatabstoßung eine höhere Histaminkonzentration, als bei der isogenen und der xenogenen Herztransplantation auf. Die Komplementkonzentration und die Thrombozyten- und Leukozytenzahl dagegen war im Vergleich niedriger.
Bei der **kombinierten xenogenen Herz-Lungen-Nieren-Transplantation** war die Histaminkonzentration ebenfalls höher, als nach isogener und xenogener Herz-Lungen-Transplantation. Im Vergleich mit der isogenen HLTx war die Konzentration von Komplement niedriger und im Vergleich mit der kombinierten xenogenen HLTx höher.
Immunglobulin G war in einer signifikant geringeren Konzentration als bei der xenogenen HLTx zu messen (nur peripher). Die Leukozytenzahl war sowohl peripher als auch zentral niedriger als nach kombinierter HLTx, während die Thrombozytenzahlen keine einheitlichen Veränderungen zeigten.

Beim *Vergleich* der *zentralen mit den peripheren Werten* zeigten sich keine relevanten Unterschiede.

Der Vergleich der Messwerte innerhalb der Versuchsgruppe zeigte signifikant höhere Komplementkonzentrationen bei der kombinierten HLNTx, die übrigen Veränderungen erreichten nicht das Signifikanzniveau.

5.2.3. Histologie und Immunhistologie
(Tabellen 11 und 12 im Anhang H)

In der histologischen Untersuchung der HE-gefärbten Herzgewebsschnitte nach **xenogener Herz-Nieren-Transplantation** zeigten sich gut erhaltene Strukturen. Nekrosen waren nicht nachzuweisen. Ähnlich wie bei der isolierten xenogenen Herztransplantation, kam ein interzelluläres Oedem zur Darstellung.

Auch die Nierenstruktur war gut erhalten, Nekrosen waren nicht zu sehen. Lediglich in einzelnen Schnitten zeigte sich ein interstitielles Ödem.

In der *immunhistologischen Untersuchung* des Herzgewebes nach xenogener Herz-Nieren-Transplantation, fand sich eine ähnlich stark ausgeprägte Bindung von IgM und C3, wie nach kombinierter HLTx (Abb.50,52). Insgesamt aber war die Bindung von IgM und C3 damit aber schwächer ausgeprägt als nach isolierter xenogener HTx . Außerdem fanden sich recht wenige T- und CD-5 Zellen im Herzgewebe.

Im Nierengewebe fiel eine starke Bindung von C3 und IgM auf (Abb.51,53), die allerdings geringer ausgeprägt war, als die im Herzgewebe nach isolierter xenogener HTx. T- und CD-5 Zellen waren nur vereinzelt nachzuweisen und damit seltener vorhanden, als in den Lungengewebsschnitten nach kombinierter xenogener HLTx.

Die *histologische Untersuchung* der Präparate nach **kombinierter xenogener Herz-Lungen-Nieren-Transplantation** zeigte keine Unterschiede zur HNTx (Abb.47 -53).
In der *immunhistologischen Beurteilung* des abgestoßenen Herzgewebes (Abb.50,52) kam C3 ähnlich ausgeprägt zur Darstellung wie nach HLTx. Im Lungengewebe fiel im Vergleich zur HLTx eine schwächere Bindung von C3 und IgM auf.
Im Vergleich des Nierengewebes mit dem Lungengewebe, zeigte sich eine geringere Bindung von C3 und eine stärkere IgM-Bindung. Die Präsenz von T-Zellen, Makrophagen und Monozyten im Nierengewebe war nur gering.
Insgesamt war mehr C3 und IgM in den Nieren nach HNTx ,als nach HLNTx nachzuweisen.

In der **zusammenfassenden Beurteilung** der immunhistologischen Untersuchung fand sich eine schwächere Bindung von IgM im Lungengewebe als nach HLTx.
C3 stellte sich im Lungengewebe stärker als im Nierengewebe dar, während die Bindung von IgM schwächer ausgeprägt war.

Nach HNTx zeigte sich eine stärkere Anlagerung von C3 und IgM im Nierengewebe als nach HLNTx.

Der Nachweis von IgM und C3 im Herzgewebe war vergleichbar nach HNTx und HLNTx und insgesamt schwächer als nach isolierter xenogener HTx.

Abbildung 47 zeigt eine Meerschweinchen-Niere, nicht tranplantiert mit normaler Histologie

Abbildungen 48-53 zeigen Meerschweinchen-Nieren und Herzen nach xenogener HNTx

Abb.47:

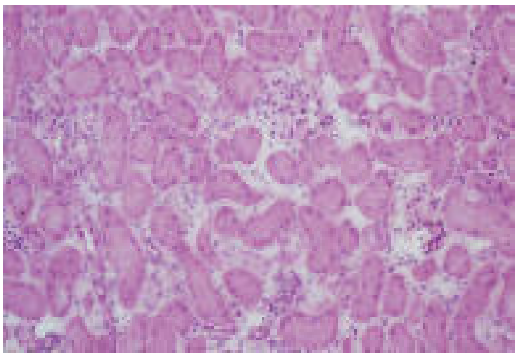


Abb.48:

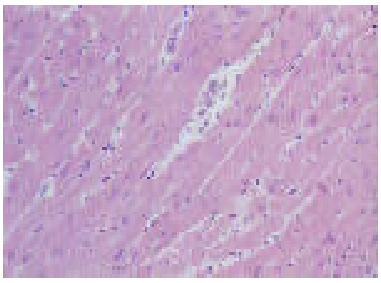


Abb.49:

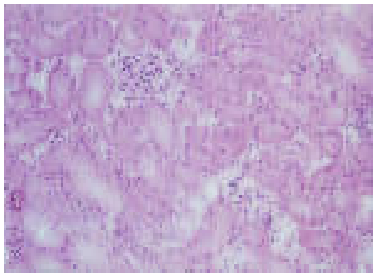


Abb.50:

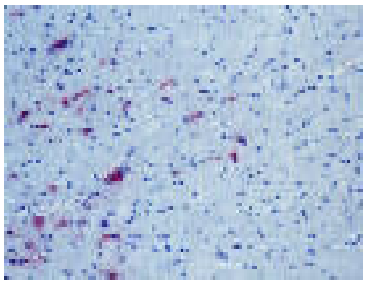


Abb.51:

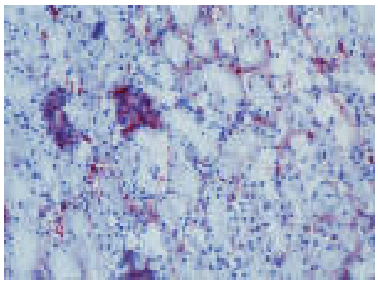


Abb.52:

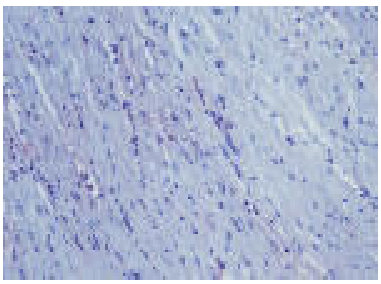
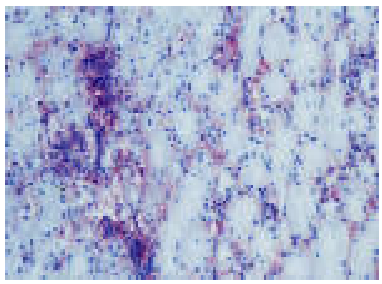


Abb.53:



Abbildungen 47-53:

Abb.47: Meerschweinchen-Niere, normale Histologie, HE-Färbung

Abb.48: Meerschweinchen-Herz nach HNTx, HE-Färbung, ähnlicher Befund wie nach HLTx

Abb.49: Meerschweinchen-Niere nach HNTx, HE-Färbung, gut erhaltene Struktur, ausgeprägtes Ödem

Abb.50: Meerschweinchen-Herz nach HNTx, C3 (ED-11), deutlicher Nachweis von C3, weniger ausgeprägt als nach isolierter HTx.

Abb.51: Meerschweinchen-Niere nach HNTx, C3 (ED-11), sehr ausgeprägter Nachweis von C3

Abb.52: Meerschweinchen-Herz nach HNTx, IgM, schwache Expression von IgM

Abb.53: Meerschweinchen-Niere nach HNTx, IgM, mäßiger Nachweis von IgM

(alle 200 fache Vergrößerung)

E. Diskussion

Für Patienten, deren Organe als Folge einer Erkrankung oder eines Unfalls irreversible Schäden erlitten haben, stellt die Organtransplantation die einzige Möglichkeit dar, ein „maschinenunabhängiges“ (Herz-Lungen-Maschine, Dialyse) Leben zu führen. Eine bereits beschriebene Problematik der Transplantationsmedizin stellt die wachsende Diskrepanz zwischen Organangebot und Organnachfrage dar.

Bezogen auf Deutschland, war die Zahl der Transplantationen im Jahre 2001 zum Vergleichsjahr 2000 zurückgegangen (22). Insgesamt wurden Im Jahr 2001 3819 Organe transplantiert, das entspricht einem Rückgang der Transplantationen um 2% im Vergleich zum Vorjahr. Vor allem die Zahl der Herztransplantationen hat abgenommen. Während 1999 noch 500 Herzen übertragen werden konnten, waren es im Jahre 2001 nur noch 418 (-16%) (22). In den beiden Folgejahren 2002 und 2003 setzte sich dieser Trend weiter fort. Während 2002 noch 395 Herzen transplantiert wurden sank die Zahl der transplantierten Herzen 2003 auf 374 (31). Dieses entspricht einem Rückgang um weitere 5,3%. Eine ähnliche Entwicklung zeigte sich für die Lungentransplantation. Zugenommen haben dagegen die Zahlen der Nieren-, Leber-, und der kombinierten Pankreas- Nieren-Transplantationen (22,31).

Gründe hierfür finden sich einerseits in der Abnahme bei der Organspende, andererseits kamen weniger Organe aus den Eurotransplant-Partnerländern Niederlande, Belgien, Österreich und Slowenien, sowie anderen Ländern nach Deutschland. Während es für niereninsuffiziente Patienten außer der Transplantation noch die Möglichkeit der Dialyse zur Lebenserhaltung gibt, besteht eine solche für andere Organe wie zum Beispiel das Herz oder die Leber nicht.

Im Jahre 2003 warteten in Deutschland etwa 12.000 schwerkranke Menschen auf ein neues Organ, allein etwa 9.500 auf eine Niere. Etwa ein Drittel der Patienten, die auf eine Leber, ein Herz oder eine Lunge angewiesen sind, starben, bevor ein Organ zur Verfügung gestellt werden konnte (31). Diese Diskrepanz zwischen „Angebot und Nachfrage“ zeigt deutlich die Problematik der Organknappheit.

Als Folge der Organknappheit wird in zunehmendem Maße die „emotionale“ Organlebendspende unter Verwandten und auch unter Nichtverwandten durchgeführt (59,72).

Eine andere Möglichkeit dieser Problematik zu begegnen, ist die Intensivierung der Forschung auf dem Gebiet der Xenotransplantation, also der Transplantation von Organen über die Speziesgrenze hinaus.
Neben dem offensichtlichen Vorteil, nämlich der raschen Beseitigung des Organmangels, hätte ein funktionierendes Xenotransplantationsverfahren weitere Vorteile (modifiziert nach Markmann (67)):

- Verbesserung der Transplantationsergebnisse durch die freie Verfügbarkeit der Spenderorgane und die damit verbundene Verkürzung der Ischämiezeiten
- Abbau der Wartelisten
- Transplantationen unabhängig von der Organspendebereitschaft der Bevölkerung
- Verzicht auf Lebendspende

Entwicklung der Xenotransplantation, Vergangenheit und Gegenwart

Nachdem im späten 19. Jahrhundert erste frustrane Versuche von xenogenen Transplantationen durchgeführt worden waren (z.B. Hauttransplantation vom Rind auf das Pferd), stellten sich zu Beginn des 20. Jahrhunderts erste Erfolge ein.
1906 führte Jabuolay die erste xenogene Organtransplantation (erste humane Transplantation überhaupt), eine Nierentransplantation Schwein-Mensch, durch. Nach drei Tagen wurde die Niere aufgrund der nicht beherrschbaren Abstoßungsreaktion abgestoßen (50). 1954 erfolgte die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen durch Murray. Der Erfolg dieser allogenen Transplantation war wichtig für das Verständnis der immunologischen Zusammenhänge der Abstoßungsreaktionen bei nicht identen Gewebsmerkmalen.
1958 wurde das HLA-System durch Dausset entdeckt.

Reemtsma transplantierte 1964 Nieren von Schimpansen auf Menschen und erreichte Transplantatüberlebenszeiten von bis zu 9 Monaten (85).
Im gleichen Jahr erfolgte die erste xenogene Transplantation einer Schimpansenleber auf einen Menschen durch Starzl (94) und die erste xenogene Herztransplantation, durch Hardy (44) . Leider ohne größeren Erfolg, der Patient starb noch am Operationstag.
Bis Mitte der achtziger Jahre verliefen viele weitere Versuche einer xenogenen Transplantationen erfolglos. 1984 transplantierte Bailey das Herz eines jungen Pavians einem Kind mit hypoplastischem Linksherzsyndrom. Das als „Baby Fae“ bekannt gewordene Kind überlebte immerhin 20 Tage (12). 1992 überlebte ein Patient die xenogene Transplantation einer Pavianleber durch Starzl 2 Monaten bis er an Hirnblutungen verstarb (94,95).

Anfang der neunziger Jahre wurde die dritte Ära in der Xenotransplantation durch die Entwicklung sogenannter transgener Schweine eingeleitet (100). Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Abstoßung xenogener Transplantate innerhalb weniger Minuten bis Stunden. Durch Immunsuppressiva konnte die Überlebenszeit der Transplantate nur unwesentlich verlängert werden.
Wenn aber humane Komplement-hemmende Eiweißmoleküle, anstelle der porzinen, auf den porzinen Endothelzellen exprimiert werden (Schwein-Mensch) kann die Abstoßung deutlich verzögert werden. Dieses gelang mit der Züchtung transgener Schweine (65,100). Hierbei wird ein humaner Genabschnitt - ein Komplement-hemmendes Eiweiß - der „human decay accelerating factor“ hDAF, in das Genom des Schweines eingeschleust. Dadurch produzieren die porzinen Endothelzellen nun das humane Eiweiß und präsentieren es auf ihren Zelloberflächen. Die Blutgefäße des Schweines werden sozusagen „humanisiert“.
Im Vergleich zu normalen Schweinen überlebt eine hDAF-transgene Schweineniere in Cynomolgus-Affen bis zu 99 Tage, im Mittel etwa 40 Tage (101). Ähnlich verhält es sich mit porzinen Herzen. Während normale Schweineherzen in wenigen Minuten bis Stunden hyperakut abgestoßen werden, überleben hDAF-transgene Schweinherzen bis zu 39 Tage, im Mittel etwa 20 Tage (101).

Mit der Überwindung der hyperakuten Abstoßung ist gegenwärtig aber nur die erste immunologische Hürde genommen; zwei weitere Hürden, die akute vaskuläre (Antikörper vermittelt), und die akute zellvermittelte (T-Zell-vermittelt) sind noch relevant.

Ein weiterer Bestandteil der aktuellen Forschung in der Xenotransplantation ist die extrakorporale Perfusion, auch „bridging“ genannt. Darunter versteht man das Durchspülen einer isolierten Schweineleber bzw. isolierter Schweine-Leberzellen in einem Bioreaktor mit menschlichem Blut außerhalb des Körpers des Patienten (37). Erste klinische Erfolge einer Berliner Arbeitsgruppe, bei Patienten mit Leberversagen die erfolgreich behandelt wurden, mussten inzwischen gestoppt werden. Grund hierfür war die Sorge, dass das komplexe Membransystem des Bioreaktors den Übertritt porziner Pathogene, insbesondere porziner endogener Retroviren (PERV), in den menschlichen Blutkreislauf nicht sicher verhindern könne. Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden ob es zu PERV-Infektionen in vivo kommt (36,45,75,77,96,104).

Die größten Chancen für den klinischen Durchbruch werden zur Zeit den xenogenen Zell- und Gewebstransplantationen eingeräumt. Erste Erfolge wurden mit der Transplantation fetaler porziner Nervenzellen in die Gehirne von Parkinsonpatienten (33) und mit der Transplantation fetaler porziner Langerhanszellen bei gleichzeitiger Transplantation einer menschlichen Niere bei dialysepflichtigen Typ I-Diabetikern beschrieben (37).

Ein anderer Ansatz zur Verhinderung der immunologischen Abstoßungsreation von Xenotransplantaten besteht in der Mikroverkapselung des transplantierten Materials (Pankreasinseln, endokrine Vorläuferzellen des Pankreas). Hierfür wird derzeit das aus Algen gewonnene Polysaccharid Alginat getestet dass durch Abschirmung vor der T-Zell-vermittelten Immunreaktion die Überlebenszeit des Transplantates bei Xenotransplantationen verlängern kann (73).

Grundlagen

Aus der klinischen allogenen Transplantation ist bekannt dass eine simultane Transplantation die Transplantat-Überlebenszeit verlängern kann.
Die Abstoßungsreaktion transplantierter Herzen nach allogener kombinierter Herz-Lungen-Transplantation fällt deutlich geringer aus, als nach isolierter Herztransplantation (13,51,107). Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Lebertransplantation, mit simultaner Transplantation von Haut oder Niere vom gleichen Spender beobachtet (84).
Dieser Effekt, die Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit bei simultaner Transplantation der Lunge, wurde von Westra als „Combi-Effekt“ bezeichnet (109). Im Gegensatz zu Kutlu, der eine Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit im allogenen Kleintiermodell nur unter der gleichzeitigen immunsuppressiven Medikation mittels Cyclosporin A erreichte (59), konnte Westra diesen protektiven Effekt auch ohne immunsuppressive Medikation nachweisen. Ursächlich verantwortlich für die Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit machte Westra das in der transplantierten Lunge zusätzlich vorhandene lymphatische Gewebe (110).

Kelm konnte für das allogene Kleintiermodell eine signifikante Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit durch eine kombinierte Herz-Lungen-Transplantation (11 Tage), im Vergleich zur isolierten Herztransplantation (7 Tage), nachweisen. Dieses gelang ohne gleichzeitige immunsuppressive Therapie (55,56).
Im xenogen konkordanten Kleintiermodell wies Yoshida nach simultaner Splenektomie und unter Immunsuppression mittels FK-506 bemerkenswerterweise eine Verkürzung der Herztransplantatüberlebenszeit nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation, gegenüber der isolierten Herztransplantation, nach (116). Eine Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis gab er nicht.
Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich eine Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit im xenogen diskordanten Kleintiermodell allein durch simultane Lungentransplantation erreichen lässt, oder ob sich, wie bei Yoshida, eine Verkürzung der Herztransplantatüberlebenszeit einstellt.

Transplantationstechniken

Die isolierten heterotopen Herztransplantationen wurden in der von Ono-Lindsey (74) beschriebenen Technik, modifiziert nach Araneda (4), durchgeführt.

Die kombinierte heterotope Herz-Lungen-Transplantation erfolgte mit dem von Lee (62,63) etablierten Modell, modifiziert nach Fox und Montorsi (34,87).

Die Anastomosierung im Modell von Lee erfolgte zwischen Spender- und Empfängeraorta, sowie zwischen rechtem Vorhof und Vena cava inferior.

In der durch Fox und Montorsi modifizierten Technik wurde auf die zweite Anastomose (rechter Vorhof-Vena cava inferior) verzichtet. Dadurch veränderte sich natürlich der Blutstrom innerhalb des Transplantates.

Als Folge des Verzichts auf die zweite Anastomose, floß das Blut nun aus der Empfängeraorta durch die Spenderaorta in die Koronargefäße des Spenderherzens. Von dort aus über den rechten Ventrikel durch den pulmonalen Kreislauf, linken Vorhof und Ventrikel, weiter in die Spenderaorta und in den Empfängerkreislauf (Abb.59, 60).

Abb.59: Schema der Blutstromrichtung bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation, modifiziert nach Fox-Montorsi (34,87)

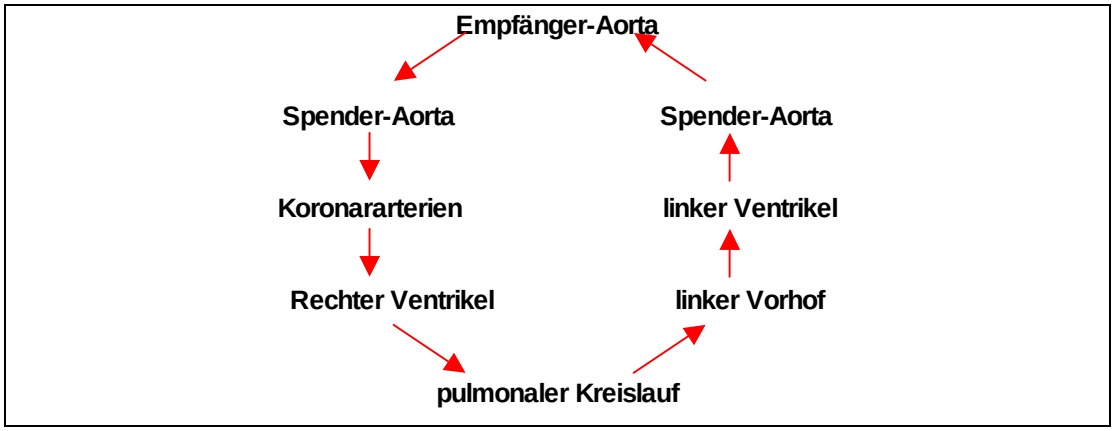
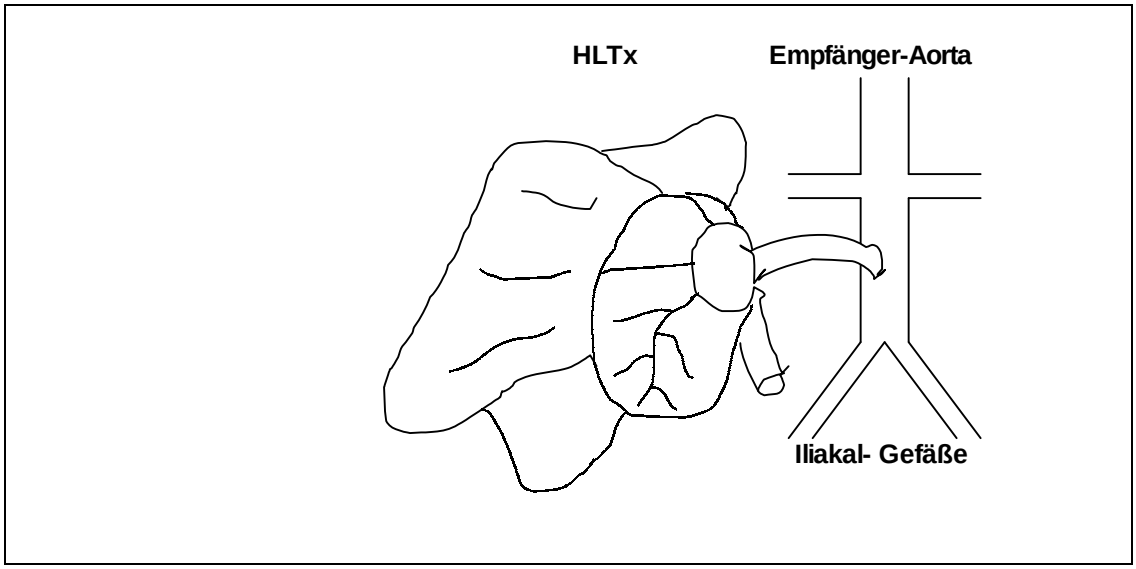


Abb. 60: Schema der Herz-Lungen-Transplantation, modifiziert nach Fox-Montorsi.



Im Gegensatz zu dem von Lee, Fox und Montorsi etablierten Modell, bei dem die gesamte Lunge transplantiert wurde, beschränkte Arai (3) sich auf die drei rechten Lungenlappen. Da sich im vorgestellten Modell intraoperativ Perfusionsprobleme des rechten Lungenflügels darstellten, transplantierte ich den linken Lungenflügel, unter Aussparung des rechten, postcaval links liegenden Lungenlappens. Durch diese Modifikation, stellte sich eine gute Durchblutung und Funktion des transplantierten Herzens ein, vergleichbar mit der des isoliert transplantierten Organs.

Bei dem verwendeten Modell konnte aufgrund der nicht ventilierten Lunge keine Aussage über die Funktion des Lungentransplantates gemacht werden. Durch verschiedene Untersuchungen wurde aber durch Kelm und Prop ein Einfluß der Anastomosentechnik, der Heparingabe sowie der Ventilation der transplantierten Lunge ausgeschlossen (56,82).

Xenogene Transplantation

Zunächst erfolgte eine xenogene Transplantation (HTx und HLTx) ohne immunsuppressive Medikation der Empfängertiere.

Die Herztransplantatüberlebenszeit war durch die simultane Transplantation der Lunge signifikant, gegenüber der isolierten xenogenen Herztransplantation, verlängert (25 min. zu 12 min.). Dieser Effekt war bislang nur für die klinische und experimentelle allogene Transplantation und noch nicht nach xenogen diskordanter Transplantation beschrieben worden (59,109,110).
Die Erklärung für die Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit bei gleichzeitiger Transplantation der Lunge im allogenen Modell, ist laut Winter (114) auf die Ansammlung lymphatischer Zellen in enger Beziehung zum Bronchialepithel und zur Submucosa, sog. BALT (bronchus associated lymphoid tissue) zurückzuführen (115). Das transplantierte Lungengewebe filtert die gegen das Transplantat gerichteten Lymphozyten heraus, so dass die Abstoßung durch die kombinierte Herz-Lungen-Transplantation herausgezögert wird.

Diese Erklärung ist nicht auf das xenogen-diskordante HTx-Modell übertragbar. Die Abstoßungsreaktion verläuft im xenogen diskordanten Modell hyperakut innerhalb weniger Minuten und wird dabei hauptsächlich über eine Aktivierung des Komplementsystems und eine Bindung von natürlichen Antikörpern vermittelt (8,10,61). Die Abstoßungsreaktion nach allogener Transplantation setzt dagegen erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt ein und findet überwiegend zellvermittelt statt (25).

Bei der histologischen Untersuchung der abgestoßenen Transplantate ließen sich erwartungsgemäß keine Nekrosen nachweisen. Dies ist durch die nur sehr kurze Transplantatüberlebenszeit erklärbar.
Aufschlussreicher dagegen war die immunhistologische Betrachtung. Hier zeigte sich eine deutlich schwächer ausgeprägte Bindung des Komplementmarkers C3 sowie IgM im Herzgewebe nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation, als im Lungengewebe und als nach isolierter Herztransplantation im Herzgewebe. Gleichermaßen deutliche Veränderungen zeigten sich bei der Serumkonzentration des Komplements. Sowohl bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation, als auch bei der isolierten Herztransplantation, zeigte sich ein deutlicher Abfall der Komplement-

konzentration zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung, verglichen mit den Kontrollwerten und den Werten nach isogener Transplantation. Bei den Zehn-Minuten-Werten war diese Entwicklung noch nicht zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden muß, dass der Verbrauch von Komplement in den wenigen verbleibenden Minuten bis zur Abstoßung stattgefunden haben muß.
Bei der Betrachtung der Komplementkonzentration zum Zeitpunkt der Abstoßung, fanden sich signifikant niedrigere Werte nach kombinierter als nach isolierter Herztransplantation.
Möglicherweise filtert das mittransplan-tierte Lungengewebe Komplement und IgM heraus, so dass die Abstoßungsreaktion der Herztransplantate bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation verlangsamt bzw. verzögert abläuft.
Der perioperative Anstieg der Histaminwerte ist als operationsbedingt anzusehen, zumal die Histaminkonzentration zum Zeitpunkt der Abstoßung, verglichen mit den Kontrollwerten, keine signifikanten Unterschiede mehr aufwies.

Xenogene Transplantation unter Immunsuppression

Nachdem sich der „Combi-Effekt“ bei der xenogenen HTx und HLTx nachweisen ließ, sollte untersucht werden ob er auch unter gleichzeitiger Immunsuppression zu beobachten ist.

Hierzu erfolgte jeweils die isolierte Herztransplantation und die kombinierte Herz-Lungen-Transplantation nach Gabe von Tacrolismus (FK 506), Cyclophosphamid (CP), Cobra-Venom-Factor (CVF) und 2 Tage nach vor-ausgegangener Splenektomie des Empfängertieres (Gruppen VI-VII).

Unter der immunsuppressiven Medikation mit Tacrolismus und nach Sple-nektomie wurde, verglichen mit der unbehandelten Gruppe, keine zusätzliche Verlängerung der Herztransplantationsüberlebenszeit beobachtet.

Allerdings gelang eine zusätzliche Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit unter der Immunsuppression mit Cyclophosphamid und Cobra-Venom-Factor.
Bei allen unter Immunsupression oder nach Splenektomie durchgeführten Versuchreihen ließ sich aber wieder der „Combi-Effekt“, also die Verlängerung der Herztransplantationsüberlebenszeit durch simultane Transplantation von Lungengewebe, im Vergleich zur isolierten Herztransplantation nachweisen.
Bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation nach präoperativer Gabe von Cobra-Venom-Faktor konnte die deutlichste Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit erreicht werden. Die durchschnittliche Herztransplantatüberlebenszeit lag bei neun Stunden, im Vergleich zu durchschnittlich 5,8 Stunden bei der isolierten Herztransplantation nach Cobra-Venom-Faktor. Zwar resultierte aus der immunsuppressiven Behandlung mit CVF eine deutliche Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit, verglichen mit den von Candinas (19) beschriebenen Überlebenszeiten im Meeschweinchen-Ratte-Modell (Herztransplantatüberlebenszeit 67 Stunden) fiel sie aber doch vergleichsweise gering aus. Eine Erklärung für diesen Unterschied konnte ich nicht finden.

Ungewöhnlicherweise ließen sich in den Versuchsgruppen mit Immunsuppression höhere Werte für Histamin und Komplement, als in den unbehandelten Gruppen nachweisen. Ein Absinken der Histamin- und Komplementkonzentration, wie nach Transplantation ohne Immunsuppression, war nicht zu beobachten. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung, könnte die zusätzliche Manipulation am Empfängertier, wie zum Beispiel die Splenektomie oder die Applikation der Immunsuppressiva selbst, sein.
Nach vorangegangener Gabe von Cyclophosphamid und nach Splenektomie zeigte sich im Blut der Empfängertiere ein ausgeprägter Abfall der Immunglobuline IgM und IgG. Wie erwartet führte die Cyclophosphamidgabe zu einer deutlichen Senkung der Leukozytenzahl.

Abgesehen von der Cobra-Venom-Gruppe, ließ sich in allen anderen Gruppen eine einheitlich schwächere Bindung von C3 im Herzgewebe nach

kombinierter-, als nach isolierter Herztransplantation nachweisen. Gleiches galt, die Gruppe nach Splenektomie ausgenommen, für den Nachweis von IgM.
Zusammenfassend ist der „Combi-Effekt“ im xenogenen diskordanten Kleintiermodell auch unter Immunsuppression nachweisbar. Die Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit ist durch das Abfangen bzw. Filtern von Komplement und IgM durch das mittransplantierte Lungengewebe zu erklären, wie bei der nicht immunsuppremierten Gruppe.

Spezifität des „Combi-Effekts“

Um zu klären ob der beobachtete „Combi-Effekt“ spezifisch für das simultan transplantierte Lungengewebe ist, oder ob er auch bei simultaner Transplantation von anderem Gewebe nachweisbar ist, transplantierte ich zusätzlich ein zweites Herz (D-HTx), oder eine Niere (HNTx und HLNTx).

Westra beobachtete im allogenen Modell nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation und nach kombinierter Herz-Milz-Transplantation unter Cyclosporin A Medikation eine signifikant verlängerte Herztransplantatüberlebenszeit (110,112). Damit ist der „Combi-Effekt“ im allogenen Modell nicht lungengewebsspezifisch.
Auch in Modellen, in denen kein Herz transplantiert wurde, zeigte sich der positive Effekt eines simultan transplantierten Organes auf die Transplantatüberlebenszeit. So wurde bei der allogenen Milz-Pankreas-Transplantation eine Verlängerung der Pankreasüberlebenzeit gegenüber der isolierten Pankreastransplantation beschrieben (114).
Bezugnehmend auf diese Ergebnisse, postulieren Winter und Westra, dass der „Combi-Effekt“ nicht nur bei Herztransplantaten nach kombinierter allogener Herz-Lungen-Transplantation zu beobachten ist, sondern ein generelles Phänomen bei Organtransplantationen mit lymphatischem Gewebe darstellt. Somit sei es auch auf die humane Transplantation zu übertragen (112,114). Gestützt wird diese Annahme durch die Schilderung besserer Ergebnisse nach einer kombinierten humanen Transplantation von

Pankreas und Nieren-, im Vergleich zur isolierten Pankreastransplantation (97).
Diese Meinung teilen Dafoe und Cambell nicht: denn bei der kombinierten Pankreas-Milz-Transplantation konnten in der Klinik keine Verlängerung der Überlebenszeiten der Pankreas-Transplantate beobachtet werden (26,27).

Zur Beantwortung der Frage ob das mittransplantierte Lungengewebe spezifisch für den beobachteten „Combi-Effekt“ in meinem xenogen diskordanten Tiermodell ist, transplantierte ich zunächst ein zweites Herz anstelle der Lunge (Gruppe VIII). Es zeigte sich keine Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit gegenüber der isolierten Herztransplantation. Dann transplantierte ich zusätzlich zum Herzen eine Niere des selben Spendertieres (Gruppe IX). Hier konnte ich wieder eine Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit beobachten. Die Verlängerung fiel sogar deutlicher aus als bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation (HNTx:62min. zu HLTx:25min.). Der Versuch, die Herztransplantatüberlebenszeit, durch zusätzlich zu Herz und Niere transplantiertes Lungengewebe im Vergleich zur Herz-Nieren-Transplantation zu verlängern, gelang nicht. Im Gegenteil, bei Kombination einer Herz-Lungen-Transplantation mit einer Nierentransplantation, verkürzte sich die Herztransplantatüberlebenszeit auf 44 min. (Gruppe IX).

Diese Beobachtung, dass eine Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit aus einer kombinierten Herz-Nieren-Transplantation resultiert, ist bislang weder für die allogene, noch für die xenogene Transplantation in der Literatur beschrieben.
Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung fand sich in der immunhistologischen Untersuchung. Im abgestoßenen Herzgewebe konnte eine schwächere Bindung von C3 und IgM nach kombinierter Herz-Nieren-, bzw. Herz-Lungen-Nieren-Transplantation, als nach isolierter Herztransplantation nachgewiesen werden. Dagegen war C3 und IgM im untersuchten Lungen- und Nierengewebe stärker gebunden. Die gemessene Serum-Komplementkonzentration war ebenfalls signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

Ähnlich wie bei der kombinierten Herz-Lungen-Transplantation, scheint das zusätzlich transplantierte Gewebe, in diesem Fall das Nierengewebe, durch ein Abfangen bzw. Filtern von Komplement, ursächlich für die Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit verantwortlich zu sein.

Der „Combi-Effekt“ nach xenogener Transplantation ist also nicht spezifisch für das zusätzlich transplantierte Lungengewebe, er ist auch zu beobachten, bei zusätzlicher Transplantation von Nierengewebe.

Das mittransplantierte lymphatische Gewebe ist wesentliche Voraussetzung für das Auftreten des „Combi-Effektes“ im allogenen Modell (109). Nach kombinierter xenogener Herz-Nieren-Transplantation (Gruppe IX) zeigte sich eine deutliche Verlängerung der Herztransplan-tatüberlebenszeit im Vergleich zur isolierten Herztransplantation. Die Verlängerung fiel sogar deutlicher aus als bei der kombinierten Herz-Lungen-Nieren-Transplantation. Da die Niere aber nur sehr wenig lymphatisches Gewebe enthält, ist Westras Aussage bezüglich des lymphatischen Gewebes als Voraussetzung für das Auftreten des „Combi-Effektes“ nicht übertragbar auf das xenogene Meerschweinchen-Ratte-Modell.
Da auch die humane Niere sehr wenig lymphatisches Gewebe enthält, müssen weitere Untersuchungen angestellt werden, um zu klären, welche Auswirkungen eine kombinierte Herz-Nieren-Transplantation auf die Herz-transplantatüberlebenszeit in der Klinik hätten.
Eine mögliche Erklärung für die Verlängerung der Herztransplantat-überlebenszeit nach kombinierter Herz-Nieren-Transplantation gegenüber der kombinierten Herz-Lungen-Nieren-Transplantation könnte in dem höheren Endothelanteil der transplantierten Niere, im Vergleich zum transplantierten Lungenflügel liegen. Dagegen spricht, dass aus der Trans-plantation beider Lungenflügel keine Verlängerung der Herztransplan-tatüberlebenszeit resultierte (56), obwohl sich der Endothelanteil des transplantierten Gewebes vergrößert hatte. Ebenso konnte keine weitere Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit durch zusätzliche Transplantation der Lunge (Gruppe IX, HLNTx) erreicht werden, die Überlebenszeit der Herztransplantate war sogar geringer.

Vergleich der peripheren und zentralen Serum- bzw. Blutwerte

Es ließen sich keine signifikanten, einheitlich veränderten Serum- oder Blutwerte bei der Betrachtung der Versuchsgruppen feststellen.
Lediglich die Komplementkonzentration lag peripher höher als zentral, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Bei der Planung der Versuchsreihen waren für die zentral zu bestimmenden Werte niedrigere Konzentrationen von Komplement, IgG und IgM, sowie höhere Konzentrationen von Histamin und höhere Leukozytenzahlen als bei der peripheren Bestimmung erwartet worden.
Aufgrund der sehr kurzen Überlebenszeiten, waren zum Teil wiederholte Blutentnahmen innerhalb eines kurzen Zeitraumes durchgeführt worden. Es ist nicht auszuschließen, dass dieses eine Auswirkung auf die gemessenen Parameter hatte.

Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung des „Combi-Effektes“ im xenogen diskordanten Kleintiermodell (Meerschweinchen-Ratte). Die hyperakute Abstoßungsreaktion wird hierbei vorwiegend über eine Komplementaktivierung mit entsprechendem Komplementverbrauch vermittelt.
Es zeigte sich eine Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit die durch eine Filterung bzw. Inaktivierung von Komplement im zusätzlich transplantierten Lungengewebe hervorgerufen zu sein scheint. Der Nachweis des „Combi-Effektes“ gelang auch unter einer immunsuppressiven Therapie (CP, FK-506, CVF und nach SPx).
Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der „Combi-Effekt“ nicht spezifisch für das Lungengewebe ist, sondern auch bei Transplantation von Nierengewebe anstelle der Lunge, zu beobachten ist.
Neben dem Komplement sind die Immunglobuline, hier besonders das IgM, bei der xenogenen Transplantation von Herz, bzw. Herz- und Lunge, von Bedeutung. Bei der kombinierten Herz-Nieren-Transplantation dagegen, scheinen sie nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Bei der Beschäftigung mit dem Thema der xenogen diskordanten Abstoßungsreaktion und ihrer Beinflussung hat die vorliegende Arbeit Ergebnisse erbracht die bislang noch nicht in der Literatur beschrieben worden sind.

F. Zusammenfassung

Aus der klinischen Transplantation ist bekannt, dass die Zahl der akuten Abstoßungsreaktionen von Herztransplantaten nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation geringer ist, als bei der isolierten Herztransplantation.
Dieses Phänomen, eine Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit durch simultane Transplantation einer Lunge vom gleichen Spender zu erreichen, konnte tierexperimentell für allogene Transplantationen nachgewiesen werden. Er wird der „Combi-Effekt“ genannt.
Im xenogen konkordanten Modell gelang dagegen kein Nachweis einer Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit durch eine kombinierte Herz-Lungen-Transplantation.

In dieser tierexperimentellen Arbeit wurde untersucht, ob sich der „Combi-Effekt“ im xenogen diskordanten Kleintiermodell nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation, im Vergleich mit der isolierten Herztransplantation, beobachten lässt.

Dazu wurde die heterotope kombinierte Herz-Lungen-Transplantation, wie von Lee beschrieben, modifiziert nach Fox und Montorsi, als Transplantationsmodell verwendet.
Zum Vergleich erfolgte die heterotope isolierte Herztransplantation, wie von Ono und Lindsey beschrieben, modifiziert nach Araneda.
Um die Ergebnisse mit dem isogenen Modell vergleichen zu können, erfolgte zunächst die kombinierte Herz-Lungen-Transplantation und die isolierte Herztransplantation zwischen Lewis-Ratten (Empfänger und Spender).
Bei den xenogenen Versuchsreihen wurden Lewisratten als Spender und Meerschweinchen als Empfänger verwendet.

Neben der Herztransplantatüberlebenszeit, wurden die Konzentrationen von Histamin, Komplement, Immunglobulin G und M, sowie die Thrombozyten- und Leukozytenzahl im Blut der Empfängertiere, gemessen.
Die Butentnahmen erfolgten jeweils zu definierten, vergleichbaren Zeitpunkten und direkt nach Abstoßung der transplantierten Herzen. Bei den

kombinierten Transplantationen wurde sowohl peripher aus dem Empfängerblutkreislauf (Aorta abdominalis), als auch zentral aus dem Lungentransplantatkreislauf (rechter Vorhof des Herz-Transplantates), Blut entnommen.

Nach erfolgter Abstoßungsreaktion wurden die Präparate histologisch und immunhistologisch untersucht.

Die Transplantationen erfolgten isogen und xenogen diskordant.

Nach Durchführung der xenogen diskordanten Versuchsreihe folgten die Versuchsreihen unter Immunsuppression mit Cyclophosphamid, Tacrolismus, Cobra-Venom-Faktor und 2 Tage nach vorausgegangener Splenektomie.

Um die Spezifität des transplantierten Lungengewebes bezüglich des „Combi-Effektes“ zu untersuchen, wurde eine xenogene Doppel-Herztransplantation und eine kombinierte Herz-Nieren-Transplantation bzw. eine kombinierte Herz-Lungen-Nieren-Transplantationdurchgeführt.

Die tierexperimentellen Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

- Die Herztransplantatüberlebenszeit nach isogener und xenogen diskordanter Herz-Lungen-Transplantation war signifikant verlängert gegenüber der isolierten Herztransplantation. Damit war der im xenogen diskordanten Modell bisher unbekannte Nachweis des „Combi-Effektes“ gelungen.

- Zum Zeitpunkt der Herztransplantatabstoßung war die Komplementkonzentration im Serum nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation signifikant niedriger, als nach isolierter Herztransplantation.

- Die Bindung von Komplement und IgM im abgestoßenen Herzgewebe war nach isolierter Herztransplantation deutlich stärker ausgeprägt, als nach kombinierter Herz-Lungen-Transplantation.

- Die Filterung bzw. Inaktivierung von Komplement und IgM im simultan transplantierten Lungengewebe scheint ursächlich für den beobachteten „Combi-Effekt“ verantwortlich zu sein.

- Der „Combi-Effekt“ ist auch nach Immunsuppression der Empfängertiere zu beobachten. Eine zusätzliche Verlängerung der Herztransplantatüberlebenszeit, bezogen auf die unbehandelte Gruppe, ließ sich unter Therapie mit Cyclophosphamid und Cobra-Venom Faktor beobachten, nicht aber unter der Therapie mit Tacrolismus und nach vorausgegangener Splenektomie.

- Der „Combi-Effekt“ ist nicht spezifisch für Lungengewebe, er lässt sich auch bei der simultanen Transplantation von Nierengewebe des gleichen Spenders beobachten.

F. Summary

From the clinical practise of transplantation it is well known that the grade of hyperacute rejection of transplanted hearts is lower after combined heart-lung-transplantation than after single heart-transplantation.
The effect, that a prolongation of the heart-survival-time is caused by a simultaneous lung-transplantation from the same donor, was proved in animal experiments referring to allogenic transplantations.
It is called the “combi-effect”.
The “combi-effect” was not demonstrable in the xenogenic concordant model.

The purpose of this study was to investigate whether the combi-effect is demonstrable in the xenogenic discordant guinea-pig to rat model after combined heart-lung-transplantation compared with single heart-transplantation.

Therefore I used the heterotopic combined heart-lung-transplantation, described of Lee, modified by Fox and Montorsi, as a transplantation model.
The heterotopic heart-transplantation described of Ono and Lindsey, modified by Araneda, was practised for comparison.
In order to compare the results with the isogenic model I compared combined heart-lung-transplantation and heart-transplantation using Lewis rats (donor and acceptor).
Lewis rats were used in the xenogenic transplantations as acceptors and Guinea pigs as donors.
Apart from the heart transplant survival time I determined the concentrations of histamin, complement (CH-50), Immunglobulin G and M, thrombocytes and leucocytes in the blood. At the time of rejection and at other defined comparable times the blood samples were taken from a peripheral blood-vessel and from a central blood-vessel of the lung-blood-circulation-system (right-heart-atrium) of the heart-transplant)in the combined heart-lung-transplantation. At the time of rejection all tissues were examined histologically and immunohistologically (ED-11, IgG, IgM, OX-39, W3-13, ED-1, NKR-P1, OX-19).

The transplantations were practised isogenic and xenogenic discordant. The transplantations after immunosuppressiv treatment (Cyclophos-phamid, Tacrolismus, Cobra-venom-factor) and two days after splenectomy followed. To investigate whether the transplanted lung tissue is specifically responsible for the “combi-effect” I compared the combined heart-lung-transplantation with a second heart-transplantation, a combined heart-kidney-transplantation and a combined heart-lung-kidney-transplantation.

Conclusions of the experimental investigations:

- the heart-transplant survival time after isogenic and xenogenic discordant heart-lung-transplantation shows a significant prolongation compared with the single heart-transplantation. For the first time the evidence of the “combi-effect” was proved in the xenogenic discordant model.

- At the time of heart-transplant-rejection the blood-concentration of complement after combined heart-lung-transplantation was significant lower than after single heart-transplantation.

- Immunohistologically complement and IgM revealed a lower deposition in the rejected heart-transplants after combined heart-lung-transplantation than after single heart-transplantation.

- The filtration and inactivation of complement and IgM in the simultaneous transplanted lung-tissue seems to be responsible for the “combi-effect”.

- The “combi-effect” is although demonstrable after immunosuppressive traetment of the donors. An additional prolongation of the heart-transplant survival time compared to the untreated group was achieved after the treatment with cyclophosphamid and cobra-venom-factor but not after treatment with tacrolismus or two days after splenectomy.

- The “combi-effect” is not specific for the simultaneously transplanted lung tissue, it was although achieved after simultaneous transplanted kidney tissue from the same donor.

G. Literaturverzeichnis

1. Adachi H., B.R. Rosengard, G.M. Hutchins, T.S. Hall, W.A. Bumgartner, AM. Borkon, B.A. Reitz: Effects of cyclosporine A, aspirin and cobra venom factor on discordant cardiac xenograft survival in rats. Transplant Proc 19, 1145-1148 (1987)

2. Ahearn J.M., Fearon D.T.: Structure and function of the complement receptors. Advances in Immunology 46: 183-219 (1989)

3. Arai H., T. Yuda, H.M. Goodgold, D.E. de Mello, D.G. Pennington: Detection of lung rejection with indium-11-labelled lymphocytes in heterotopic rat heart-lung transplantation. Circulation 84, 355-363 (1991)

4. Araneda D., W.M. Padberg, N.L. Tilney: Refined techniques for heterotopic cardiac transplantation in the rat. Transplant Proc 21, 2562-2563 (1989)

5. Auchincloss H.: Are we ready to try clinical xenotransplantation? Xeno 1, 2-4 (1993)

6. Azimzadeh A., P. Wolf, A.P. Dalmasso, M. Odeh, M. Fabre, B. Charreau, J.P. Soulillou, I. Anegon: Assessment of hyperacute rejection in rat-to-primate cardiac xenograft model. Transplantation 61, 1305-1313 (1996)

7. Azimzadeh A., C. Meyer, C. Ravanat, J-P. Cazenave, P. Wolf: Xenograft rejection: molecular mechanisms and therapeutic prospects. Hematol Cell Ther 38, 331-343 (1996)

8. Bach F.H., H. Auchincloss, S.C. Robson: Xenotransplantation. In: Transplantation Immunology. Hrsg.: Bach F.H. und H. Auchincloss. Wiley-Liss, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore 1995, 305-338

9. Bach F.H., J.L. Platt: Xenotransplantation: A view of issues. Transplant Proc 24, 49-52 (1992)

10. Bach F.H., M. L. Blakely, M.van der Werf, W.W. Hancock, R. Martin, H. Winkler: Discordant xenografting: a working model for problems and issues. Xeno 1, No. I , 8-15 (1993)

11. Bach F.H., S.C. Robson, H. Winkler: Barriers to xenotransplantation. Nature Med 1, 869-873 (1995)

12. Bailey L.L., SL. Nehlsen- Cannarella, W. Concepcion: Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. JAMA 254, 3321-3329 (1985)

13. Baldwin J.C., P.E. Oyer, E.B. Stinson, V.A. Starnes, M.E. Billingham, N.E. Shumway: Comparison of cardiac rejection in heart and heart-lung transplantation. J Heart Transplant 6, 352-356 (1987)

14. Barnard C.N.: A human cardiac transplant: An interim report of a successful operation performed at Groote Schurr Hospital, Capetown. S Afr Med J 4, 1271-1276 (1967)

15. Böker K.H.W., K. Oldhafer: Lebertransplantation. Indikation, Ergebnisse, Vor- und Nachsorge. Internist 37, 250-263 (1996)

16. Brauer RB., Beck T., Stehle I., Kremer M, Heidecke CD.: Busulfan depletes neutrophils and delays accelerated acute rejection of discordant xenograft in the guinea pig-to-rat model. Transplant International, Vol.16 (1), p: 37-44 (2003)

17. Brunkhorst R., H.-J. Schlitt: Nierentransplantation. Indikation, Ergebnisse, Vor- und Nachsorge. Internist 37, 264-271 (1996)

18. Calne R.Y.: Organ transplantation between widely disparate species. Transplant Proc 2, 550-556 (1970)

19. Candinas D., B.A. Lesnikoski, S.C. Robson, T. Miyata, A.M. Scesney, H.C. Marsh, U.S. Ryan, A.P. Dalmasso, W.W. Hancock, F.H. Bach: Effect of repititive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. Transplantation 62, 336-342 (1996)

20. Candinas D., B.A. Lesnikowski, H. Marsh, U. Ryan, S.C. Robson, W.W. Hancock, F.H. Bach: Soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor in discordant xenotransplantation. Abstract. Third international congress for xenotransplantation. Boston, 27.9.-1.10.1995, or-61

21. Cappello F., Bellafiore M., Palma A., Marciano V., Licata L., Cannino G., Gentile C., Zummo G, Farina F., Bucchieri F.: Protective role of complement regulatory protein CD-55 in cardiac xenograft: a desciptive study and a revision of the literature. Histology and histopathology, Vol. 17 (4), p: 1085-94 (2002)

22. Cohen B., G. Persijn, J.D. Meester: Eurotransplant international foundation. Annual report (2001)

23. Colten H.R., Rosen F.S.: Complement deficiencies. Annual Review of Immunology 10: 809-834 (1992)

24. Cooley D.A., R.D. Bloodwell, G.L. Hallman, J.J. Nora, J.M. Harrison, R.D. Leachman: Organ transplantation for advanced cardiopulmonary disease. Ann Thorac Surg 8, 30-34 (1969)

25. Cooper D.K.S.: Xenograft transplantation. Transplantation 47, 408-410 (1989)

26. Dafoe D.C., L. Rosenberg, D.A. Campbell, R.M. Merion, A.S. Lichter, J.G. Turcotte: Clinical pancreaticoduodenal allotransplantation with inclusion

of the donor spleen (irradiated and non-irradiated) to prevent thrombosis. Transplant Proc 20, 877-879 (1988)

27. Dafoe D.C., D.A. Campbell: The combi- effect with regard to pancreas grafts that include the donor spleen. Transplantation 54, 190-191 (1992)

28. Dorling A., K. Riesbeck, A. Warrens, R. Lechler: Clinical xenotransplantation of solid organs. Lancet 349, 867-871 (1997)

29. Dorling A., Binns R., Lechler R.I., Cellular xenoresponses- observations of significant primary indirect human T cell anti-pig xenoresponses using co-stimulator-deficient or SLA class II-negativ porcine stimulators. Xenontransplantation 3: 149-157 (1996)

30. Dorling A., Binns R., Lechler R.I., Cellular xenoresponses- although vigorous, direct human T cells anti-pig primary xenoresponses are singnifically weaker than equivalent alloresponses. Xenontransplantation 3: 112-119 (1996)

31. Eurotransplant Niederlande: Transplantationsstatistiken 2002-2003, http://www.eurotransplant.nl, Jahresstatistiken, (2002,2003)

32. Ewenstein B.M.: Signal transduction events in endothelial cell activation. Abstract. Third international congress for xenotransplantation, Boston, 27.9.-1.10.1995, ed.2

33. Fink J.S. et al: Porcine xenograft in Parkinson`s disease and Huntington`s disease patients; preliminary results. Cell Transplant 9: 273-278 (2000)

34. Fox U., M. Montorsi: A technical modification of heart-lung transplantation in rats. J Microsurg 1, 377-380 (1980)

35. Fruman D.A., C.B. Klee, B.E. Bierer, S.J. Burakoff: Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK-506 and cyclosporine A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 3686-3690 (1992)

36. Gleissner M., Bornemann R., Stemerowicz R., Meissler M., Neuhaus P., Gerlach J.C: Immunoisolation of hybrid liver support systems by semipermeable membrans. Int J Artif. Organs 20 : 644-649 (1997)

37. Groth C. G., Koosgreen O., Tibell A. , Reinholt F., Wennberg L., Satake M., Moller E., Rydberg L., Samuelsson B., Andersson A., Hellerström C.: transplantation of porcine islets into diabetic patients, Clinical islet xenotransplantation (pp. 812-820) (1997)

38. Hammer C., C. Csapo, G. Höbel, U. Müller, K. Werdan: Preformed natural antibodies: Action on endothelial cells. Transplant Proc 24, 590-591 (1992)

39. Hammer C.: Aspekte der xenogenen Herztransplantation. Z TX Med 5, 147-155 (1993)

40. Hammer C.: Immunosuppression in xenotransplantation. Transplant Proc 28, 3017-3020 (1996)

41. Hammer C.: Xenotransplantation: Perspectives and Limits. Blood Purification- Official Journal of the International Society of Blood, Vol. 19 (3), p:322-328 (2001)

42. Hammer C.: Xenogenic transplantation: potential, risks and future prospects; Bundesgesundheitsblatt- Gesundheitsforschung- Gesundheits--chutz, Vol. 45 (10) p: 801-806 (2002)

43. Hancock W.W., F.H. Bach: Beyond hyperacute rejection: In vitro studies of the immunopathogenesis of delayed xenograft rejection. Abstract. Third international congress for xenotransplantation. Boston, 27.9.-1.10.1995, pl-10

44. Hardy J.D., F.E. Kurrus, C.M. Chavez, W.A. Neely, M.D. Turner, T.D. Labecki: Heart transplantation in ma: development studies and report of a case. JAMA 188, 1132-1140 (1964)

45. Heneine W., Tibell A., Switzer WM. Et al.: No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. Lancet 1998; 352: 695-699.

46. Henningan T.W., R.H.J. Begent, T.G. Allen- Mersh: Histamine, leukotriene C4 and interleukine-2 increase antibody uptake into a human carcinoma xenograft model. Br J Cancer 64, 872-874 (1991)

47. Herrlinger K., Eckstein V., Westphal E., Hamelmann W., Thiede A., Ulrichs K: Zellvermittelte Immunreaktivität in der Transplantationskombination „Mensch-anti- Schwein“ Zentralblatt Chir 123: 803-808 (1998)

48. Hirai T., T.K. Waddell, J.D. Puskas, H. Wada, S. Hitomi, R.M. Gorcynski, A.S. Slutsky, G.A. Patterson: Prolonged lung allograft survival with a short course of FK-506. J Thorac Cardiovasc Surg 105, 1-8 (1993)

49. Holers V.M., T. Kinoshia: The evolution of mouse and human complement C3-binding proteins. Immunology Today 13: 231-237 (1992)

50. Jaboulay M.: Greffe de rein au pli du coude par suture de l’artere et de la veine. Lyon Med 39, 575-577 (1906)

51. Jamieson S.W.: Recent developments in heart and heart-lung transplantation. Transplant Proc 17, 199-203 (1985)

52. Johnston P.S., M.W. Wang, S.M. Lim, L.J. Wright, D.J. White: Discordant xenograft rejection in an antibody-free model. Transplantation 54, 573-577 (1992)

53. Kaplan E.I., P. Meier: Non-parametric estimation from incomplete observation. J Amer Statist Assoc 53, 457-481 (1958)

54. Katayama Y., I. Yada, S. Namikawa, M. Kusagawa: Immunosuppressive effects of FK-506 in rat lung transplantation. Transplant Proc 23, 3300-3301 (1991)

55. Kelm C., J. Kuhl, F. Niemann, J. Buhr, K. Schwemmle: Spezifität des Combi Effektes nach xenogen diskordanter Herz-Lungen-Transplantation. Langenbeck Chirurgie Archiv (1998)

56. Kelm C., J. Kuhl, F. Niemann, J. Buhr, K. Schwemmle: Einfluß der Lungentransplantation auf die Überlebenszeit von Herztransplantaten im xenogen diskordanten Merrschweinchen-Ratte-Modell. Langenbeck Chirurgie Archiv (1998)

57. Kino T., H. Hatanaka, H. Hashimoto, N. Nishiyama, T. Goto: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physiocochemical and biological characteristics. J Antibiotics 40, 1249-1255 (1987)

58. Kirste G.: Organlebendspende unter Nichtverwandten. Dt Ärztebl 93, A-2756-2758 (1996)

59. Kutlu H.M., A.M. Sadeghi, J.E. Norton, C.C. Marboe, C.R. Smith, K. Reemtsma, E.A. Rose: Effect of simultaneous lung transplantation on heart transplant survival in rats. J Heart Transplant 6, 29-33 (1987)

60. Lachmann P.J.: The controll of homologous lysis. Immunology Today 12: 312-315 (1992)

61. Lawson J.H., J.L. Platt: Molecular barriers to xenotransplantation. Transplantation 62, 303-310 (1996)

62. Lee S., W.F. Willoughby, C.J. Smallwood, A. Dawson, M.J. Orloff: Heterotopic heart and lung transplantation. Am J Pathol 59, 279-297 (1970)

63. Lee S., A.R. Macedo, G.P. Curtis, D. Lee, M.J. Orloff: A simplified model for heterotopic rat heart transplantation. Transplantation 33, 438-442 (1982)

64. Leventhal J.R., A.P. Dalmasso, J.W. Cromwell: Prolongation of cardiac survival by depletion of complement. Transplantation 55, 857-858 (1993)

65. Loss M., Vangerow B., Schmidtko J., Kunz R., Jalali A., Arends H., Przemeck M., Rückholt H., Leuwer M., Kaup FJ., Rensing S., Cozzi E., White DJ., Klempnauer J., Winkler M.: Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model. Xenotransplantation, Vol. 7 (3); p: 186-96 (2000)

66. Lubin D.M.: Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. Annual Review of Immunology 7: 35-58 (1989)

67. Markman J.F., C.F. Barker: Basic and clinical considerations in the use of xenografts. Curr Probl Surg 31, 389-460 (1994)

68. Matthews D.E., V. Fearewell: Using and understanding medical statistics. Karger, Basel-New York 1985

69. Mayer M.M.: Complement and complement fixation. In: Experimental immunochemistry. Hrsg.: Kabat K. and M.M. Mayer. Thomas, Springfield, IL 1961, 113

70. Melmon K.L., R.E. Rocklin, R.P. Rosenkranz: Autacoids as modulators of the inflammatory and immune response. Am J Med 71, 100-106 (1981)

71. Merril J.P., J.E. Murray, J.H. Harrison, W.R. Guild: Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. JAMA 160, 277-281 (1956)

72. Meyer R.: Partnernieren mit guten Resultaten. Dt Ärztebl 92, B-1916 (1995)

73. Omer A., Duvivier-Kali VF., Trivedi N., Wilmot K., Bonner-Weir S., Weir GC.: Survival and maturation of microencapsulated porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into immunocompetent diabetic mice. Diabetes 2003; 52: 69-75.

74. Ono K., E.S. Lindsey: Improved technique of heart transplantation in rats. J Thorac Cardiovasc Surg 57, 225-229 (1969)

75. Paradis K., Langford G, Lang Z., Hemeine W., Sandstrom P., Switzer W.M., Capmann L.E.: Search for Cross species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. Science 285: 1236-1241 (1999)

76. Pascher A., C. Hammer: Immunadsorption xenoreaktiver Antikörper und für humanen Decay Accelerating Faktor transgene Spendertiere in der xenogenen Schweineleberperfusion. Tx Med 9, 158-164 (1997)

77. Patience C., Takeuchi Y, Weiss RA.: Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. Nat Med 1997; 3: 282-286.

78. Peng MH., Meng KW., Yang DH., The effect of Chinese cobra venom factor on guinea pig to rat cardiac xenotransplantation. Chinese journal of reparative and reconstructive surgery, Vol. 15 (4), p:240-3 (2001)

79. Platt J.L., G.M. Vercelloti: Transplantation of dicordant xenografts; a review of progress. Immunology 11: 450-456 (1991)

80. Platt J.L.: The humoral immune barrier to xenotransplantation. Abstract. Third international congress for xenotransplantation. Boston, 27.9.-1.10.1995, pl-20

81. Platt J.L.: The immunological barriers to xenotransplantation. Critical Reviews in Immunology 16, 331-358 (1996)

82. Prop J., H.D. Tanzelaar, M.E. Billingham: Different rates of cardiac and pulmonary rejection in combined heart-lung grafts in rats. Transplant Proc 19, 1058 (1987)

83. Prop J., H.D. Tanzelaar, M.E. Billingham: Rejection of combined heart-lung transplants in rats. Am J Pathol 127, 97-105 (1987)

84. Rasmussen A., H.F. Davies, N.V. Jamieson, D.B. Evans, R.Y. Calne: Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. Transplanta- tion 59, 919-921 (1995)

85. Reemstma K., B.H. McCracken, J.U. Schlegel: Renal heterotrans-plantation in man. Ann Surg 160, 384-410 (1964)

86. Rocklin R.E., A. Habarek- Davidson: Pharmacologic modulation in vitro of human histamine induced suppressor cell activity. Int J Immunopharmacol 6, 179-186 (1984)

87. Romagnoli G., U. Fox, F. Longoni: L’allotrapianto eterotopico di cuore e poloni nel ratto: note di technica. Minerva Chir 34, 1047-1051 (1979)

88. Schuurmann HJ., Cheng J., Lam T.: Pathology of xenograft rejection: a commentary. Xenotransplantation, Vol. 10 (4), p: 293-9 (2003)

89. Seufert J., Päth G.: Zelltherapeutische Strategien für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1: Von der Inselzelltransplantation zur Stammzelltherapie. Dtsch Ärztebl 2003; 100: A 1604 –1611[Heft 23]

90. Song Z., Zhang J., Bennet W., Wennberg L.: Tacrolismus inhibits islet xenograft rejection: a study in the pig-to-rat model. Xenotransplantation, Vol. 10 (6), p: 628-34 (2003)

91. Springer T.A.: Adhesion receptors of the immune system. Nature 346, 425-429 (1990)

92. Sousa M.D., N.L. Tilney, J.W. Kupiec- Weglinski: Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix. Immunol Today 12, 262-265 (1991)

93. Starzl T.E., T.L. Marchioro, K.N. von Kaulla, G. Hermann, R.S. Brittain, W.R. Waddell: Homotransplantation of the liver in humans. Surg Gynecol Obstet 117, 659-665 (1963)

94. Starzl R.E., J.J. Fung, A. Tzakis, I.R. Marino: Baboon-to-human liver transplantation. Lancet 341, 65-71 (1993)

95. Starzl T.E., A. Tsakis, J.J. Fung, S. Todod, I.R. Marino, A.J. Demetris: Human liver xenotransplantation. Xeno 1, 4-7 (1993)

96. Stoye JP., Le Tissier P., Takeuchi Y., Patience C., Weiss RA. : Endogenous retroviruses : a potential problem for xenotransplantation ? Ann NY Acad Sci 1998 ; 862 : 67-74.

97. Sutherland D.E.R., K.C. Moudry: Report of the international pancreas transplant registry. In: Clinical transplants 1987. Hrsg: Terasaki P..UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1987, 63

98. Tanaka H., A. Kuroda, H. Marusawa, M. Hashimoto, H. Hatanaka: Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces tsukubaensis. Transplant Proc 19, 11-16 (1987)

99. Tanaka M., N. Murase, M. Nomoto, S. Todo, A.J. Demetris, T.E. Starzl: FK-506 dependent tolerance after liver and heart xenotransplantation: Inhibition of humoral response and acceptance of donor species organs. Abstract. Third international congress for xenotransplantation, Boston. 27.9.-1.10.1995, 0r-1

100. Taniguchi S., D.K.C. Cooper: Clinical xenotransplantation: past, present and future. Ann R Coll Surg Engl 79, 13-19 (1997)

101. Ulrichs K.: Xenotransplantation “Schwein auf Mensch”- ein Überblick. Transplantation Med. 14: 31-37 (2002)

102. Valdivia L.A., T. Miki, A.L. Goller, A.S. Rao, V. Subbotin, X. Wang, A.J. Demetris, J.J. Fung, T.E. Starzl: Discordant (Guinea pig-rat) liver xenotransplantation using CVF, Cyclophosphamid and Tacrolismus-based drug therapy. 4th international congress for xenotransplantation, Nantes, 7.-11.9.1997, P 269

103. Valent P., Bettelheim P.: Cellsurface, Structures on human basophiles and mast cells. Adcances in Immunology 52: 333-423 (1992)

104. van der Laan LJ., Lockey C., Griffeth BC. Et al.: Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. Nature 2000; 407: 90-94.

105. Vogel C.W., C.A. Smith, E.H. Muller: Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. J Immunol 133, 3235-3237 (1984)

106. Wagner T.O.F., H.G. Borst: Lungen- und Herz-Lungentrans-plantation. Internist 37, 272-282 (1996)

107. Wahlers T., A. Khagani, M. Martin, N. Banner, M. Yacoub: Frequency of acute heart and lung rejection after heart-lung transplantation. Transplant Proc 14, 3537-3538 (1987)

108. Wahlers T., K. Pethig, H.G. Fieguth, S. Demertzis, B. Hausen, K. Wolpers, B. Heubleib, H.G. Borst: Herztransplantation. Internist 37, 283-288 (1996)

109. Westra A.L., F. Caravati, A.H. Petersen, C.R.H. Wildevuur, J. Prop: Reduced heart rejection in combined heart-lung transplants. Transplant Proc 21, 455-456 (1989)

110. Westra A.L., A.H. Petersen, F. Caravati, C.R.H. Wildevuur, J. Prop: The Combi-Effect: Prolonged survival of heart grafts by combined transplantation of vascularized lymphoid tissue. Transplant Proc 22, 1963-1964 (1990)

111. Westra A.L., J. Prop, K.C. Kuijpers, C.R.H. Wildevuur: A paradox in heart and lung rejection. Transplantation 49, 826-828 (1990)

112. Westra A.L., A.H. Petersen, J. Prop, C.R.H. Wildevuur: The Combi-Effect-reduced rejection of the heart by combined transplantation with the lung or spleen. Transplantation 52, 952-955 (1991)

113. Wilson CA., Wong S., Muller J., Davidson CE., Rose TM., Burd P.: Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. J Virol 1998; 72: 3082-3087.

114. Winter J.B., A.H. Petersen, A.L. Westra, J. Prop, C.R.H. Wildevuur: Prolonged survival of pancreas grafts by combined transplantation of lymphoid tissue: The Combi-Effect. Transplant Proc 22, 1965 (1990)

115. Winter J.B., J. Prop, M. Groen, A.H. Petersen, T. Uyama, B. Meedendorp, C.R.H. Wildevuur: Defective bronchus-associated lymphoid tissue in long-term surviving rat lung allografts. Am J Respir Crit Care Med 152, 1367-1373 (1995)

116. Yoshida Y., S. Kitamura, K. Kawachi, S. Taniguchi, Y. Kondo: Comparison of cardiac rejection in heart and heart-lung concordant xenotransplantation. J Heart Lung Transplant 13, 325-331 (1994)

H. Anhang: Daten und Tabellen

Tab.6: Mittelwerte und Standardabweichung der Blut- und Serumwerte nach isogener HTx

	Histamin ng/ml	CH-50 U/l	IgG mg/l	IgM mg/l	Thrombozyten /µl	Leukozyten /µl
Kontrolle	1,3	405	2318	1140	741822	9366
n=5	+/-0,422	+/- 55,7	+/-511	+/-259	+/-110448	+/-1446
12`	1,7	456	1763	844	661333	7350
n=3	+/-0,29	+/-11,5	+/-293	+/-54,4	+/-137026	+/-1425
6 h	4,8	400	1586	718	858333	7050
n=3	+/-1,94	+/-34,6	+/-309	+/-85	+/-206921	+/-1075

Tab.7: Mittelwerte und Standardabweichung der Blut und Serumwerte nach isogener HLTx

		Histamin ng/ml	CH-50 U/l	IgG mg/l	IgM mg/l	Thrombozyten /µl	Leukozyten /µl
Kontrolle		1,3	405	2318	1140	741822	9366
n=5		+/-0,422	+/- 55,7	+/-511	+/-259	+/-110448	+/-1446
30`		4,1	398	2808	1082	580583	4929
n=6	p	+/-1,54	+/-40,7	+/-1727	+/-544	+/-97191	+/-2635
n=5	z	5,36	410	3236	1108	651666	7245
		+/-0,86	+/-41,3	+/-2389	+/-657	+/-99893	+/-977
12h		6,16	216	4188	1170	526300	8230
n=5	p	+/-2,58	+/-33	+/-1362	+/-309	+/-49119	+/-2586
n=5	z	5,2	221	4900	1170	547400	8046
		+/-2,264	+/-42	+/-1356	+/-309	+/-79789	+/-3096

Tab.8: Mittelwerte und Standardabweichung der Blut und Serumwerte nach xenogener HTx und HLTx

	Histamin ng/ml	CH-50 U/	IgG mg/l	IgM mg/l	Thrombozyten /µl	Leukozyten /µl
Kontrolle n=5	1,3 +/-0,422	405 +/- 55,7	2318 +/-511	1140 +/-259	741822 +/-110448	9366 +/-1446
HTx 10` n=3	4,2 +/-1,16	406 +/-15,3	3646 +/-3373	1366 +/-167	479333 +/-91132	9800 +/-3309
HTx n=5	3,08 +/-1,95	260 +/-23,4	3440 +/-1537	1026 +/-225	584500 +/-21607	7700 +/-1607
HLTX 12` n=3 p	10,1 +/-6,19	313 +/-77,7	3370 +/-1633	1113 +/-150	469833 +/-174549	3950 +/-540
n=3 z	5,9 +/-3,66	296 +/-50,3	2413 +/-488	1213 +/-98	425333 +/154623	5033 +/-4303
HLTx n=6 p	5,14 +/-3,09	183 +/-65,6	4003 +/-1027	1065 +/-220	579583 +/-176213	3958 +/-1539
n=5 z	2,33 +/-1,03	113 +/-33,9	4180 +/-1323	1045 +/-129	399500 +/-167139	6620 +/-2679

Tab.9: Mittelwerte und Standardabweichung der Blut und Serumwerte nach xenogener HTx und HLTx unter Immunsuppression (n.m.= nicht messbar)

	Histamin ng/ml	CH-50 U/	IgG mg/l	IgM mg/l	Thrombozyten /µl	Leukozyten /µl
Kontrolle n=5	1,3 +/-0,422	405 +/- 55,7	2318 +/-511	1140 +/-259	741822 +/-110448	9366 +/-1446
HTx-FK-506 n=5	14,0 +/-6,13	354 +/-35	3552 +/-2196	1597 +/-134	451350 +/-174500	5390 +/-2396
HTx-CVF n=5	19,3 +/-7,5	10 +/-n.m.	6732 +/-1344	1548 +/-445	432250 +/-44899	12380 4302
HTx-CP n=5	12,8 +/-5,9	376 +/-98	2210 +/-515	752 +/-107	230300 +/-33944	2720 +/-1212
HTX-SPx n=6	20,7 +/-4,5	526 +/-64	1766 +/-678	568 +/-117	520833 +/-90687	5979 +/-2479
HLTx-FK-506 n=5 p	23,2 +/-5,6	390 +/-30	4020 +/-1815	1148 +/-264	432800 +/-223336	4150 +/-930
n=5 z	16,3 +/-5,2	334 +/-99	4252 +/-1475	1230 +/-131	464400 +/-209393	7340 +/-3168
HLTx-CVF n=6 p	22,9 +/-11,2	10 +/-n.m.	2320 +/-772	1022 +/-392	470000 +/-189720	7682 +/-4031
n=7 z	11,8 +/-5,4	10 +/-n.m.	2260 +/-757	912 +/-462	402357 +/-150155	9164 +/-3944
HLTx-CP n=5 p	12,5 +/-5,2	340 +/-38	1902 +/-338	850 +/-141	381500 +/-118103	2190 +/-821
n=5 z	5,08 +/-3,6	308 +/-62	1896 +/-296	851 +/-148	371400 +/-131462	2610 +/-1156
HLTx-SPx n=5 p	14,7 +/-3,1	502 +/-106	1276 +/-278	445 +/-68,3	705200 +/-211841	6140 +/-2886
n=5 z	18,3 +/-3,0	416 +/-86	1076 +/-346	372 +/-75	392000 +/-113087	4990 +/-710

Tab.10: Mittelwerte und Standardabweichung der Blut und Serumwerte nach xenogener Doppelherz-Transplantation (D-HTx) und kombinierter Herz-Nieren- (HNTx) , bzw. Herz-Lungen-Nieren-Transplantation (HLNTx)

	Histamin ng/ml	CH-50 U/	IgG mg/l	IgM mg/l	Thrombozyten /µl	Leukozyten /µl
Kontrolle n=5	1,3 +/-0,422	405 +/- 55,7	2318 +/-511	1140 +/-259	741822 +/-110448	9366 +/-1446
D-HTx n=5	18,5 +/-12,0	344 +/-55	2368 +/-339	968 +/-208	689500 +/-365707	5030 +/-1833
HNTx n=5	18,6 +/-5,95	178 +/-49	3286 +/-1332	916 +/-364	382150 +/-86090	3130 +/-1180
HLNTx n=5 p	13,9 +/-2,8	300 +/-41,8	2832 +/-851	1068 +/-166	518400 +/-81855	3085 +/-451
HLNTx n=5 z	15,1 +/-305	274 +/-27	2916 +/-763	1106 +/-171	503000 +/-143204	3700 +/-831

Tab.11: Immunhistologie der Herzen nach isolierter Herztransplantation

Antikörper		ED-11	ED-1	W3/13	OX-19	OX-39	Ig	Ig	NKR-P1
Ziel-Antigen		C3	M.phag Monoz.	T-Zell.	CD-5 Zellen	IL-2	IgM	IgG	natürl. Kill. Z.
unbehandelt	Ratte	+	(+)	+	(+)	(+)	++	-	+
unbehandelt	Meerschw.	-	-	-	-	-	-	-	-
Isogen		-/(+)	+	+	+	+	++	-	+
xenogen 10`		+++	(+)	+	(+)	-	+++	-	(+)
xenogen		+++	-/(+)	(+)/+	-/(+)	-	++++	-	-/(+)
D-HTx kranial/kaudal		++ /+++	- /-	(+)/ (+)	(+)/ (+)	-/ -	+++/ ++	(+)/ -	(+)/ (+)
HTx-CVF		+	++	++	+	(+)	++++	+	+
HTx-FK 506		+++	+	+	(+)	(+)	+++	(+)	(+)
HTx-CP		+++	-	+	(+)	-	+++	(+)	(+)
HTx-SPx		+++	(+)	+	(+)	(+)	+++	(+)	(+)
HNTx	Herz	++/+++	-	+	(+)	-	++	-	+
	Niere	++/+++	-	+	(+)	-	++	(+)	(+)
unbehandelt	Niere	+	-	-	-	-	(+)	-	-

Tab.12: Immunhistologie von Herz, Lunge und Niere nach kombinierter Herz-Lungentransplantation

Antikörper		ED-11	ED-1	W3/13	OX-19	OX-39	Ig	Ig	NKR-P1
Ziel-Antigen		C3	M.phag Monoz.	T-Zell.	CD-5 Zellen	IL-2	IgM	IgG	natürl. Kill. Z.
unbehandelt	L-Ratte	+++	++	++++	+++	+++	+++	++	+
unbehandelt	L-Meer	(+)	-	+	(+)	+	-	(+)	-
isogen	Herz	+/++	++	+++	++	++	++	+	++
	Lunge	+++	+++	++++	++	++	+++	++	++
xenogen 10`	Herz	++	(+)	+	(+)	-	+++	-	(+)
	Lunge	+++	+	++	++	(+)	++++	(+)	+
xenogen	Herz	++	-	-	-	-	++	-	-
	Lunge	+++	+	++	(+)	(+)	++++	(+)	+
HLTx-CVF	Herz	(+)	+	++	+	(+)	+++	(+)	+
	Lunge	(+)	++	+++	+	(+)	++++	(+)	++
HLTx-FK 506	Herz	++/+++	(+)	+	(+)	-	+++	(+)	(+)
	Lunge	++++	+	++	+	(+)	++++	(+)	+
HLTx-CP	Herz	++/+++	(+)	+	(+)	(+)	+++	-	(+)
	Lunge	++++	(+)	++	+	(+)	+++	(+)	++
HLTx-SPx	Herz	++	-	+	(+)	-	++	(+)	(+)
	Lunge	++++	-	+	(+)	(+)	+	(+)	+
HLNTx	Herz	++	-	(+)	(+)	-	++	-	(+)
	Lunge	++++	(+)	++	++	-	+	-	+
	Niere	+/++	(+)	+	(+)	-	+/++	-	(+)

Tab.13: Varianzanalyse nach xenogener Herz- und Herz-Lungen-Transplantation (n=5)

A: präoperativ	**1: isogene HLTx-P**
B: 10 Minuten	**2: isogene HLTx-Z**
C: 12 Minuten	**3: isogene HTx**
D: 30 Minuten	**4: xenogene HLTx-P**
E: 6 Stunden	**5: xenogene HLTx-Z**
F: 12 Stunden	**6: xenogene HTx**

Histamin: (p<0,05):

		B	C	D
A		6,4,5	4	-
C	4	-	5	-
	6	-	4-5	-
D				
	2	-	-	5
	4	-	-	5

Komplement: (p<0,05):

		B	C	D
A		4,5	6,4,5	-
C	3	-	6	-
	6	-	4-5	4,5
D	1	-	-	4
	2	-	-	5
	4	-	-	5

IgM: (p<0,05): nicht signifikant

IgG: (p<0,05):

		B	C	D
C	3	-	6	-

Thrombozytenzahl: (p<0,05):

		B	C	D
A		6,4,5	6,5	-
C	6	-	5	-
D	2	-	-	5

Leukozytenzahl: (p<0,05):

		B	C	D
A		4,5	4	-
C	6	-	4	4
D	4	-	-	5

Tab.14: Varianzanalyse nach xenogener Herz- und Herz-Lungen-Transplantation, Vergleich mit und ohne Immunsuppression (n=5)

A: präoperativ	**1: isogene HTx**
B: ohne Immunsuppression	**2: isogene HLTx-P**
C: FK-506	**3: isogene HLTx-Z**
D: Cyclophosphamid	**4: xenogene HTx**
E: SPx	**5: xenogene HLTx-P**
F: CVF	**6: xenogene HLTx-Z**

Histaminkonzentration: (p<0,05):

		B	C	D	E	F
A		-	4-6	4-6	4-6	4-6
B	1	-	4	4	4	-
	2	-	5	5	5	-
	3	-	6	-	6	-
	4	-	4	4	4	4
	5	-	5	5	5	5
	6	-	6	-	6	6
C	4	-	5	-	-	-
	5	-	6	-	-	-
D	4	-	-	6	-	-
	5	-	-	6	-	-
E	4	-	-	-	5	-
F	1	-	-	-	-	4
	2	-	-	-	-	5
	3	-	-	-	-	5
	5	-	-	-	-	6
	6	-	-	-	-	-

Komplementkonzentration: (p<0,05):

		B	C	D	E	F
A		-	-	5-6	4	4-6
B	1	-	4	-	4	-
	2	-	5	5	5	-
	3	-	6	6	-	-
	4	-	4	4	4	-
	5	-	5	5	5	-
	6	-	6	6	6	-
E	4	-	-	-	6	-
F	1	-	-	-	-	4
	2	-	-	-	-	5
	3	-	-	-	-	6

IgM – Konzentration: (p<0,05):

		B	C	D	E	F
A		-	4	4-6	4-6	-
B	1	-	4	-	4	-
	2	-	-	-	5	-
	3	-	-	-	6	-
	4	-	4	4	4	4
	5	-	-	5	5	-
	6	-	6	6	6	-
C	4	-	5,6	-	-	-
E	4	-	-	-	5-6	-
F	1	-	-	-	-	4
	4	-	-	-	-	6

IgG – Konzentration: (p<0,05):

		B	C	D	E	F
A		-	6	-	5-6	-
B	2	-	-	-	5	-
	3	-	-	-	6	-
	4	-	-	-	-	4
	5	-	-	5	5	-
	6	-	-	6	6	6
E	4	-	-	-	6	-
F	1	-	-	-	-	4
	3	-	-	-	-	6
	4	-	-	-	-	5-6

Thrombozytenzahl: (p<0,05):

		B	C	D	E	F
A		-	4	4-6	4,6	4-6
B	1	-	4	4	4	-
	2	-	-	5	-	-
	3	-	-	6	6	-
	4	-	-	4	-	4
D	4	-	-	5-6	-	-
E	4	-	-	-	6	-
	5	-	-	-	6	-
F	1	-	-	-	-	4
	3	-	-	-	-	6

Leukozytenzahl: (p<0,05):

		B	C	D	E	F
A		-	4	4-6	4-6	-
B	1	-	-	4	-	-
	2	-	-	5	-	-
	3	-	-	6	6	-
	4	-	-	4	-	-
	5	-	-	5	-	5
	6	-	-	6	-	-
C	5	-	6	-	-	-
F	1	-	-	-	-	4

Tab.15: Varianzanalysen nach xenogener HTx und HLTx, Vergleich Doppelherz-Transplantation (D-Htx, n=5), Herz-Nieren-Transplantation (HNTx, n=5), Herz-Lungen-Nieren-Transplantation (HLNTx, n=5)

A: präoperativ	**1: isogene HTx**
B: ohne	**2: isogene HLTx-P**
C: D-HTx	**3: isogene HLTx-Z**
D: HNTx	**4: xenogene HTx**
E: HLNTx	**5: xenogene HLTx-P**
	6: xenogene HLTx-Z

Histaminkonzentration: (p<0,05):

		B	C	D	E
A		-	5-6	4	4
B	1	-	-	4	4
	2	-	5	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	5	4	4
	5	-	-	5	-
	6	-	6	4	-

Komplementkonzentration: (p<0,05):

		B	C	D	E
A		-	5-6	-	4
B	1	-	-	4	4
	2	-	5	-	-
	3	-	6	-	-
	4	-	5	4	4
	5	-	5	5	-
	6	-	6	4	-
C	5	-	6	-	-

IgM – Konzentration: (p<0,05):

		B	C	D	E
B	4	-	5,6	-	-
	5	-	5	-	-
	6	-	6	-	-

IgG – Konzentration: (p<0,05):

		B	C	D	E
A		-	5-6	-	-
B	1	-	-	4	-
	5	-	-	4	-
	6	-	-	4	-

Thrombozytenzahl: (p<0,05):

		B	C	D	E
A		-	-	-	4, 5-6
B	1	-	-	-	4
	4	-	-	-	4

Leukozytenzahl: (p<0,05):

		B	C	D	E
A		-	5-6	4	4
B	1	-	-	4	4
	4	-	-	4	4
	5	-	5	-	-

I. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt

- Dem ärztlichen Direktor der Klinik für Allgemein-, Thorax-, Viszeral-, Transplantations- und Kinderchirurgie an der Justus-Liebig- Universität Gießen, Herrn Professor Dr. W. Padberg, in dessen Klinik ich diese Arbeit durchführen durfte,

- Herrn Prof. Dr. K. Schwemmle, emeritierter Direktor der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie an der Justus-Liebig-Universität Gießen,

- Herrn Privatdozent Dr. Christopher Kelm, der diese Arbeit als mein Doktorvater sehr engagiert betreut hat und ohne dessen Hilfe ich sie kaum beendet hätte,

- Herrn Dr. R.M. Bohle, Zentrum für Pathologie der JLU Giessen und Herrn Dr. J. Buhr für Ihre Unterstützung bei der histologischen und immunhistologischen Auswertung der Präparate,

- Frau R. Plaß, Frau C. Gog, Frau P. Freitag, Frau S. Wilker und Frau I. Schütz, medizinisch-technische Assistentinnen im wissenschaftlichen Labor des Zentrums für Chirurgie für Ihre Hilfe und Engagement,

- Frau Dr. J. Adams und Herrn J. Kuhl für Ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der tierexperimentellen Operationen,

- Herrn M. Budde, Herrn U. Uppenkamp und meiner Frau Caroline für Ihre Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts.

Lebenslauf

Frank Niemann

Im Hohen Felde 2a
37671 Höxter
Tel.: 05271-959678 , 0179-1173738
Email: Frank.Niemann@t-online.de

Persönliche Angaben

Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 14. November 1968
Geburtsort: Coesfeld
Religion. Römisch-katholisch

Schulbildung

Aug.1975 - Juli 1979	Grundschule Coesfeld
Sept.1979 - Juni 1988	Bischöfliches Gymnasium Coesfeld

Berufsausbildung

Sept. 1988 - April 1990	Ausbildung zum Rettungsassistenten, DRK Coesfeld

Berufliche Tätigkeit

Mai 1990 - Okt. 1990	Rettungsassistent, DRK Coesfeld

Wehr-/Ersatzdienst

Sept. 1988 - April 1990	Zivildienst als Rettungsassistent im DRK Coesfeld

Hochschulausbildung

Oktober 1991	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
August 1993	Ärztliche Vorprüfung
August 1994	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1997	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 1997 - April 1998	Praktisches Jahr an der Justus-Liebig-Universität Gießen Wahlfach Pädiatrie
Mai 1998	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung Abschluß des Studiums der Humanmedizin mit der Gesamtnote: >befriedigend<

Ärztliche Tätigkeit

Juni 1998 - Dez. 1999	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Kinderklinik des Marienhospitals Witten
Dez.1999 – März 2001	Assistenzarzt in der Kinderklinik des Marienhospitals Witten unter der Leitung von Privatdozent Dr. Klaus Heller
März 2001 – Mai 2001	Assistenzarzt in der Psychosomatischen Abteilung der Städtischen Kinderklinik Gelsenkirchen,
Seit Mai 2001	Assistenzarzt in der Abteilung Neonatologie und Intensivmedizin der Städtischen Kinderklinik Gelsenkirchen unter der Leitung von Professor Dr. Ernst August Stemmann
Seit Januar 2003	Oberarzt, Kinderklinik Sankt Ansgar Krankenhaus Höxter unter der Leitung von Dr. Volker Klimpel
Juni 2003	Facharztprüfung zum Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin