Aus der Abteilung Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Chirurgischen Klinik der Universität Ulm
(Ärztliche Direktorin Prof. Dr. med. D. Henne-Bruns)

Die ex-vivo-Perfusion hDAF-transgener Kaninchennieren mit Humanblut

Ein Modell für die humane Xenotransplantation

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Steffen Peter Strobel
aus Göppingen

2004

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. R. Marre

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Abendroth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Storck

Tag der Promotion: 22.10.2004

Widmung

In großer Dankbarkeit all denen,
die mich auf meinem bisherigen Weg
begleitet und unterstützt haben.

Damit das Mögliche entsteht,
muss immer das Unmögliche
versucht werden.

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

Widmung 3
Inhaltsverzeichnis 4
Abkürzungsverzeichnis 6
1. Einleitung 8
1.1. Geschichte und Beweggründe der xenogenen Nierentransplantation 8
1.2. Grundlagen der Xenotransplantation 13
1.3. Komplementaktivierung und Xenotransplantatabstoßung 15
1.4. Die Komplementregulation 18
1.5. Transgene Tiere und Organe 20
1.6. Die ex-vivo-Hämoperfusion 21
1.7. Gegenstand der Arbeit 23
1.7.1. Fragestellung 23
1.7.2. Versuchsgruppen 23
2. Material und Methoden 24
2.1. Versuchsort 24
2.2. Art der Untersuchung und Versuchsgruppeneinteilung 24
2.3. Versuchstiere 25
2.4. Organentnahme 27
2.5. Perfusionsvorbereitung 29
2.6. Reperfusionsphase und Perfusionsanlage 30
2.6.1. Perfusionsdruck, Fluss und Resistance 32
2.7. Laborchemische Untersuchungen 33
2.8. Urin 33
2.9. Morphologie 33
2.9.1. Makroskopie 33
2.9.2. Histologie und Immunhistologie 34
2.10. Gerätekalibrierung und Parameterberechnung 34
2.10.1. Pumpflussrate 34
2.10.2. Kalibrierung des Druckaufnehmers 34
2.10.3. Perfusionswiderstand 34
2.10.4. Kanülenwiderstand 34
2.10.5. Renale vaskuläre Resistance 35
2.10.6. Gefäßwiderstand 35
2.10.7. Urinfluss 36
2.11. Datenverarbeitung und Statistik 36
3. Ergebnisse 37
3.1. Perfusionsdauer und Perfusionswiderstand 37
3.1.1. Perfusionswiderstand bei Gruppe 1 37
3.1.2. Perfusionswiderstand bei Gruppe 2 39
3.1.3. Perfusionswiderstand und renale vaskuläre Resistance (RVR) 40
3.2. Laborchemische Serumwerte 41
3.2.1. Elektrolyte 41
3.2.2. Blutgase und Säure-Basen-Status 47
3.2.3. Blut-Glukose 47
3.2.4. Nieren und Retentionswerte 49
3.2.5. Laktat 52

3.2.6. TNF-alpha ... 54
3.3. Urin ... 56
3.4. Durchflusszytometrie ... 56
3.5. Morphologische Beurteilung ... 57
3.5.1. Makroskopischer Aspekt ... 57
3.5.2. Mikroskopie, Histologie und Immunhistologie ... 59
4. Diskussion ... 63
4.1. Fragestellung ... 63
4.2. Methodik ... 64
4.2.1. Versuchstiere ... 64
4.2.2. Herstellung transgener Tiere ... 65
4.2.3. Ex-vivo-Hämoperfusion ... 66
4.3. Ergebnisse ... 68
4.3.1. Perfusionswiderstand und Blutfluss ... 68
4.3.2. Laborchemische Messwerte ... 69
4.3.3. Urinproduktion ... 70
4.3.4. Morphologie, Expression und Stabilität des Transgens ... 70
4.4. Schlussfolgerung ... 72
5. Zusammenfassung ... 73
6. Literatur ... 75
Danksagung ... 84
Lebenslauf ... 85

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AB0	Blutgruppenmerkmale
C	Kontrollgruppe
°C	Grad Celsius
CD	“cluster of differentiation”
cDNA	Kopie Desoxyribonucleinacid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CR1	Komplementrezeptor Typ 1
CR2	Komplementrezeptor Typ 2
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DNA	„desoxyribonucleinacid“
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat (➔Äthylendiamintetraessigsäure)
ELISA	“enzyme linked immunosorbent assey”
eHPS	ex-vivo-Hämoperfusion
Gal(α1,3)Gal	Galaktosyl- α-1,3-Galaktosyl-Rest
gp	Glykoprotein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol-Phospholipiden
h	human
HAR	"hyperacute rejection", hyperakute Abstoßungsreaktion
hDAF	human „decay accelerating factor“
Hg	Quecksilber
HLA	Histokompatibilitätsantigene
IE	Internationale Einheiten
iD	Innendurchmesser
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
K*x*	Versuchstier der Gruppe 1

KG	Körpergewicht
LMU	Ludwig-Maximillian Universität, München
MAC	„membrane attack complex“
Mb	Megabasenpaare
MCP	Membran-Kofaktorprotein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIRL	„membrane inhibitor of reactive lysis“
MOPS	Mobiles Organ Perfusions System
n	Anzahl
N*x*	Versuchstier der Gruppe 2
O_2	Sauerstoff
OP	Operation, Operationssaal
PAF	Plättchen-Aktivierungs-Faktor
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNH	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
pp	post Perfusion
RR	Blutdruck nach Riva Rocci
P_{SYS}	systolischer Druck
RCA	„regulators of complement activation“
RVR	Renale vaskuläre Resistance (Widerstand)
SCR	„short consensus repeats“
SPF	speziell pathogenfrei
Tab.	Tabelle
TG	Transgen
TFZ	Tier-Forschungs-Zentrum der Universität Ulm
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
TX	Transplantation
vgl.	vergleiche
vs.	versus
XNA	„xenoreactive natural antibodies“
YAC	„yeastlike artificial chromosome“

1. Einleitung

1.1. Geschichte und Beweggründe der xenogenen Nierentransplantation

Die Transplantation von Organen und Geweben über die Speziesbarrieren hinweg ist eine Idee, die bis in die antike Mythologie zurückgeht. Der tragische griechische Sagenheld Ikarus bediente sich „transplantierter“ Vogelfedern, um dem ewigen Traum des Menschen vom Fliegen näher zu kommen.
Die mystische Chimera, ein Mischwesen aus (genetisch) verschiedenen Tieren, taucht in unserer modernen Wissenschaftsliteratur immer wieder auf [57], und der antike griechische Zentaur, ein Fabelwesen mit dem Oberkörper eines Menschen und dem Leib eines Pferdes, hat die Menschen ebenso fasziniert wie verwundert.
In der antiken und jüngeren europäischen Geschichte gibt es einige solcher Sagen, Fabeln und Bilder von rätselhaften, aus verschiedenen Einzelteilen bestehenden Lebewesen.



Abb.1-1: Wandmosaik eines chimären Fabelwesens auf dem Frontportal des Domes von Lucca, Toskana, Italien (eigene Fotografie, aufgenommen im Juli 2003).

Die Xenotransplantation blieb bis in die moderne Gegenwart ein faszinierendes Forschungsthema. Der Medizinnobelpreisträger von 1912, Alexis Carrel, setzte sich bereits 1907 mit der Frage auseinander, ob Organe menschenähnlicher Affen humanes Blutplasma tolerieren [13]. Nach Schaffung der für die Transplantation unentbehrlichen nahttechnischen Voraussetzungen durch Alexis Carrel wurde immer wieder

tierexperimentell und klinisch versucht, die xenogene Nierentransplantation zu verwirklichen [31].

Einige Jahre vor der Möglichkeit der Allotransplantation von Nieren hirntoter Spender und vor der klinischen Verfügbarkeit einer suffizienten Nierenersatztherapie (Hämodialyse, Hämofiltration etc.) wurden einige Therapieversuche zur Rettung von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz mittels xenogener Nierentransplantation unternommen.

Zwischen 1963 und 1965 wurden von der Tulane-Gruppe sechs Schimpansennieren auf Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz transplantiert [57]. Starzl transplantierte 1964 insgesamt sechs Paviannieren auf Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Die Transplantate versagten mehr oder minder früh und die Empfänger überlebten zwischen 19 und 98 Tagen [64].

Insgesamt erzielte die Wissenschaft zwischen 1964 und Mitte der 90er Jahre trotz vieler Bemühungen auf dem Gebiet der klinischen xenogenen Nierentransplantation viele Rückschläge und so führten viele dieser klinischen Versuche, die terminale Niereninsuffizienz mittels Xenotransplantation zu behandeln, zum Tode der Patienten (vgl. Tab. 1-1).

In der Vergangenheit wurde versucht, Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz mittels xenogener Herztransplantation zu retten. 1964 führte James Hardy die Xenotransplantation eines Schimpansenherzens auf einen 68-jährigen Mann durch, der jedoch auf Grund der zu geringen Organgröße nur zwei Stunden damit überlebte. Christian Barnard, der 1967 die erste Allotransplantation eines menschlichen Herzen vorgenommen hatte [6], versuchte 1977 Schimpansen- und Pavianherzen zur Überbrückung („bridging“) bis zur definitiven Verfügbarkeit eines menschlichen Organs, einzusetzen. Der Empfänger des Pavianherzens starb nach sechs Stunden und der Patient, der das Herz des Schimpansen erhalten hatte, überlebte vier Tage, bevor das Organ abgestoßen wurde [7]. Leonard Bailey transplantierte 1984 ein Pavianherz auf das Frühgeborene „Baby Fae“, welches mit einem schweren Herzfehler zur Welt gekommen war. Es überlebte mit dem Pavianherz unter einer einfachen immunsuppressiven Therapie mit Cyclosporin zwanzig Tage, bevor das Organ abgestoßen wurde [4, 5].

Die meisten klinischen Xenotransplantationsprogramme wurden auf Grund der schlechten Ergebnisse oder ungenügend langer Überlebenszeiten zunächst unterbrochen, um weitere Fortschritte in der experimentellen Xenotransplantationsforschung abzuwarten.

Tab. 1-1: Gegenüberstellung von Spenderspezies und Überlebenszeiten von Patienten, welche sich einer xenogenen Nierentransplantation unterzogen hatten. Modifiziert nach [73] und [58].

Jahr	Autor	Spenderspezies	n	Überlebenszeit
1905	Princeteau	Hase	1	16 Tage
1906	Jaboulay	Schwein	1	< 3 Tage
1906	Jaboulay	Ziege	1	< 3 Tage
1910	Unger	Affe	1	< 2 Tage
1913	Morel	Affe	1	?
1923	Neuhof	Schaf	1	< 9 Tage
1963	Reemtsma	Rhesusaffe	1	6 Tage
1964	Reemtsma	Schimpanse	12	< 9 Monate
1964	Reemtsma	Affe	1	10 Tage
1964	Starzl	Pavian	6	< 60 Tage
1964	Hume	Schimpanse	1	1 Tag
1964	Traeger	Schimpanse	3	< 49 Tage
1964	Millard	Schimpanse	2	4 Monate
1964	Cortesi	Schimpanse	1	31 Tage
1964	Hillkoll	Pavian	1	4 Tage

Bezüglich der zu transplantierenden Organe muss prinzipiell zwischen der lebensrettenden Transplantation („life saving TX“) und der die Lebensqualität verbessernden Transplantation („quality of life improving TX“) unterschieden werden (vgl. Tab. 1-2).

Bei der lebensrettenden Transplantation steht für das entsprechende Organ kein definitives Ersatzverfahren zur Verfügung, eine Transplantation ist zur Lebensrettung zwingend notwendig.

Bei der Lebensqualität verbessernden Transplantation gibt es Möglichkeiten den Funktionsverlust des entsprechenden Organs z.B. mittels Hämodialyse oder Insulintherapie zu kompensieren. Längerfristig wird aber eine Transplantation angestrebt, durch welche eine Verbesserung der Lebensqualität, eine Senkung der Therapiekosten, eine Verminderung der Morbidität und eine Reduktion der Mortalität erreicht werden kann.

Tab. 1-2: Merkmale und Beispiele der lebensrettenden Organtransplantation und der Lebensqualität verbessernden Transplantation.

Lebensqualität verbessernde Transplantation	**Lebensrettende Transplantation**
Niere	Herz
Niere-Pankreas	Herz-Lunge
Inselzellen	Leber
Verbesserung der Lebensqualität	*Senkung der Mortalität*
Senkung der Morbidität	*Verbesserung der Lebensqualität*
Senkung der Dauertherapiekosten	

Heute, fast 50 Jahre nach der ersten humanen Nierentransplantation durch Joseph E. Murray in Boston [40], der 1990 dafür mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde, ist eines der zentralen Probleme der modernen Transplantationsmedizin die begrenzte Anzahl der zur Verfügung stehenden Spenderorgane. Durch die Erfolge der klinischen Allotransplantation in den letzten Jahrzehnten wächst der Bedarf an humanen Transplantaten sehr viel schneller als die Zahl der tatsächlich zur Verfügung stehenden Organe. Die Diskrepanz zwischen Patienten auf der Warteliste für eine Transplantation und tatsächlich durchgeführten Organtransplantationen wird, wie Abb. 1-2 zeigt, immer größer.

Für die Patienten, die eine lebensrettende Transplantation benötigen, kommt die notwendige Hilfe in Form eines passenden Spenderorgans oft zu spät. Viele Patienten versterben auf der Transplantationswarteliste.

Die Lebendspende von Nieren oder Teil-Lebern („split liver TX“), die ein im Vergleich zur Leichennieren-TX sogar besseres Outcome hat, kann aus dem Dilemma des Mangels an geeigneten Spenderorganen jedoch keinen Ausweg bieten.

Die Lebendspende macht an der Gesamtzahl der transplantierten Organe nur einen geringen, seit Jahren nahezu konstant bleibenden Teil aus. Eine weitere Steigerung dieser Zahlen nach 2002/2003 ist eher nicht zu erwarten (vgl. Abb. 1-3).

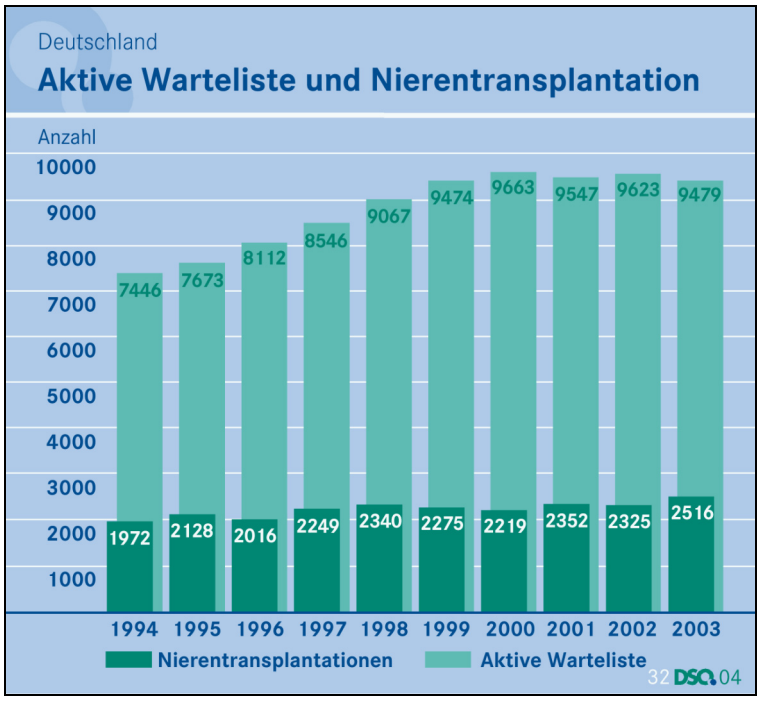


Abb. 1-2: Patienten auf der Transplantationswarteliste in Deutschland und tatsächlich durchgeführte Nierentransplantationen von 1994 bis 2003 (mit freundlicher Genehmigung der DSO, Neu-Isenburg).

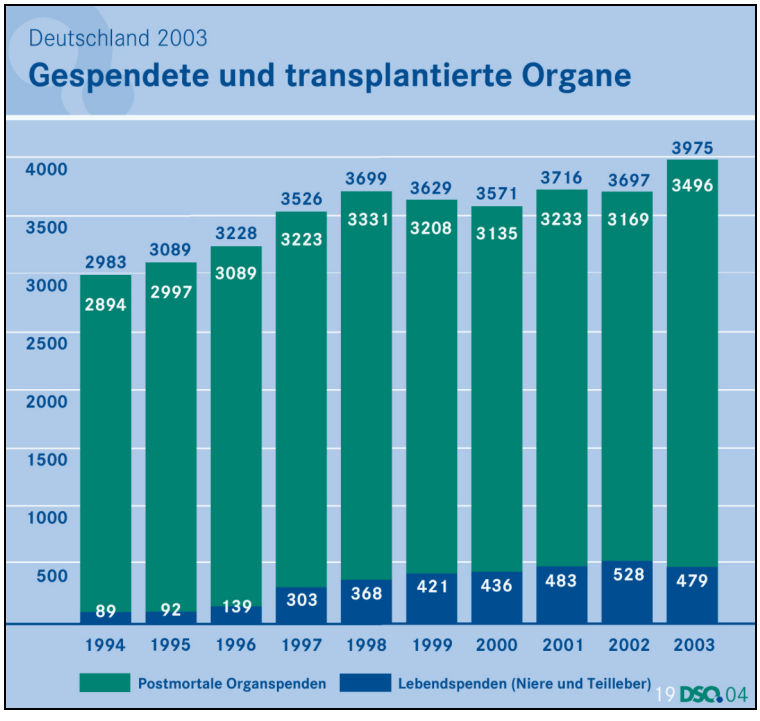


Abb. 1-3: Postmortale Organspende und Lebendspende in Deutschland von 1994 bis 2003 im Vergleich. Beide Verfahren lassen keine wesentliche Steigerung der Zahlen erkennen (mit freundlicher Genehmigung der DSO, Neu-Isenburg).

Das Bestreben, die klinische Xenotransplantation zu realisieren, bleibt daher weiterhin ungebrochen. Der Mangel an geeigneten, für die Transplantation zur Verfügung stehenden Spenderorganen kann heutzutage als die treibende Kraft angesehen werden.
Die Xenotransplantation könnte mittel- und langfristig noch weitere Vorteile bieten: Der Zeitpunkt der Transplantation auf den Empfänger als Elektivoperation könnte frei gewählt werden. Ebenso ist denkbar und wünschenswert, dass in der Erzeugung geeigneter transgener Tiere weitere Fortschritte erzielt werden, z.B. durch die Herstellung polytransgener Tiere [44].
Denkbar ist auch, dass eine Modifikation der Organe und Gewebe eine Immunsuppression wie wir sie heute kennen überflüssig machen könnte. Zudem könnte das Immunsystem des Empfängers gezielt auf den Empfang und die Tolerierung des artfremden Organs vorbereitet werden.
Neben dem endgültigen Organersatz, könnte die Xenotransplantation auch als Methode zur Überbrückung eines lebensbedrohlichen Organversagens bis zur Disponibilität eines geeigneten Spenderorgans eingesetzt werden („bridging“). Hier sei als ein bereits schon mit gewissem Erfolg klinisch praktiziertes Verfahren die extrakorporale Leberperfusion von isolierten Schweinelebern als Kurzzeittherapie beim akuten Leberversagen erwähnt [3, 14, 18].

1.2. Grundlagen der Xenotransplantation

Unter Xenotransplantation wird die Verpflanzung von Geweben, meistens solider Organe, zwischen zwei genetisch verschiedenen Spezies verstanden. Grundsätzlich wird zwischen konkordanter und diskordanter Xenotransplantation unterschieden.
Bei der konkordanten Xenotransplantation werden Organe phylogenetisch nahe stehender Arten übertragen [12]. Die Bezeichnung konkordant im eigentlichen Sinne bezieht sich auf das Auftreten einer hyperakuten Abstoßungsreaktion, ohne dabei näher auf die phylogenetischen Besonderheiten der Speziesunterschiede einzugehen.
Das klassischerweise verwendete Modell für eine konkordante Xenotransplantation ist die Transplantation eines Organs vom Hamster auf die Ratte. Weitere mögliche Modelle sind z.B. Maus auf Ratte oder Schimpanse auf Mensch. Hamsterherzen können in diesem Modell ohne Immunsuppression bis zu 4 Tagen einen suffizienten Kreislauf aufrechterhalten. Ab dem zweiten Tag nach der Transplantation entstehen Anti-Hamster-Antikörper, welche zu einer Zerstörung des Transplantats führen. Mit mehr als 100 Tagen

deutlich längere Organüberlebenszeiten lassen sich im Hamster-auf-Ratte-Modell erzielen, wenn der Versuch unter Immunsuppression durchgeführt wird. Fast alle kommerziell erhältlichen Immunsuppressiva sind in diesem Modell getestet worden [36].

Die Transplantation von Organen zwischen verschiedenen Primatenspezies wird als Großtiermodell für die humane konkordante Xenotransplantation angesehen.

Bei der diskordanten Transplantation [12] wird eine Organverpflanzung zwischen stammesgeschichtlich weiter entfernten Arten wie z.B. Schwein auf Mensch [15] oder wie in der vorliegenden Studie Kaninchen auf Mensch durchgeführt. Hierbei spielen präformierte Antikörper eine wichtige Rolle: diese können, wie auch die AB0-Isohämagglutinine, Komplement aktivieren und dadurch zu einer akuten Schädigung des Endothels führen [16, 22, 23].

Je weiter die zur Transplantation gewählten Spezies phylogenetisch voneinander entfernt sind, umso wahrscheinlicher ist die Existenz präformierter Xenoantikörper. Humane präformierte Xenoantikörper (XNA), größtenteils polyspezifische Immunglobuline vom IgM-Typ, richten sich grundsätzlich gegen membranständige endotheliale Gal-(α1,3)-Gal-Epitope, welche bei fast allen Spezies, außer bei Primaten und Menschen, vorhanden sind [60]. Menschen und einige andere Primaten scheinen im Laufe der Evolution diese Antigene verloren zu haben. Dieser Umstand schützt nun den menschlichen Organismus vor dem Eindringen artfremder Antigene und verhindert zugleich die Realisation der diskordanten Xenotransplantation.

Die membranständigen Glykoproteine, welche den XNA als Antigen dienen, sind beim Schwein als gp115-135 identifiziert worden. Zudem richten sie sich gegen weitere Verbindungen mit Molekulargewichten zischen 45.000 und 200.000 Dalton [50].

Werden Gal-(α1,3)-Gal-Oligosaccharide *in-vivo* in größeren Mengen in löslicher Form appliziert, kann eine Reduktion der Plasmazytotoxizität und damit eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit erreicht werden [41]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die kompetitive Bindung der präformierten Xenoantikörper durch die Oligosaccharide. Durch Absorptionsverfahren können XNA ebenfalls wiederholt entfernt und eine hyperakute Abstoßungsreaktion damit aufgeschoben werden. Die nachhaltige Suppression der Xenoantikörperbildung ist trotz unterschiedlicher Ansätze wie Splenektomie, Plasmapherese und Immunsuppression bisher nicht geglückt [35].

1.3. Komplementaktivierung und Xenotransplantatabstoßung

Nach der Reaktion der präformierten Xenoantikörper mit den Gal-(α1,3)-Gal-Epitopen erfolgt als nächster Schritt in der Xenotransplantatabstoßung die Komplementaktivierung [52]. diese verläuft nach Deposition der XNA über den so genannten klassischen Weg. Auf den Endothelzellen kommt es zur Bindung der ersten Komplementkomponente *C1q* an die Fc-Fragmente zweier benachbarter Xenoantikörper. In Verbindung mit je zwei Molekülen *C1r* und *C1s* entsteht eine aktive Protease, welche die a-Untereinheit der Komponente *C4* und nach Anlagerung von *C2* und *C4b* auch die a-Untereinheit von *C2* abspaltet. Der daraus resultierende ebenfalls enzymatisch aktive Komplex *C4b2b (C3-Konvertase)* spaltet das *C3*-Molekül. Das bei diesem Schritt gebildete *C3b* verbindet sich mit *C4b2b* zu einem neuen membranständigen Komplex *(C4b2b3b)*, der *C5* spaltet. *C5b* bindet an *C6* und *C7*, welche Membranbindungsstellen besitzten. Die Bindung von *C8* an *C5b67* löst schon eine geringfügige Lyse aus. Durch die Polymerisierung von mehreren *C9*-Komponenten an *C5b678* entsteht schließlich der „membrane attack complex“ (MAC) [1] (vgl. Abb.1-4).
Die xenogene Abstoßung kann auch über den so genannten alternativen Weg der Komplementkaskade stattfinden: neugeborene, ungesäugte Ferkel – sie besitzen kein IgM und damit auch keine Xenoantikörper - stoßen Xenotransplante ausschließlich über den alternativen Weg ab [72, 25].
Unter Umgehung der ersten Komplementkomponenten unterliegt *C3* im Blutplasma einer limitierten Hydrolyse durch Plasmaproteasen. Das auf diese Weise in geringer Menge gebildete *C3b* kann kovalent an *„Fremdoberflächen“* binden und ermöglicht die Anlagerung von *Faktor B*. Von diesem wird durch *Faktor D* der kleine *Ba*-Anteil abgespalten. Der enzymatisch aktivierte Komplex *C3bBb (C3-Konvertase)* spaltet weitere *C3*-Komponenten in ihre beiden Untereinheiten. Ein Teil der neu gebildeten *C3b*-Moleküle bindet kovalent an benachbarte Oberflächen und fungiert als neue Anlagerungsstelle für *Faktor B* im Sinne einer Verstärkungsschleife. Die Bindung von *Properidin (p)* an das *C3bBb*-Enzym bewirkt eine Stabilisierung des ansonsten sehr schnell dissoziierenden Komplexes. Durch die Ankopplung eines weiteren *C3b*-Moleküls wird die *C5*-Konvertase generiert *(C3bBb3b)*. Nach der Spaltung von *C5* erfolgt die Bindung der restlichen Komponenten *C6* bis *C9*, dass nun, wie beim klassischen Weg, der „membrane attack complex“ entstehen kann [1] (vgl. Abb. 1-4).

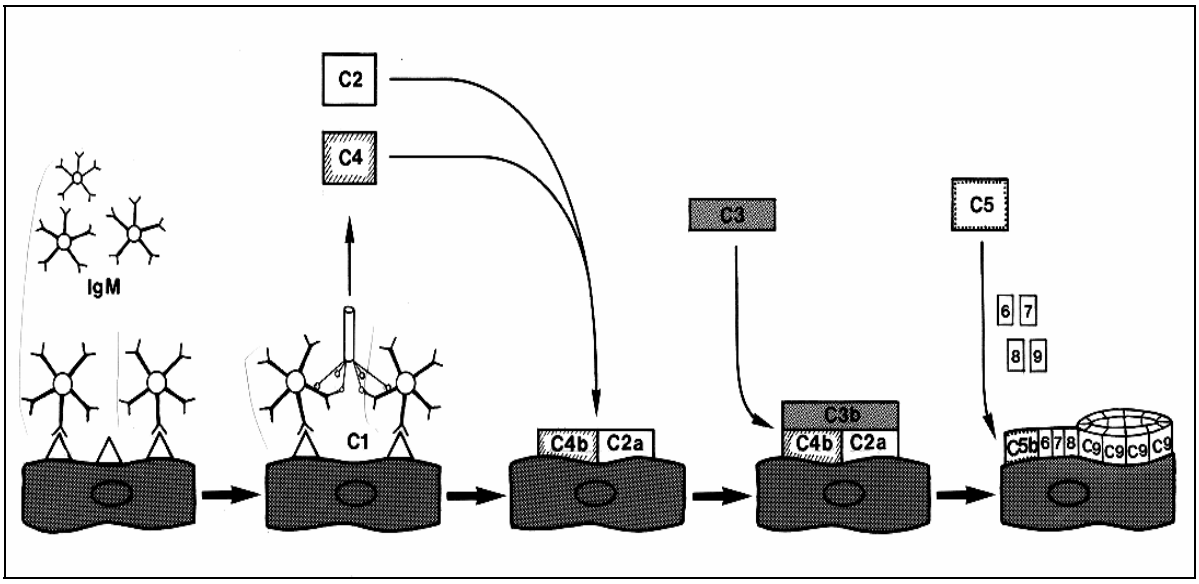


Abb. 1-4: Kaskadenartige Komplementaktivierung nach Deposition präformierter Xenoantikörper (v.a. IgM). Die Xenoantikörperablagerung führt zur Bildung der *C3*- und *C5*-Konvertase und letztlich zur Bildung des terminalen Komplexes. Mod. nach [17].

Der am Ende der Komplementkaskade stehende „membrane attack complex“ verursacht durch seine Tunnelstruktur die Zytolyse der Endothelzellen des Xenotransplantats und es kommt zu einer Mediatorfreisetzung von P-Selektin, Histamin, Plättchen-Aktivierungs-Faktor (PAF) u.a. [1].

In der Folge kommt es zur Kontraktion der Endothelzellen und zur Freilegung der Basalmembran. Die dadurch entstehende erhöhte Gefäßpermeabilität führt zu interstitiellen Hämorrhagien und Ödemen. Die gesteigerte Thrombozytenaggregation bewirkt eine Thrombosierung von Arteriolen und letztendlich eine Organinfarzierung. Weiter werden über die gesteigerte Opsonierung des Komplementfaktors *C3b* Phagozytosemechanismen ausgelöst. Zusammengenommen führen diese Pathomechanismen in einem Zeitraum von wenigen Minuten bis zu maximal drei Stunden zu einer irreversiblen ischämischen Zerstörung des Transplantats, der hyperakuten Abstoßung [54].

Im Gegensatz dazu werden bei der konkordanten Xenotransplantation Antikörper erst sekundär induziert. diese Art der Abstoßungsreaktion wird akzelerierte Abstoßung genannt.

Tab. 1-3: Experimentelle Xenotransplantationsmodelle für die hyperakute und für die akzelerierte Abstoßung. Das in der vorliegenden Studie verwendete Kaninchen-auf-Mensch-Modell ist fettgedruckt hervorgehoben.

Akzelerierte Abstoßung	**Hyperakute Abstoßung**
Nager auf andere Kleintiere	Nager auf andere Kleintiere
Hamster auf Ratte	Ratte auf Meerschweinchen
Maus auf Ratte	Meerschweinchen auf Ratte
Hase auf Ratte	Hamster auf Meerschweinchen
	Maus auf Meerschweinchen
Nichthumane Primaten auf Menschen	Nicht-Primaten auf Primaten/ Menschen
Pavian auf Mensch	Schwein auf Pavian
Schimpanse auf Pavian	**Kaninchen auf Mensch**
	Schwein auf Mensch

Die Abstoßungsreaktion diskordant xenotransplantierter Organe ist prinzipiell humoraler Art und unterliegt somit ganz anderen Mechanismen als die Abstoßung allogen transplantierter Organe. Für die verschiedenen Arten von Abstoßungsmodalitäten innerhalb der Xenotransplantation existieren mehrere Modelle (vgl. Tab. 1-3).

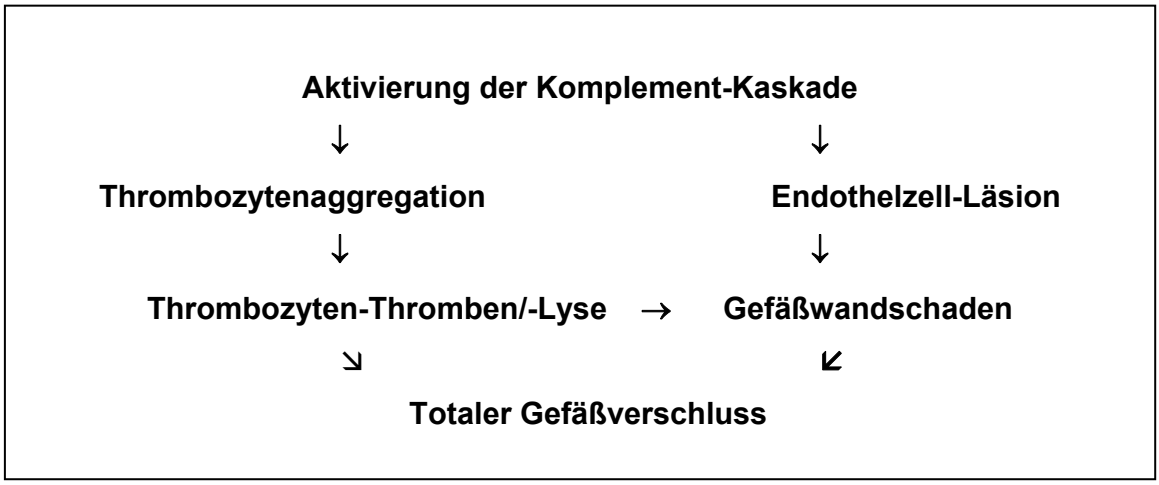


Abb. 1-5: Pathophysiologie der gemeinsamen Endstrecke der hyperakuten Komplementaktivierungskaskade.

Das morphologische Korrelat der Xenotransplantatabstoßung ist Folge des Funktionsverlusts der vaskulären Endothelzellen im transplantierten Organ. Dazu gehören Schranken- und Gerinnungsstörungen und Veränderungen der Entzündungseigenschaften der Endothelzellen.

Morphologisch imponieren diese Veränderungen als:

1. Tubuläre Nekrosen:

   Nekrotische und desquamierte Epithelzellen in den proximalen Tubuli, die nicht einer Infarzierung zuzuschreiben sind. Die Basalmembranen der nekrotischen Tuben sind intakt. Es findet keine entzündliche Reaktion statt. Als mögliche Folge finden sich kalzifizierte tubuläre Epithelien bei allen Tierarten, besonders bei Kaninchen.

2. Plättchenaggregation mit Thrombosen:

   Plättchen werden in glomerulären Kapillaren und manchmal in parenchymatösen Arterien gefunden. Die Aggregation kann begleitet sein von Fibrinablagerungen und der Präsenz von entweder Neutrophilen oder, speziell bei Kaninchen, eosinophilen Granulozyten. Die Anzahl der Plättchen variiert mit dem experimentellen Design und der verwendeten Spezies. Die Signifikanz dieses Ergebnisses bleibt unklar. Plättchenaggregate werden manchmal begleitet von einer Zerstörung und/oder einer Entfernung von Endothelzellen. In solchen Fällen werden die Plättchen regelmäßig zusammen mit Granulozyten gefunden. Dies kann in glomerulären Kapillaren und/oder parenchymatösen Arterien geschehen.

3. Glomeruläre Mikrothrombosen:

   diese bestehen hauptsächlich aus Fibrin, oft begleitet von Granulozyten und besonders in parenchymatösen Arterien begleitet von Thrombosen und Granulozyten-Adhäsionen an Endothelzellen. diese zeigen oftmals Degenerationen und/ oder Nekrosen [34].

1.4. Die Komplementregulation

Die Unterdrückung der Komplementaktivierung in diskordanten Systemen ist in den Mittelpunkt der Xenotransplantationsforschung getreten, da hier die gemeinsame Endstrecke aller Erkennungsmechanismen vorliegt. Kurz nach der Entdeckung der humoralen Immunität zeigte Charles Brodet, dass Bakterien nach Zugabe von frischem Serum mit spezifischen Antikörpern bei 37°C lysiert werden. Er schloss daraus, dass im

Serum eine hitzelabile Komponente enthalten sein muss, welche die lytische Funktion der Antikörper „komplementiert“ [1].

Erst später fand man heraus, dass es sich beim Komplement nicht um eine Einzelsubstanz sondern vielmehr um ein ganzes, kaskadenartig ablaufendes System von funktionell gekoppelten Proteinen handelt [1].

Bei Untersuchungen an Patienten mit der seltenen paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (Marchiafava-Anämie) wurde der Komplementregulator DAF entdeckt. Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) zeichnet sich dadurch aus, dass die Erythrozyten aufgrund eines Zellmembrandefekts, im durch die nächtliche relative Hypoxie angesäuerten, komplementhaltigen Serum, hämolysieren. Normale Blutzellen haben in ihrer Membran den sog. "decay accelerating factor", welcher Komplementfaktor *C3b* abbaut. Auch unter normalen Bedingungen kommt es *in-vitro* zu einer geringen Komplementaktivierung und damit zu einem Anfall von *C3b*. *C3b* kann nun an der Zelloberfläche binden und aktiviert die Komplementkaskade, an deren Ende die Lyse der Erythrozyten steht. Bei Patienten mit PNH fehlt DAF auf den Erythrozyten. In der Folge kommt die zellschädigende Wirkung von *C3b* voll zur Geltung, es kommt zur intravitalen Hämolyse [20].

Der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie liegt ein defekter Klon hämatopoetischer Stammzellen zugrunde. Der verursachende Defekt liegt in einer Mutation des PIG-A-Genes, welches an der Synthese von Glycosylphosphatidylinositol-Phospholipiden (GPI) beteiligt ist. Die GPI verankern Komplementregulatorproteine wie DAF in den Zellmembranen. Somit entstehen defekte Erythrozyten, die in Ihren Zellmembranen kein DAF enthalten [20].

Zum Schutz vor dem eigenen Komplementsystem tragen alle Säugetierzellen Komplementregulatoren (RCA = „regulators of complement activation“) auf ihren Zelloberflächen. Die RCA verhindern die Aktivierung der Komplementkaskade und schützen so die damit ausgestatteten Zellen vor der komplementvermittelten Zerstörung [1].

Der „decay accelerating factor“ (DAF) ist ein integrales Membranprotein mit einer Größe von 70 kD und 4 „short consensus repeats“ (SCR), welches an Phosphatidylinosit gekoppelt ist. DAF kommt auf den meisten Blutzellen, auf Endothelzellen und auf Epithelien vor. DAF reagiert spezifisch mit *C4b2b* und mit *C3bB6* und beschleunigt den Zerfall der *C3*-Konvertase in beiden Komplementaktivierungswegen [1]. Weitere bekannte

integrale RCA sind das Membran-Cofaktor-Protein (MCP, CD_{46}), der „membrane inhibitor of reactive lysis“ (CD_{59}, MIRL) und der Komplementrezeptor Typ 1 (CR1, CD_{35}). Neben den integralen Komplementregulatorproteinen gibt es noch lösliche Serumproteine mit einer ebenfalls regulierenden Wirkung auf das Komplementsystem [1].
Die Komplementregulatoren sind ausgesprochen speziesspezifisch. Jede Spezies hat ihre eigenen Komplementregulatoren. In der Praxis der Xenotransplantation bedeutet das, dass nur hDAF die Aktivierung menschlichen Komplements inhibieren kann. Xenotransplantate sind daher besonders sensibel gegenüber Komplementangriffen [54, 55].

1.5. Transgene Tiere und Organe

Damit Xenotransplantate in der Empfängerspezies überleben können, muss das Abwehrsystem des Empfängers entweder ausgeschaltet oder „getäuscht" werden. Diese Täuschung gelingt mithilfe spezieller transgener Tierlinien, welche zusätzliche empfängerspezifische integrale Komplementregulationsproteine, wie z.B. hDAF, auf dem Endothel der zu transplantierenden Organe exprimieren. Damit wird es bei gleichzeitigem Erhalt der komplementgestützten Immunabwehr des Empfängers möglich das Ablaufen der Komplementvermittelten HAR zu verhindern oder zumindest zu verlangsamen [42, 43]. Durch Verwendung von geeigneten Promotoren ist es möglich, die Expression des Transgens zu kontrollieren oder zu Lebzeiten des Spendertieres an- und abzuschalten [10, 11, 33].
Nur etwa 1-5% der transferierten Oozyten enthalten überhaupt die eingebrachte Fremd-DNA in ihrem Genom integriert [53]. Die erste transgene Tiergeneration, die sog. Founders, exprimiert die Fremd-DNA nur als Mosaik. Erst die F_1-Generation ist heterozygoter Genträger. Wichtig ist auch, dass die physiologische Organfunktion durch die zusätzliche Expression des Transgens nicht beeinträchtigt wird und keine pathogenen oder autoimmunen Effekte entstehen [17].
Als es gelang, Schweine zu züchten, die ubiquitär konstitutionell hDAF exprimieren, wurde ein großer Fortschritt erzielt, da dieses Regulationsprotein speziesspezifisch wirksam ist und kaum Transspeziesreaktivität aufweist [33]. Die verwendete Fremd-DNA bestand aus einem 6,5 Kilobasenkonstrukt, welches in Mikroinjektionstechnik in eine befruchtete Oozyte eingebracht wurde. Die Ex-vivo Perfusion von hDAF-transgenen Herzen von Tieren der F_1-Generation mit menschlichem Blut zeigte den protektiven Effekt des exprimierten Transgens [17, 49]. Es konnte gezeigt werden, dass primär endothelial

exprimierte transgene Proteine noch nach einstündiger ex-vivo-Hämoperfusion mit Humanblut nachweisbar bleiben [68].

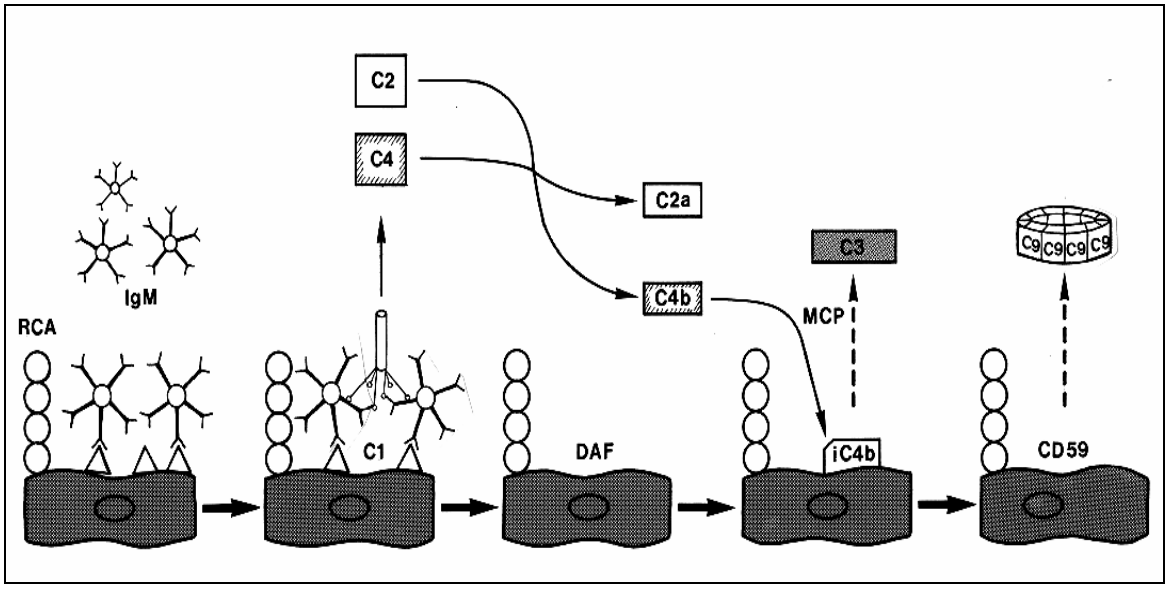


Abb. 1-6: Inhibition der Formation des terminalen Komplexes durch transgene, empfängerspezifische komplementregulatorische membranständige Proteine (DAF, CD_{59}, MCP). Modifiziert nach [17].

Die Entwicklung und die Aufzucht von transgenen Großtieren ist ein aufwendiges und kostenintensives Verfahren. Bis zum experimentellen und später klinischen Einsatz dieser Tiere können Jahre vergehen. Erster Schritt in der Entwicklungsreihe kann ein geeignetes Kleintiermodell sein, mit dessen Hilfe die Funktionalität des Transgens gezielt untersucht werden kann. Mithilfe dieses Vorgehens kann Zeit und Geld gespart und eine Fehlentwicklung vermieden werden.

1.6. Die ex-vivo-Hämoperfusion

Die oben beschriebenen Versuche am Menschen und an nichthumanen Primaten zeigen das Dilemma auf, in dem die Xenotransplantationsforschung steckt. Sehr kurze Überlebenszeiten machen die Erforschung der experimentellen Xenotransplantation am Menschen (*in-vivo*) aus ethischen und rechtlichen Gründen unmöglich. Versuche mit Primaten sind selten ethisch hinreichend zu rechtfertigen, dazu kommen die immensen Kosten und der große mit Primatenversuchen verbundene Aufwand.

In den letzten Jahrzehnten stellte sich heraus, dass einige der bisher verwendeten, klassischen Modelle der Xenotransplantation wie z.B. das Meerschweinchen-auf-Ratte oder das Schwein-auf-Hund-Modell nicht geeignet sind, um die komplexen immunologischen Mechanismen der hyperakuten Abstoßungsreaktion die in Primaten Empfängern auftreten zu untersuchen.

Erste Versuche der isolierten ex-vivo Nierenperfusion wurden 1849 [63] durchgeführt. In den letzten 4 Jahrzehnten wurden entweder ein konstantes Kreislaufsystem [38] oder ein etwas einfacheres, flusskontrolliertes Rollerpumpensystem [32] verwendet. Fast zwanzig Jahre später erst wurde ein System zur Vollblutperfusion von Schweinenieren mit Humanblut vorgestellt [46].

Sodann wurde die isolierte Hämoperfusion von tierischen Organen als Untersuchungsmethode aufgegriffen [8, 32, 38, 63]. Somit scheint die ex-vivo-Hämoperfusion von tierischen Organen mit Humanblut eine geeignete Methode zu sein, die Funktion eines Xenotransplantats und die morphologischen Veränderungen während der Frühphase der HAR zu untersuchen [21, 47].

Die ex-vivo-Hämoperfusion (eHPS) erfolgt im Optimalfall unter annähernd physiologischen Bedingungen in Normothermie, nach Einstellung des Säure-Basen-Haushaltes, der Blutgase und der Elektrolyte unter druckkontrollierten Bedingungen. In den letzten zehn Jahren wurde dieses Verfahren verstärkt aufgegriffen [45] und seit der Verfügbarkeit transgener Tiere speziell zur Untersuchung ihrer Verwendbarkeit und Funktionalität des Transgens in der klinischen Transplantation und in der experimentellen Transplantationsforschung eingesetzt [68, 70].

Speziell die ex-vivo-Perfusion von Kaninchennieren mit Humanblut wurde schon von einigen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der Xenotransplantatabstoßung und der hyperakuten Abstoßungsreaktion eingesetzt [26, 27, 28, 59].

Tublin et al. untersuchten die Zusammenhänge zwischen der renalen vaskulären Resistance und dem Perfusionswiderstand während der pulsatilen und der nichtpulsatilen Perfusion von isolierten Kaninchennieren [75].

Für die vorliegende Arbeit wurde ein spezielles Perfusions-System, das zur ex-vivo-Perfusion von Nieren mit Humanblut für die experimentelle Xenotransplantationsforschung entwickelt wurde, eingesetzt [2, 66, 67, 68, 69, 70].

1.7. Gegenstand der Arbeit

Als ein valides und nützliches Modell in der experimentellen Erforschung immunologischer Mechanismen und zur Evaluierung transgener Tierlinien hat sich die Ex-vivo-Hämoperfusion etabliert. Darum wurde für diese Untersuchung die Ex-vivo-Hämoperfusion als geeignetes Verfahren zur Untersuchung der Fragestellung gewählt.

1.7.1. Fragestellung

Die Fragestellung dieser Arbeit lautet: Wie unterscheiden sich die Nieren einer neuartigen hDAF-transgenen Kaninchenlinie gegenüber Nieren genetisch unmanipulierten Kaninchen während der maximal einstündigen ex-vivo-Perfusion mit frischem Humanblut hinsichtlich Funktionalität, Perfusionswiderstand, Perfusionsdauer, morphologischer Aspekte und der hDAF-Expression nach der Perfusion?

1.7.2. Versuchsgruppen

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden zwei Versuchsgruppen gebildet:

Gruppe 1 zur diskordanten Perfusion von transgenen, humanes DAF (hDAF, CD_{55}) exprimierenden Kaninchennieren mit frischem humanen ungepoolten Blut, n=8.

Gruppe 2 zur diskordanten Perfusion von genetisch unmanipulierten Kaninchennieren mit frischem humanem ungepooltem Blut als Kontrollgruppe, n=4.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsort

Die Untersuchungen wurden zwischen Oktober 1998 und November 1999 an der Universität Ulm und am Institut für Chirurgische Forschung der LMU, München durchgeführt.
Die Organreperfusionen und Probenentnahmen wurden im Forschungslabor der Abteilung Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Ulm durchgeführt.

2.2. Art der Untersuchung und Versuchsgruppeneinteilung

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine tierexperimentelle Vergleichsstudie mit zwei Versuchsgruppen. In beiden Versuchsgruppen wurde je eine Niere pro Tier perfundiert und nachuntersucht, die andere Niere wurde als Referenzhistologie aufgearbeitet.
Acht Nieren von hDAF-transgenen (CD_{55}) Kaninchen (Gruppe 1, TG) und vier genetisch unmanipulierte Kaninchennieren (Gruppe 2, C) wurden über einen Zeitraum von bis zu 60 Minuten ex-vivo in einem geschlossenen Kreislauf mit pulsatilem Fluss unter nahezu physiologischen Bedingungen hämoperfundiert (vgl. Tab. 2-1).

Tab. 2-1: Merkmale und Bezeichnungen der beiden Versuchsgruppen.

Gruppe 1	TG	n = 8	hDAF-transgen	ZIKA-Hybrid
Gruppe 2	C	n = 4	Genetisch unmanipuliert	Neuseeländer-Rasse

Die experimentelle Perfusionsphase betrug bei diskordanten Organen maximal 60 Minuten. Da native, gentechnisch unmanipulierte Organe spätestens innerhalb von 60 Minuten hyperakut abgestoßen werden, wurde die Beschränkung auf diesen Zeitabschnitt vorgesehen. Die Versuchsgruppe 1, bestehend aus transgenen Organen, wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenfalls über 60 Minuten perfundiert.

2.3. Versuchstiere

Die Herstellung und Aufzucht der transgenen Kaninchen (Gruppe 1) wurde unter der Leitung von Prof. Dr. G. Brem[1] durchgeführt. Als Spenderlinie wurden ZIKA-Hybrid Kaninchenembryonen[2] verwendet. Im Herstellungsprozess der transgenen Tiere mussten zunächst die Zyklen der weiblichen Spendertiere synchronisiert und zur Superovulation gebracht werden. Nach der Gewinnung der Oozyten erfolgt die Mikroinjektion der gewünschten DNA bzw. cDNA inklusive deren assoziierten regulatorischen Gensequenzen in die befruchteten Eizellen. Es wurden mehrere Kopien von RCA-YAC-DNA-Konstrukten mit einer Größe von 1,2 Megabasenpaaren (Mb) (vgl. Abb. 2-1) in die Embryonen injiziert, anschließend wurden diese Eizellen in weibliche Empfängertiere implantiert. Der Gentransfer mittels Mikroinjektion erfolgte am Institut für Tierzucht und Genetik in Wien. Die Präparation der humanen cDNA wurde durch Frau Prof. Dr. E. Weiss[3] koordiniert. Für den Embryonentransfer war Dr. Besenfelder vom IFA-Tulin verantwortlich. Bei der Analyse der integrierten Gene durch Doz. Dr. Müller vom IFA-Tulin ergab sich eine partielle Integration einer YAC-Kopie von ca. 700 Kb Größe, hierbei wurden die Gene für DAF und CR1 integriert und deren Produkte exprimiert. Die weiteren im YAC-Konstrukt kodierten RCA-Gene wurden nicht integriert und deren Produkte nicht exprimiert. Die transgenen Kaninchen der Gruppe 1 waren gesund, fertil und ohne offensichtliche Abnormitäten. Der Zuchtstatus ergab F1 Tiere und homozygote F2 Abkömmlinge. Die Aufzucht der transgenen Kaninchen erfolgte im Biotechnologiezentrum des IFA-Tulin. Für die Versuche wurden ausschließlich die homozygoten Tiere der F2-Generation verwendet (Gruppe 1).

Für diese Untersuchung stand nur eine begrenzte Anzahl von acht transgenen Tieren zur Verfügung, da es sich hierbei um eine neue, weltweit einzigartige hDAF-transgene Kaninchienlinie handelte, die nicht nachgezüchtet werden konnte. Die Möglichkeit zur Klonierung dieser Tiere bestand zum damaligen Zeitpunkt noch nicht.

[1] Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien
[2] Dr. Zimmermann GmbH, Deutschland
[3] Institut für Humangenetik der LMU München

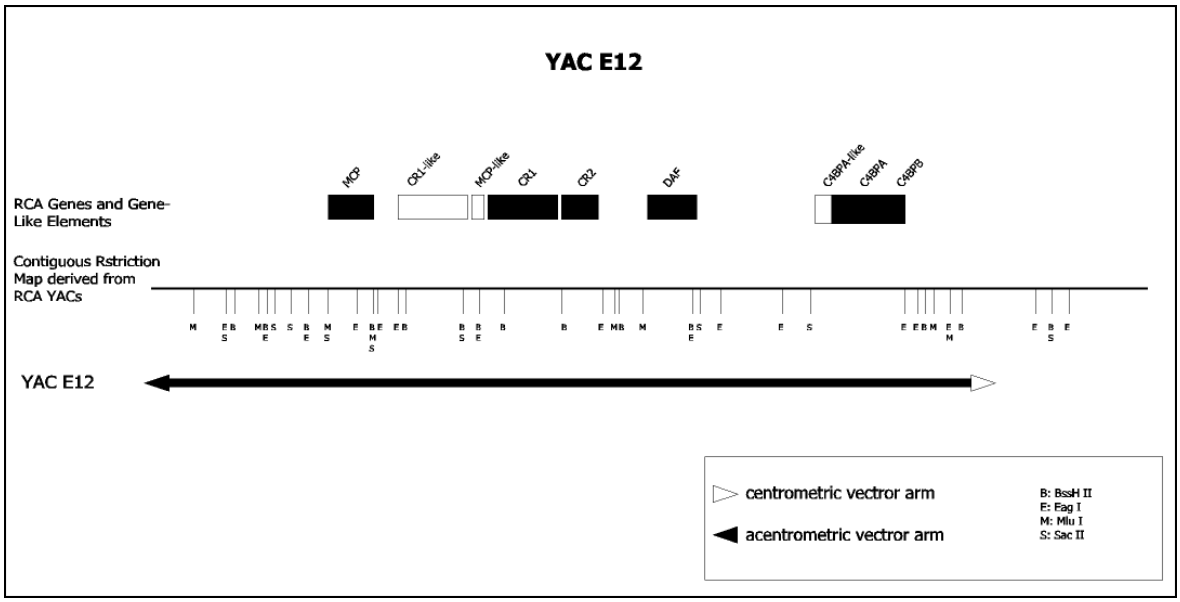


Abb. 2-1: Das zur Herstellung der hDAF-transgenen Tiere verwendete "yeastlike artificial chromosome"-DNA-Konstrukt (YAC) für wichtige humane Komplementregulatorgene, insbes. hDAF und CR1 (eigene Abbildung nach einer Vorlage von Prof. Dr. G. Brem, Wien).

Als Kontrolle (Gruppe 2) wurden genetisch unmanipulierte weiße Neuseeländer-Rasse Kaninchen, die gesunde Outbreeder aus der TFZ-eigenen Tierzucht darstellten, verwendet. diese wurden unter SPF-Bedingungen gehalten.

Zum Zeitpunkt der Organentnahme hatten die Tiere beider Gruppen ein Gewicht zwischen 3400 und 4200 g und waren voll ausgewachsen. Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet.

Die transgenen Versuchstiere wurden in den Stallungen des Instituts für Chirurgische Forschung der Universität München unter den entsprechenden Auflagen und Bedingungen gehalten und durch die dortigen Mitarbeiter betreut. Die Organentnahmen an diesen Tieren erfolgten in einem dafür bereitgestellten OP-Saal am Institut für Chirurgische Forschung in München.

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden im Tierforschungszentrum der Universität Ulm aufgezogen, gehalten und durch die Mitarbeiter des TFZ betreut. Die Organentnahmen an diesen Tieren erfolgten in einem im TFZ bereitgestellten OP-Saal.

Tab. 2-2: Physiologische Kenndaten für Kaninchen. Nach [24].

Körpertemperatur	38 – 39°C
Atemfrequenz	30 – 60/min
Atemzugvolumen	0,8 – 1,2 l/min
Herzschlagfrequenz	177 – 300/min
Arterieller Blutdruck	110/80 mmHg
Blutvolumen	Ca. 60 ml/kg Körpergewicht

2.4. Organentnahme

Die anzeigepflichtigen Versuche wurden bei den zuständigen Landes- bzw. Regierungsbehörden in Bayern und Baden-Württemberg vor der Durchführung gemeldet.
Die zur Organentnahme herangezogenen Tiere wurden durch fachkundige Mitarbeiter der jeweiligen Institute ausgewählt. Die Kaninchen mussten sich in einem veterinärmedizinisch einwandfreien Zustand befinden und wurden dann 24 Stunden vor OP-Beginn auf Nahrungskarenz gesetzt. Zu Wasser hatten die Tiere ad libidum Zugang.
Da es sich hier um terminale Versuche handelte, erfolgte die Einleitung der Narkose (nach Prämedikation mit Atropin) direkt durch i.m.-Injektion eines Narkosemittelgemisches aus Xylazin 20 mg/ml[4] und Ketamin 100 mg/ml[5] in den Musculus quadriceps femoris. Wie für die Anästhesie von Kaninchen üblich, wurden die Narkosemitteldosierung mit 50 mg Ketamin/kg KG und 4 mg Xylazin/kg KG durchgeführt. Intraoperativ erfolgte dann die Gabe des Narkosegemisches direkt intraperitoneal. Die Operation wurde im Sinne einer Multiorganentnahme von Herz, Lunge, Leber und Nieren durchgeführt. Die übrigen Organe wurden im Rahmen anderer Fragestellungen gesondert perfundiert. Nach der Narkoseeinleitung wurde dorsal eine Stelle zur Anbringung der Elektro-Kauter-Elektrode rasiert und ventral von der Oberkante des Os pubis bis zur Unterkante der Mandibula rasiert. Das Tier wurde dann in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagert und rasch über eine direkte Tracheotomie intubiert und mit 100% medizinischem Sauerstoff beatmet.
Unter stabilen Kreislaufbedingungen erfolgte dann die komplette mediane Laparotomie sowie die Mobilisierung und Verlagerung von Dünn- und Dickdarm auf die rechte Seite. Im nächsten Schritt wurden dann die Nierengefäße und Ureteren auf beiden Seiten, sowie Aorta abdominalis und die Vena cava pars abdominalis dargestellt. Nun wurden 20 ug

[4] Rompun® 2%, BayerVital GmbH & Co. KG, 51368 Leverkusen.
[5] Ketavet®, Pharmacia & Upjohn.

Aprostadil[6] und 5000 IE Heparin-Natrium[7] i.v. injiziert. Hierdurch wurden eine systemische Antikoagulation und die Weitstellung der Endstrombahn erreicht. Die Aorta wurde sodann distal abgeklemmt, proximal der Bifurkation inzidiert und rasch eine Gefäßkanüle nach Vollmar[8] eingebracht und durch Ligaturen fixiert. Über diesen Zugang wurde dann die hypotherme Schwerkraftperfusion aus 80 cm Höhe mit 500 ml 4°C-kalter handelsüblicher Organkonservierungslösung (z.B. Celsior®[9]) durchgeführt. Unmittelbar nach Beginn der Schwerkraftperfusion erfolgte ein Entlastungsschnitt in die distale Vena cava. Schon zu Beginn dieses Vorgangs erfolgte eine direkte Kühlung der Organe durch Einbringung eines Gemisches aus Konservierungslösung und „crushed ice“ in die Abdomenhöhle und Retroperitonealraum. Überschüssige Flüssigkeit und Blut wurden mittels Vakuumabsaugpumpe entfernt. Nach abgeschlossener Schwerkraftperfusion erfolgte die beidseitige Präparation und En-bloc-Nephrektomie in Hypothermie.
Die Organe wurden dann zusammen mit 100 ml gekühlter Organkonservierungslösung doppelt in Plastikbeutel verpackt und bei 4°C auf Eis aufbewahrt und transportiert. Die Kaltischämiezeit der Nieren betrug zwischen 3,5 und 5 Stunden, im Mittel 4,25 Stunden.

Tab. 2-3: Qualitative und quantitative Zusammensetzung einer Organkonservierungslösung am Beispiel von Celsior® - „Arrest and cold storage solution for human heart transplant“.

Mannitol	60 mmol
Lactobionic Acid	80 mmol
Glutamic Acid	20 mmol
Histidin (Base)	30 mmol
Calciumchlorid	0,25 mmol
Kaliumchlorid	15 mmol
Magnesiumchlorid	13 mmol
Natriumchlorid	100 mmol
Reduzierte Glutathionen	3 mmol
Wasser für Injektionszwecke	Ad 1 L
pH	7,3
Osmolalität	320 mOsmol/kg

[6] Prostavasin® 20 ug (Stoffgruppe PGE1) Schwarz Pharma AG, Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monsheim.
[7] B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen.
[8] Ulrich Medizintechnik GmbH & Co. KG, Buchbrunnenweg 12, 89081 Ulm.
[9] IMTIX SangStat GmbH, Hockenheim Str. 6, 68775 Ketsch.

2.5. Perfusionsvorbereitung

Weniger als eine Stunde vor Beginn der Perfusion wurden insgesamt 300 – 400 ml Blut aus einer peripheren Vene eines freiwilligen, gesunden und infektfreien Probanden abgenommen. Pro Versuch wurde nur ein Blutspender bemüht, d.h. es wurde kein Misch- oder Poolblut verwendet. Die Blutentnahme erfolgte mittels einer 19-G-Butterfly-Kanüle und 50 ml Kolbenspritzen mit Gummistopfen[10], die zuvor mit je 500 IE Heparin-Natrium versetzt wurden. Die Entnahme erfolgte sorgfältig und schonend, um Hämolysen während der Entnahme zu vermeiden. Aus dem frisch entnommenen, mit 10 IE/ml vollheparinisiertem Blut, wurde dann eine Ausgangsprobe genommen, aus welcher Hämoglobingehalt und Hämatokrit bestimmt wurden. Nach Ermittlung dieser Ausgangswerte wurde das Blut mit handelsüblicher Ringerlösung auf einen Hämatokritwert von 30% titriert. Das Perfusionsmedium wurde bis zur Einleitung in das Perfusionssystem in einem Wasserbad bei 37°C aufbewahrt (Vermeidung von Aktivierung durch Temperaturschwankungen).
Das Blut wurde spätestens innerhalb einer Stunde nach Abnahme zur Perfusion verwendet. Durch Veränderung des Pumpenflusses, Titration mit kliniküblichem Natriumbicarbonat und über die Frischgaszufuhr (Pressluft, O_2, CO_2) konnte das Perfusionsmedium unter der gesamten Perfusionsdauer im physiologischen Normbereich (vgl. Tab. 2-5) gehalten werden.

Tab. 2-4: Normalwerte für arterielle Blutgase bei männlichen Probanden. Nach [39].

pH	7,37 – 7,45
pCO_2	4,7 – 6,1 kPa
pO_2	9,5 – 13,9 kPa
Standard-Bikarbonat	21 -26 mmol/
Base Excess (BE)	-2 bis +3 mmol
O_2-Sättigung	95 – 98,5%

[10] B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen.

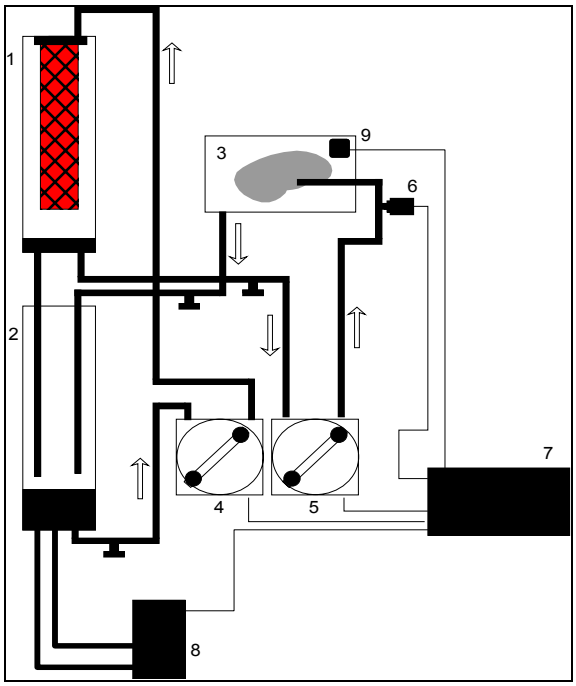
Zur Aufrechterhaltung eines Hämatokrits von 30 % wurde nach Blutbildkontrolle die über Urin und Verdunstung (ca. 15 ml/h) verlorene Flüssigkeit mit handelsüblicher Ringerlösung substituiert. Die Einstellung der o.g. Parameter im Perfusionsmedium benötigte ca. 20 Minuten. Während dieser Zeit wurde das Organ bei 4°C gekühlt auf Eis belassen.

Die ex-situ-Dissektion und Präparation der Nieren erfolgte unter hypothermen Bedingungen an der Workbench in dem Labor, in dem auch die Reperfusionsversuche unternommen wurden. Nach Entfernung des restlichen Nierenkapselfettgewebes und Ausschluss einer doppelten Nierenarterie erfolgte die Kanülierung der A. renalis und des Ureters jeweils mittels einer Gefäßkanüle (iD 1,2 mm) nach Volmar. Nach Gewichtsbestimmung wurde die Niere in die Organkammer eingebracht und die arterielle Kanüle sowie der Urinkatheter mit dem System verbunden. Der venöse Abfluss erfolgte über die präparierte und gekürzte V. renalis frei in den Ablauf der Organkammer.

2.6. Reperfusionsphase und Perfusionsanlage

Die Reperfusionsversuche erfolgten in einem eigens für diesen Zweck konstruierten mobilen Organ Perfusions System (MOPS). Ziel dieser Konstruktion war es, artifizielle Einflüsse so gering wie möglich zu halten, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und bei relativ einfacher Bedienbarkeit ein möglichst physiologisches Milieu zu schaffen.

Wesentliches Prinzip der experimentellen Organperfusion mit Vollblut war die Verwendung eines Systems mit zwei unabhängigen Parallelkreisläufen: dem Oxygenierungskreislauf und dem eigentlichen Perfusionskreislauf. Dieses System wurde als Modifikation eines von Otte und Mitarbeitern vorgeschlagenen Gerätes zur ex-vivo Nierenperfusion unter Verwendung von Humanblut konzipiert [46]. Die Abb. 2-2 zeigt schematisiert den Aufbau des Gerätes.



1. Schirm-Oxygenator	2. Blut-Reservoir
3. Organkammer	4. Pumpe des Oxygenierungskreislaufs
5. Pumpe des Arbeitskreislaufs	6. Statham-Druckwandler
7. Mess- und Steuerungscomputer	8. pH- und Temperatursonde
9. Temperatursensor in der Organkammer	

Abb. 2-2: Schematischer Schlauch-, Pumpen- und Geräteaufbau des verwendeten mobilen Organ Perfusions Systems (MOPS). Die Pfeilmarkierungen stellen die Fließrichtung des Perfusats dar. Nach [66].

Die Anlage besteht aus zwei getrennten Kreisläufen. Im Oxygenierungskreislauf zirkuliert das Blut zwischen dem Reservoir und einem eigens für dieses System entwickelten Schirmoxygenator, in dem ein Gasgemisch aus Luft, O_2 und CO_2 zugeführt wird. Der Schirmoxygenator gewährleistet eine minimale Leukozytenadhärenz bei größtmöglichem Gasaustausch. Im zweiten Kreislauf erfolgt flussgesteuert und druckkontrolliert die Organperfusion. Das hierfür benötigte Blut wird direkt aus dem Oxygenatorreservoir entnommen. Nach der Organpassage fließt es in diesen zurück.

Der Antrieb der MOPS Perfusionsmaschine besteht aus zwei pulsatilen Rollerpumpen[11] mit einer Fließrate von 0.4 – 3600 ml/min und zwei Einkanal-Pumpenköpfen[12] mit je drei Pumpenrollen aus Edelstahl. In diesen können Schläuche mit einer Wandstärke von 1,6 und 2,4 mm eingelegt werden, wobei der Schlauchanpressdruck über Rollen regulierbar ist. In dieser Versuchsreihe wurden insgesamt 3 Meter platinbeschichtetes Schlauchmaterial aus Silikon[13] mit einem Innendurchmesser von 3,2 mm verwendet.

Das Organ wurde auf einem Netz aus Fallschirmseide frei liegend in einer geschlossenen, beheizbaren Plexiglaskammer bei Wasserdampfsättigung und 37°C gelagert. An der Kammerwand wurden über Kugelgelenke variabel einstellbare Krokodilklemmen befestigt, welche die spannungsfreie Positionierung von Arterien- und Ureterkanülierungen ermöglichten. Das venöse Effluat wurde aus den nicht kanülierten Nierenvenen über einen in die Kammer integrierten Auffangtrichter in das Reservoir zurückgeleitet.

Sämtliche mit Blut in Kontakt stehenden Oberflächen bestanden aus biokompatiblen bzw. inerten Materialien, welche nicht zur Leukozytendepletion führen. Diese Anforderung erfüllten Silikon, Polymethylmethacrylat (PMMA) und chirurgischer Edelstahl.

2.6.1. Perfusionsdruck, Fluss und Resistance

Die arterielle Druckmessung zur computerassistierten Flussregulierung befand sich direkt am arteriellen Katheter, welcher zusätzlich mit einem Blutfilter ausgestattet war. Direkt vor dem arteriellen Katheter wurde ein Statham-Druckmesselement[14], welches mit einem Siemens-Monitor[15] verbunden war, eingesetzt. Der Perfusionsdruck der druckkontrollierten Perfusion (Zielwert: P_{SYS}=110 mmHg) wurde durch rechnergestützten Pumpenantrieb erreicht[16].

[11] MCP-Standard 380 AD, Best(keine Rechtschreibvorschläge)-Nr. MCP 806, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Futtererstrasse 16, 97877 Wertheim-Mondfeld.
[12] Typ 380 AD, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH.
[13] Tygon SI Silikon 3350 Platin, Tube i.D. 3,2 mm, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH.
[14] Statham-Druckmesselement, Medex Medical, Druckmessset.
[15] Monitor Siemens Sirecust, München.
[16] PCL 818 H-Messkarte, Fa. Spectra, Leinfelden- Echterdingen, 586 IBM-kompatible DX-60 Computersoftware; Labtech Notebook pro 8.01, Laboratory Technologies Corporation, Wilmington, USA.

2.7. Laborchemische Untersuchungen

Während der Reperfusionsphase wurde pH-Wert, Blutgase und Hämatokrit in kurzen Abständen mit einem automatischen Coulter-Gerät[17] durchgeführt, dies diente zum Monitoring des Perfusionsmilieus. Die Glukosekonzentration im Blut wurde bei Bedarf in Schnelltests[18] auf physiologische Werte überprüft, eine Substitution war nicht vorgesehen.
Nach 0, 1, 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten wurden mittels EDTA-Kalium- und Lithium-Heparin-Monovetten[19] Blutproben entnommen und asserviert. Die Blutproben wurden direkt nach der Entnahme 7 Minuten bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert und der Überstand (➔ Serum) bei -80°C eingefroren und bis zur laborchemischen Analyse aufbewahrt.
Klinisch chemisch wurden die Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid in mmol/l), Glucose (mg/dl), Kreatinin (µmol/l), Harnstoff (mmol/l), Harnsäure (mmol/l), Lactat (mmol/l) und das Blutbild analysiert.
Desweiteren erfolgte die spektrofotometrische Bestimmung des Entzündungsmediators TNF-α in ELISA-Technik mit kommerziell erhältlichen Testkits[20].

2.8. Urin

Zur direkten Kontrolle der Nierenfunktion wurde eine Beobachtung und Registrierung des Urinflusses und eine fraktionierte Gewinnung von Urinproben in speziellen Messzylindern zur späteren laborchemischen Analyse durchgeführt.

2.9. Morphologie

2.9.1. Makroskopie

Vor der Perfusion wurden die Organe auf ihre Unversehrtheit überprüft und das Ausgangsgewicht bestimmt. Kurz nach Beginn, während und nach der Perfusion wurde eine direkte Inspektion des Organs durchgeführt, um mögliche Anzeichen für ein HAR erkennen zu können.

---

[17] Coulter-Counter, Coulter, Krefeld.
[18] Fa. Boehringer, Ingelheim.
[19] Sarstedt Monovette®, Sarstedt AG & Co., 51582 Nümbrecht.

2.9.2. Histologie und Immunhistologie

Nach Ende der Reperfusionsphase wurden die Organe zur histomorphologischen und immunhistologischen Verarbeitung aufgearbeitet. Die Lagerung bzw. Fixierung erfolgte entweder in Formaldehyd oder bei einfacher Schockgefrierung bei -70°C in Flüssigstickstoff. Die immunhistologischen Färbungen erfolgten in Standardtechnik (Biotin-Komplex, Immunperoxidase-Methode).
In den Nieren wurden post perfusionem mittels Immunhistologie vor allem die verschiedenen Phasen der Komplementaktivierung (DAF/CD55, IgG, C3, C4, C9) untersucht. Die perfundierten Organe und die nichtperfundierten Nieren wurden histologisch und immunhistochemisch (*C3ba, DAF, Lectin 1*) analysiert.

2.10. Gerätekalibrierung und Parameterberechnung

2.10.1. Pumpflussrate

Vor Beginn der Versuche wurde die Pumpflussrate, deren Einflussgrößen die Anzahl der Umdrehungen/min und der Schlauchinnendurchmesser sind, kalibriert. Dazu wurde das Minutenpumpvolumen in einem Präzisionsmesszylinder bestimmt.

2.10.2. Kalibrierung des Druckaufnehmers

Vor jedem Versuch wurden ebenfalls die Druckaufnahmeeinheit und der Siemens-Monitor nach den Standardanweisungen kalibriert.

2.10.3. Perfusionswiderstand

Während der Perfusionsphase wurden die Druckwerte und Flussraten aufgezeichnet. Der Perfusionswiderstand (ex-vivo vaskuläre Resistance) wurde dann, analog zum Ohm'schen-Gesetz, als Quotient aus (Druck/Fluss) errechnet. Die Einheit wird in (mmHg x min/ml) angegeben [75].

2.10.4. Kanülenwiderstand

In einem Leerversuch ohne angeschlossene Organe wurde für den Druckbereich, in dem die Perfusion stattfand (min. 80 und max. 160 mmHg), und für die verwendete Gefäßkanüle mit dem iD 1,2 mm ein Kanülenwiderstand von 0,87 (mmHg x min/ml) ermittelt.

---

[20] Fa. Immunotech, Hamburg. Fa. Biermann, Krefeld.

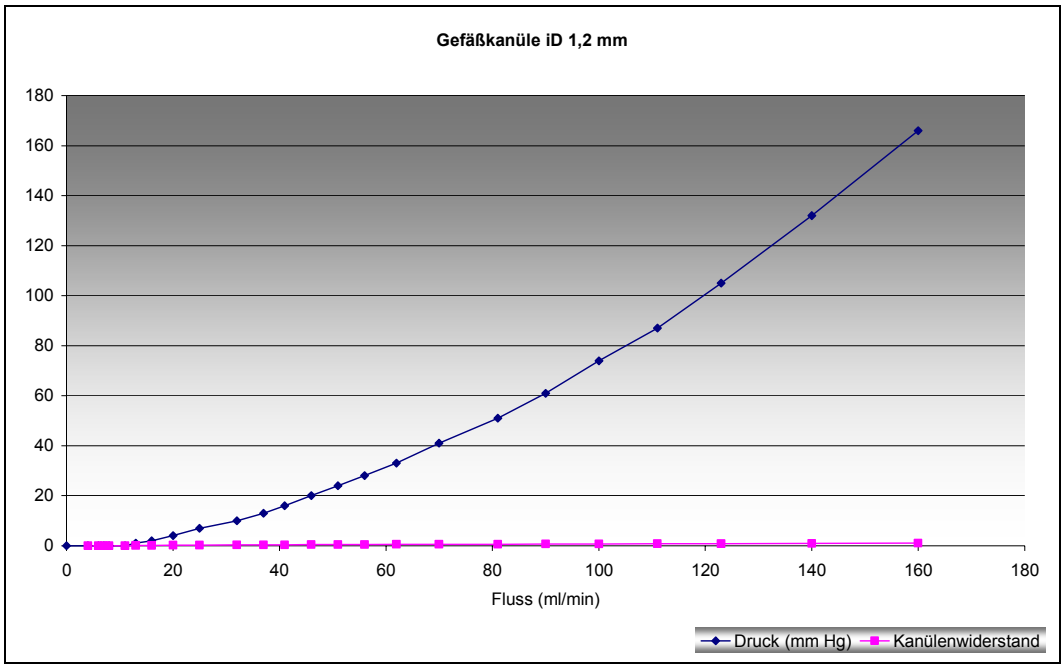


Abb. 2-3: Kalibrierungskurve für Kanülenwiderstand (rosa) und Perfusionsdruck (blau). Der Kanülenwiderstand als Quotient aus Druck/Fluss verläuft im potenziellen Perfusionsdruckbereich (75 bis 166 mmHg) linear. Der Kanülenwiderstand ist konstant.

2.10.5. Renale vaskuläre Resistance

Die wahre renale vaskuläre Resistance (RVR) wurde durch Subtraktion des zuvor in einer Kalibrationskurve bestimmten Kanülenwiderstandes vom Perfusionswiderstand berechnet. Die Einheit wird ebenfalls in (mmHg x min/ml) angegeben. diese Methode zur Berechnung der RVR konnte mittels In-Line-Dopplersonografiemessungen während aktiver pulsatiler Perfusion verifiziert werden [75]. Für den Menschen (in vivo) gelten vaskuläre Resistancewerte zwischen 1 und 3 [mmHg x min/ml] als physiologisch.
Der für diesen Perfusionsdruckbereich relevante mittels Kalibrationskurve ermittelte Kanülenwiderstand von 0,87 ist von den Perfusionswiderstandswerten zu subtrahieren, um daraus die echte renale vaskuläre Resistance zu erhalten.

2.10.6. Gefäßwiderstand

Der Gefäßwiderstand dient als Parameter für die renale Hämodynamik und wird berechnet als Quotient aus [Druck/glomeruläre Filtrationsrate] und mit der Einheit [mmHg x min x g/ml] angegeben.

2.10.7. Urinfluss

Das Urinvolumen wird im Fraktionsmesszylinder jede zweite Minute abgelesen und daraus der Urinfluss in [ml/min] errechnet: Urinfluss=(aufgefangenes Urinvolumen pro 2 Minuten/2).

2.11. Datenverarbeitung und Statistik

Da es sich in der vorliegenden Untersuchung um eine tierexperimentelle Arbeit mit nur im begrenzten Umfang zur Verfügung stehenden transgenen Tieren handelt, resultieren daraus relativ kleine Versuchsgruppen. Statistische Tests im Sinne eines Gruppenvergleichs (z.B. Varianzanalyse) wurden nach gründlicher Abwägung nicht durchgeführt, da die Aussagekraft solcher Tests bei sehr kleinen Kollektiven fragwürdig ist und kein echter Informationsgewinn dadurch zu erwarten ist.

Die gewonnenen Daten wurden deskriptiv analysiert und grafisch dargestellt. Am aussagekräftigsten erschien die Angabe des Median, des arithmetischen Mittels und der Minimal- und Maximalwerte. Zur Auswertung, Berechnung und grafischen Darstellung wurde die Tabellenkalkulationssoftware Microsoft® Excel und Sun® StarOffice™ verwendet. Zur Abfassung der Dissertationsschrift wurde Microsoft® Word und Adobe® Acrobat verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Perfusionsdauer und Perfusionswiderstand

Die experimentelle Perfusionsdauer betrug zwischen 45 und 60 Minuten oder solange, bis die Organe makroskopisch sichtbare hämorrhagische Infarzierungen aufwiesen.
In Bezug auf den Perfusionswiderstand (ex-vivo vaskuläre Resistance) als Quotient aus (Druck/Fluss), gemessen in [mmHg x min/ml], zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Organen der beiden Gruppen.
Für den Menschen gelten Perfusionswiderstandswerte zwischen 1 und 3 (mmHg x min/ml) als physiologisch, wahrscheinlich liegen die physiologischen Werte für Kaninchen etwas höher.

3.1.1. Perfusionswiderstand bei Gruppe 1

Drei Organe aus Gruppe 1, (K7, K10 und K14) konnten die maximale Dauer von 60 Minuten und drei weitere Nieren aus Gruppe 1 (K1, K3 und K15) konnten über 45 Minuten perfundiert werden. Ein Organ (K5) stieg nach 30 Minuten und ein anderes Organ (K12) bereits nach 10 Minuten drastisch mit den Widerstandswerten an, sodass die Perfusion beendet wurde.
Insgesamt als Median dargestellt, bewegte sich der Perfusionswiderstand in Gruppe 1 mit Werten von 9,4 [mmHg x min/ml] zu Beginn der Perfusion, 6,8 [mmHg x min/ml] nach 15 Minuten, 7,3 [mmHg x min/ml] nach 30 Minuten, 8,2 [mmHg x min/ml] nach 45 Minuten und 8 [mmHg x min/ml] nach 60 Minuten Perfusion im hoch normalen Bereich.

Tab. 3-1: Messwerte und abgeleitete Werte wie Perfusionswiderstand und renale vaskuläre Resistance (RVR) in der Einheit [mmHg x min/ml] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) im zeitlichen Verlauf von 0 bis 60 Minuten während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

Gruppe 1, n=8	**0**	**1**	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**	**Mittelwert**
K1		3,92	2,85	2,77	2,61	2,88	3,50	-	3,09
K3		2,02	5,97	6,17	10,34	12,35	13,73	-	8,43
K5		1,23	3,14	5,22	6,79	7,30	-	-	4,74
K7		1,93	1,47	2,7	3,64	3,53	4,76	6,17	3,46
K10	10,34	6,09	6,69	10,6	10,2	7,28	7,1	8,02	8,29
K12	13,82	24,87	24,87	37,50	-	-	-	-	25,26
K14	4,14	4,59	4,81	4,51	4,51	5,38	9,34	12,19	8,88
K15	8,41	7,79	8,09	8,97	12,65	44,12	62,94	-	21,85
Mittelwert	9,18	6,55	7,24	9,81	7,25	11,83	16,90	8,79	
Stabw.	4,04	7,73	7,45	11,53	4,40	14,13	20,83	4,84	
Median	**9,38**	**4,25**	**5,39**	**5,70**	**6,79**	**7,28**	**8,22**	**8,02**	6,88
Min	4,14	1,23	1,47	2,70	2,61	2,88	3,50	6,17	
Max	13,82	24,87	24,87	37,50	12,65	44,12	62,94	12,19	
Kanülenwiderstand	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	
Mediane RVR	**8,51**	**3,38**	**4,52**	**4,83**	**5,92**	**6,41**	**7,35**	**7,15**	6,01

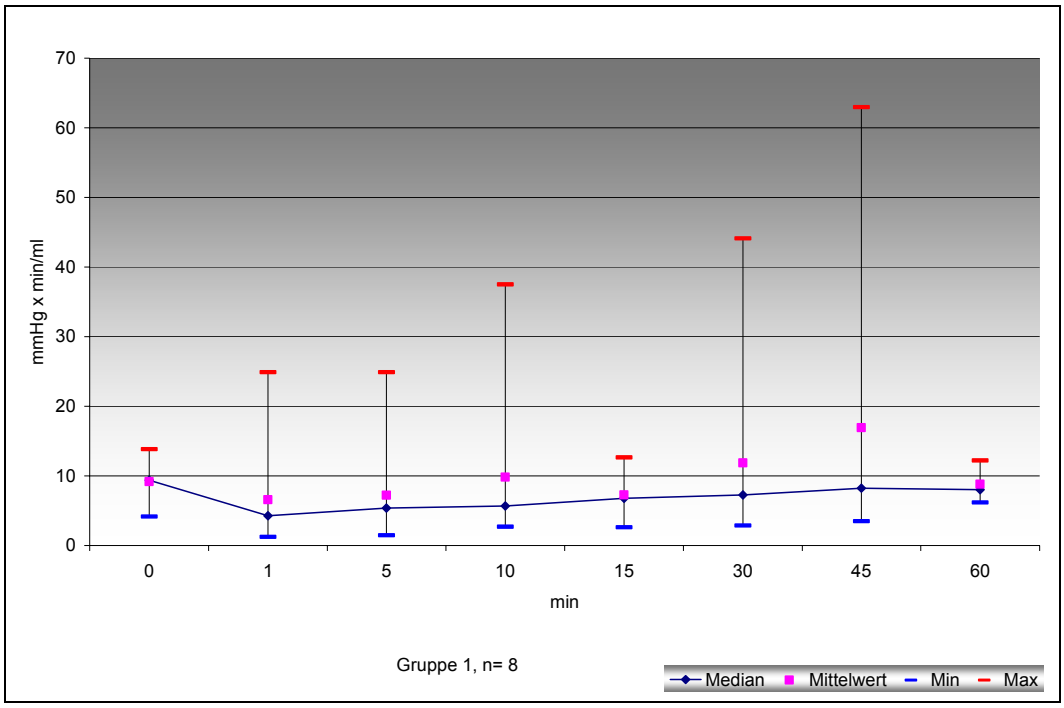


Abb. 3-1: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Perfusionswiderstandes in der Einheit [mmHg x min/ml] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

3.1.2. Perfusionswiderstand bei Gruppe 2

In Gruppe 2 wurden zum Vergleich insgesamt 4 Organe hämoperfundiert. Drei Nieren (N1, N5, N7) konnten über einen Zeitraum von 45 Minuten perfundiert werden. Eine Niere (N3) stieg nach 30 Minuten mit dem Perfusionswiderstand von 14,3 auf 40,3 [mmHg x min/ml] an. Die Perfusion konnte darauf nicht weiter fortgeführt werden. In der Darstellung als Median liegen die Werte für den Perfusionswiderstand in der Kontrollgruppe bei 10 [mmHg x min/ml] zu Beginn der Perfusion, bei 21,9 [mmHg x min/ml] nach 15 Minuten, bei 36,6 [mmHg x min/ml] nach 30 Minuten und bei 54 [mmHg x min/ml] nach 45 Minuten Perfusionsdauer (vgl. Abb. 3-2).

Tab.3-2: Messwerte und abgeleitete Werte wie Perfusionswiderstand und renale vaskuläre Resistance (RVR) in der Einheit [mmHg x min/ml] in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) im Zeitverlauf von 0 bis 45 Minuten während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

Gruppe 2, n=4	**0**	**1**	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**	**Mittelwert**
N1	5,1	6,6	14,8	15,50	14,00	16,10	18,70	-	12,97
N3	10,9	14,3	21,6	16,10	14,30	40,30	-	-	19,58
N5	17,7	15,4	16,9	31,30	29,50	32,80	54,40	-	28,29
N7	9,2	13,8	15,5	22,9	35,1	43	54	-	27,64
Mittelwert	10,73	12,53	17,20	21,45	23,23	33,05	42,37	-	
Stabw.	5,25	4,01	3,06	7,37	10,73	12,10	27,00	-	
Median	10,05	14,05	16,20	19,50	21,90	36,55	54,00	-	24,61
Min	5,10	6,60	14,80	15,50	14,00	16,10	18,70	-	
Max	17,70	15,40	21,60	31,30	35,10	43,00	54,40	-	
Kanülenwiderstand	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87		
Mediane RVR	**9,18**	**13,18**	**15,33**	**18,63**	**21,03**	**35,68**	**53,13**		23,74

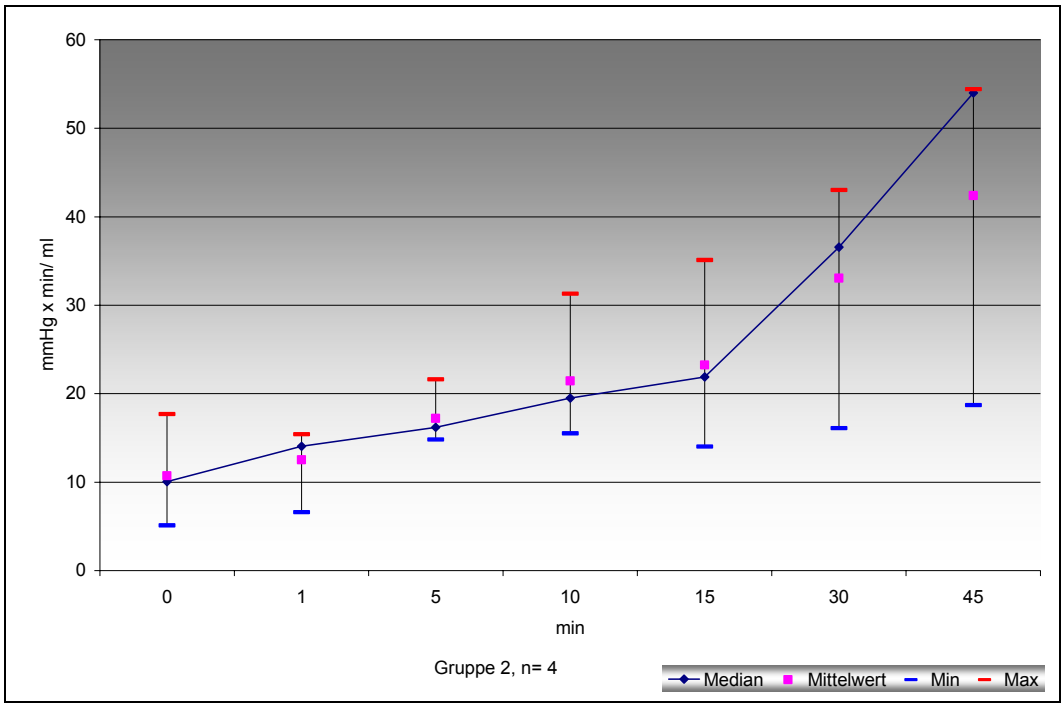


Abb. 3-2: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Perfusionswiderstandes in der Einheit [mmHg x min/ml] in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

3.1.3. Perfusionswiderstand und renale vaskuläre Resistance (RVR)

Bei der grafischen Darstellung der medianen Perfusionswiderstände beider Versuchsgruppen im direkten Vergleich wird der Unterschied zwischen transgenen und genetisch unveränderten Tieren noch deutlicher.

Der Perfusionswiderstand der Gruppe 1 bleibt über den Untersuchungszeitraum von bis zu 60 Minuten nahezu konstant und liegt für die Gesamtdauer der Perfusion im Mittel bei 6,88 [mmHg x min/ml].

Die medianen Perfusionswiderstandswerte der Kontrollgruppe steigen von Beginn an kontinuierlich an, mit einem starken Anstieg der Widerstandswerte ab der 15. Minute. Im Mittel lagen die Perfusionswiderstandswerte in Gruppe 2 bei 24,61 [mmHg x min/ml] und damit signifikant über dem Niveau der Gruppe 1 (vgl. Abb. 3-3).

Für den Anstieg des Perfusionswiderstands konnten Veränderungen der Elektrolytzusammensetzung, der Glukosespiegel und Blutgaspartialdrücke der beiden Behandlungsgruppen ursächlich ausgeschlossen werden. Ebenso waren die mittleren Organgewichte beider Gruppen mit 22,5 g bei Gruppe 1 und 22,7 g bei Gruppe 2 vergleichbar.

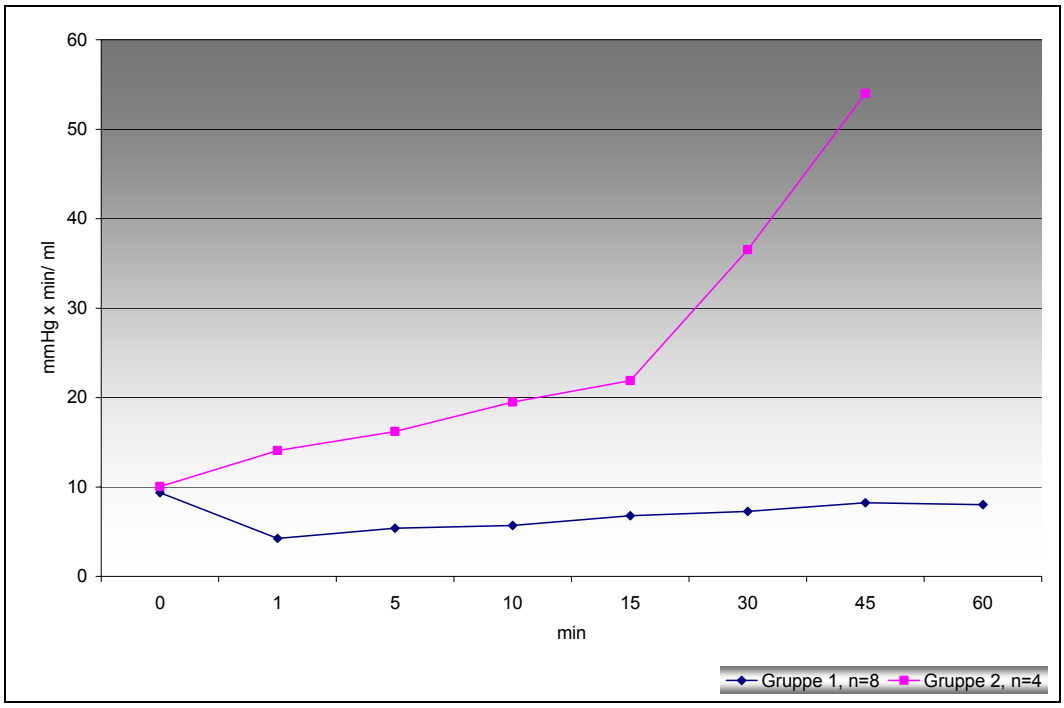


Abb. 3-3: Grafische Gegenüberstellung der Mediane der Perfusionswiderstände der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) versus Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

3.2. Laborchemische Serumwerte

3.2.1. Elektrolyte

Die Überwachung und Dokumentation der Serumelektrolyt-Konzentrationen diente sowohl der Funktionsprüfung des hauptsächlich für die Bluthomöostase verantwortlichen Organs Niere, als auch zur Stabilitäts- und Verlaufskontrolle des ex-vivo Perfusionssystems.

Die Natrium-, Kalium- und Calcium-Werte in beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant und bleiben während des Versuchs annähernd konstant.

Die Natriumwerte im Serum für die Gruppe 1 lagen unter der Perfusion durchgängig im Bereich von 151 [mmol/l] bis 153 [mmol/l] mit einem Anstieg auf 159,7 [mmol/l] nach 60 Minuten Perfusion.

In der Kontrollgruppe lagen die Natriumwerte konstant im hoch normalen Bereich von 145,9 [mmol/l] zu Perfusionsbeginn und 146,3 [mmol/l] nach 45 Minuten.

Der starke Anstieg des Natriums in Gruppe 1 ab der 45. Minute ist wahrscheinlich, auf Grund der längeren Perfusionsdauer und dem damit verbundenen Verlust von Flüssigkeit

durch Verdunstung, mit der zu diesem Zeitpunkt notwendig gewordenen Flüssigkeitssubstitution mit physiologischer Kochsalzlösung zu erklären.

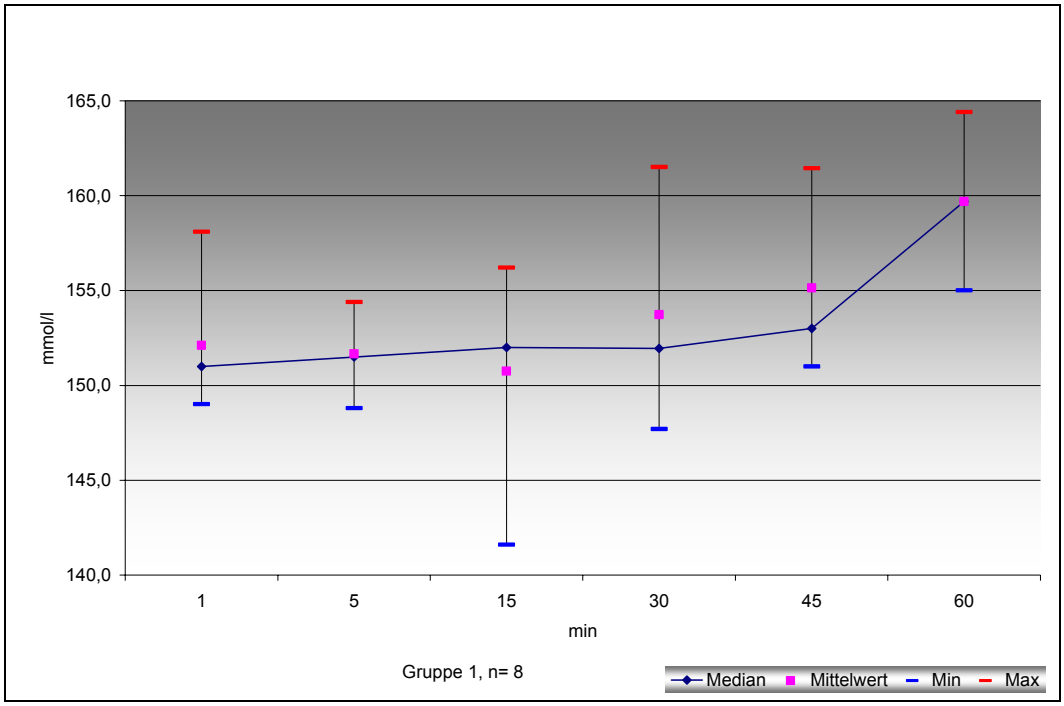


Abb. 3-4: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumnatriums in [mmol/L] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

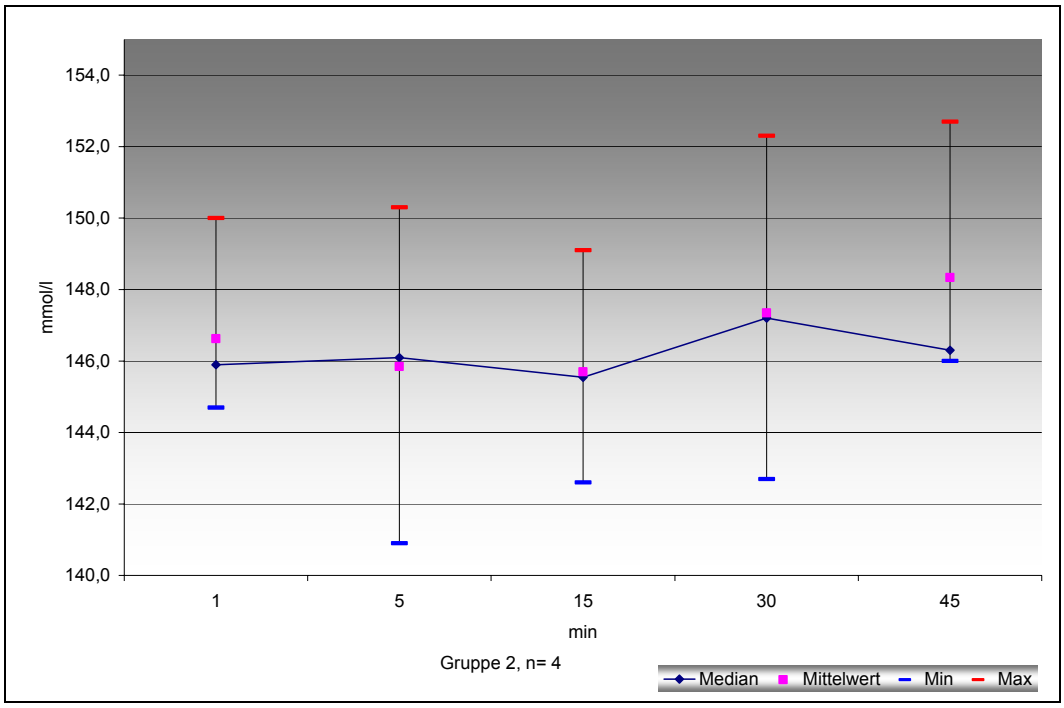


Abb. 3-5: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumnatriums in [mmol/L] in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut..

In Gruppe 1 lagen die Serumkaliumspiegel zu Versuchsbeginn bei 2,25 [mmol/l], bei 3,14 [mmol/l] nach 30 Minuten, bei 2,48 [mmol/l] nach 45 Minuten und bei 3,05 [mmol/l] nach 60 Minuten Versuchsdauer. In der Kontrollgruppe lagen die Kaliumwerte am Anfang bei 2,64 [mmol/l], bei 3,12 [mmol/l] nach 30 Minuten und bei 2,88 [mmol/l] nach 45 Minuten.

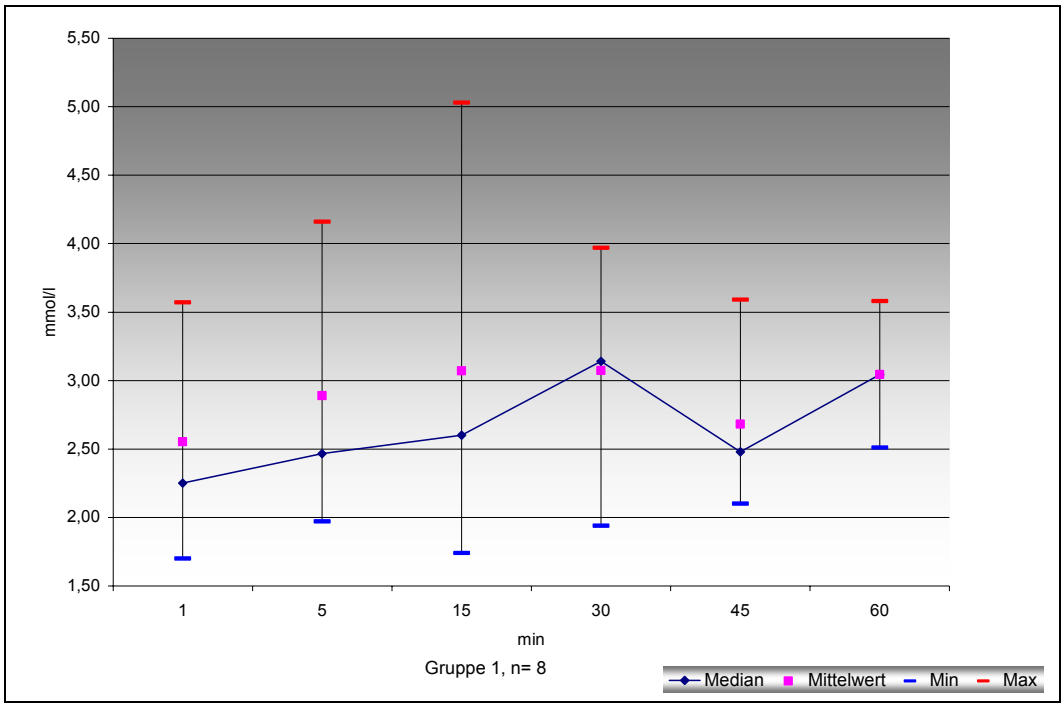


Abb. 3-6: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumkaliums in [mmol/L] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

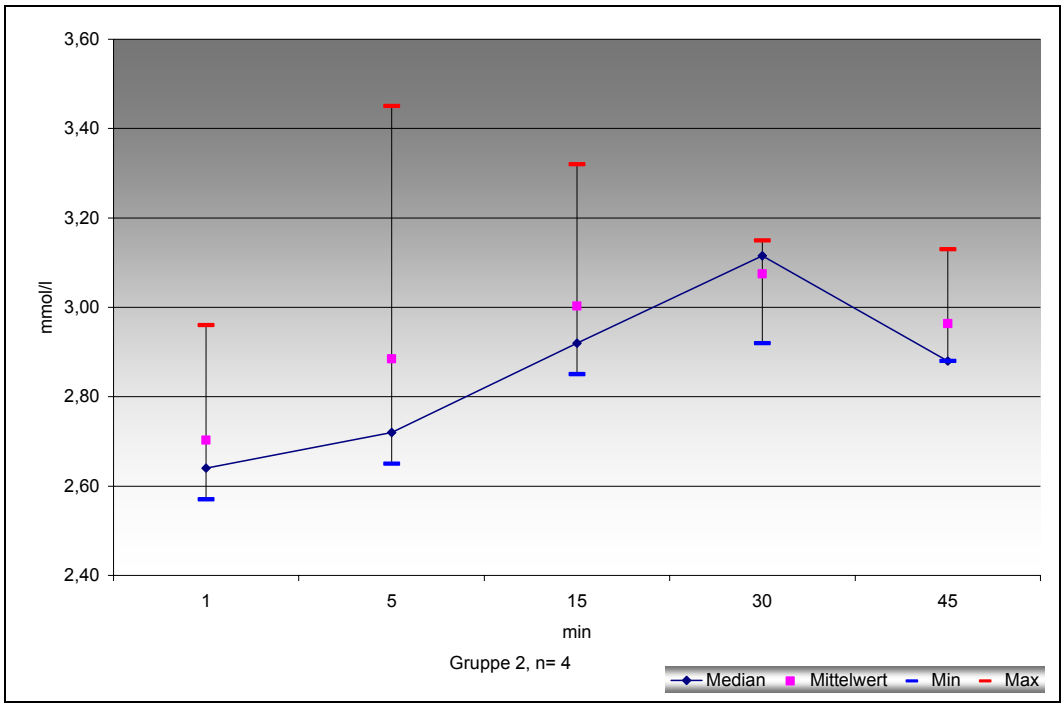


Abb. 3-7: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumkaliums in [mmol/L] in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

Der Calciumspiegel im Serum in Gruppe 1 lag zu Beginn bei 1,28 [mmol/l], nach 30 Minuten bei 1,30 [mmol/l], nach 45 Minuten bei 1,13 [mmol/l] und nach 60 Minuten bei 1,05 [mmol/]. In Gruppe 2 lag der Ausgangswert bei 1,43 [mmol/l], bei 1,47 [mmol/l] nach 30 Minuten und bei 1,40 [mmol/l] nach 45 Minuten.

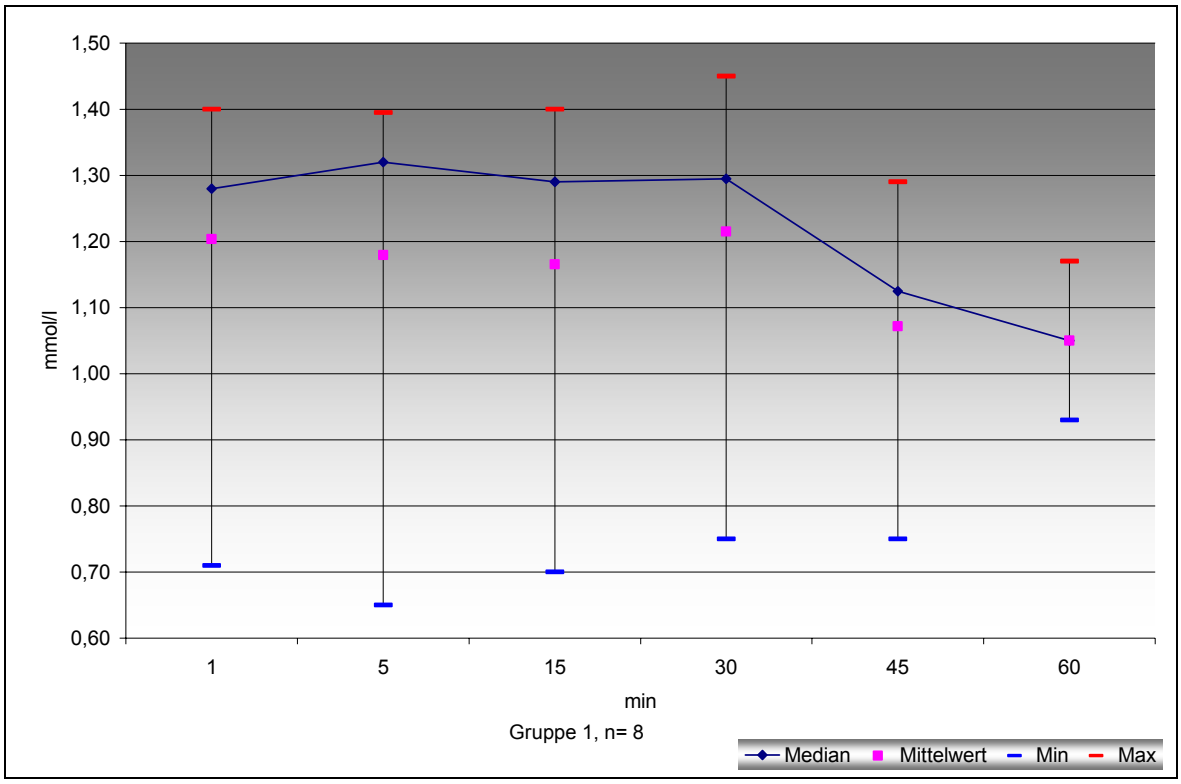


Abb. 3-8: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumcalciums in [mmol/L] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

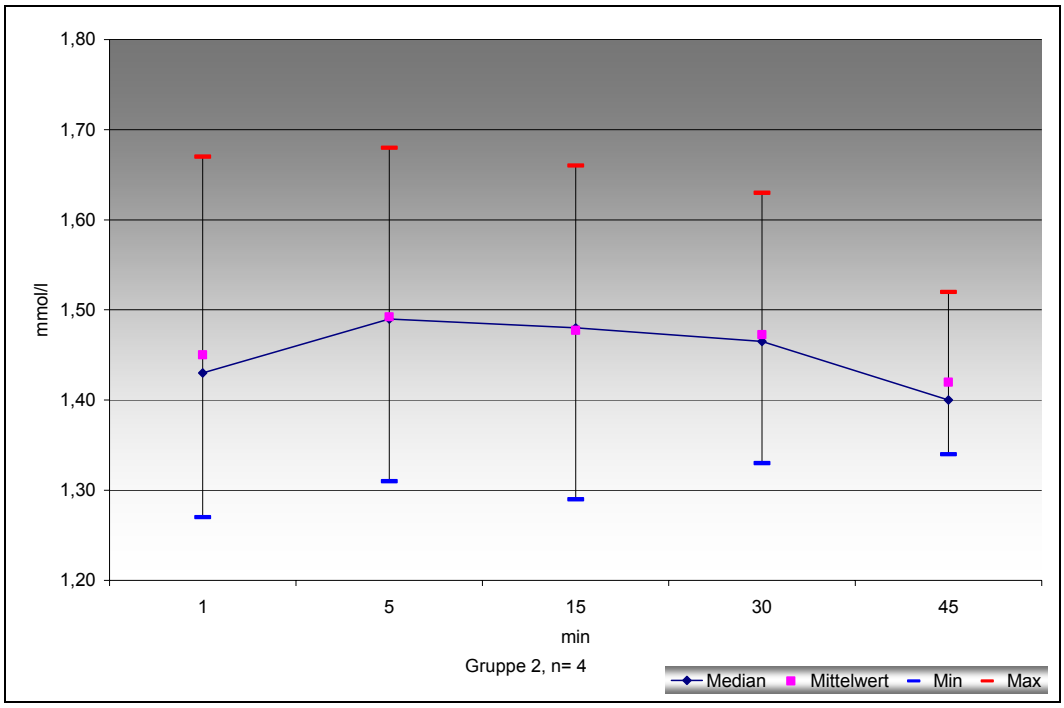


Abb. 3-9: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumcalciums in [mmol/L] in der in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

3.2.2. Blutgase und Säure-Basen-Status

Die Parameter für Blutgase und Blut-pH lagen in beiden Versuchsgruppen unter der gesamten Perfusion innerhalb des Normalbereichs.

3.2.3. Blut-Glukose

Die Glukose lag in beiden Gruppen bis Minute 30 annähernd konstant im normalen bis niedrig normalen Bereich. In Gruppe 1 lag der Ausgangswert bei 44 [mg/dl], nach 30 Minuten lag dieser Wert bei 40 [mg/dl], nach 45 Minuten bei 24 [mg/dl] und nach 60 Minuten bei 13,5 [mg/dl]. In der Kontrollgruppe lag die Ausgangsglukose im Serum bei 53,5 [mg/dl], nach 30 Minuten lag dieser Wert bei 45 [mg/dl] und nach 45 Minuten bei 36 [mg/dl]. Während der gesamten Perfusion wurde keine Glukose substituiert.

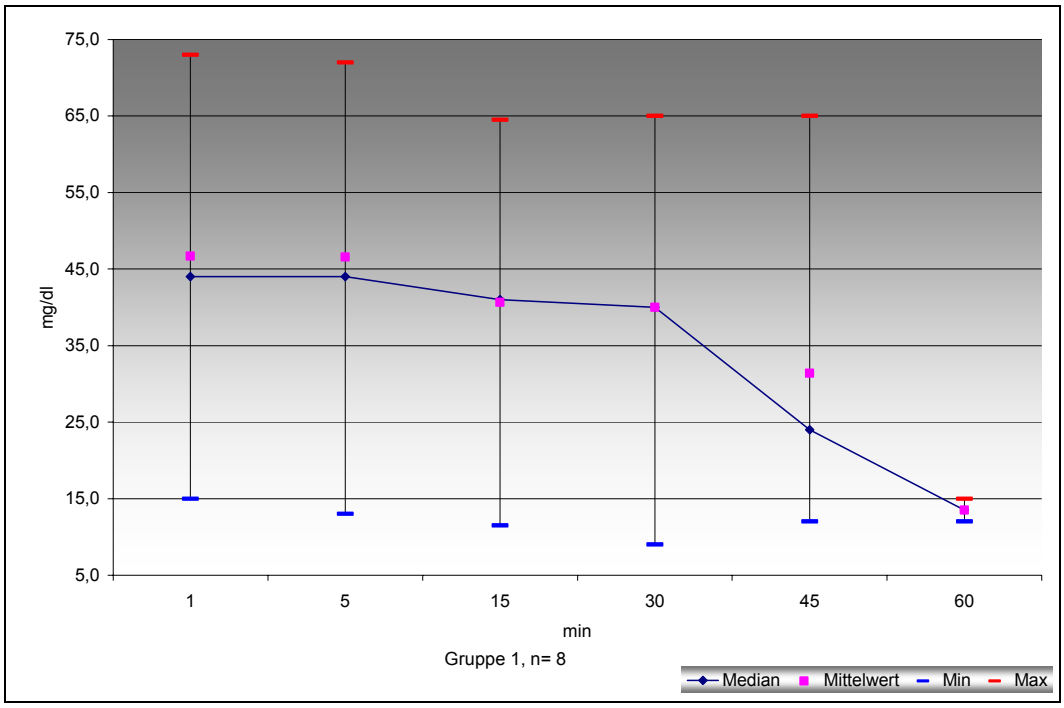


Abb. 3-10: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes der Serumglukose in [mg/dl] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

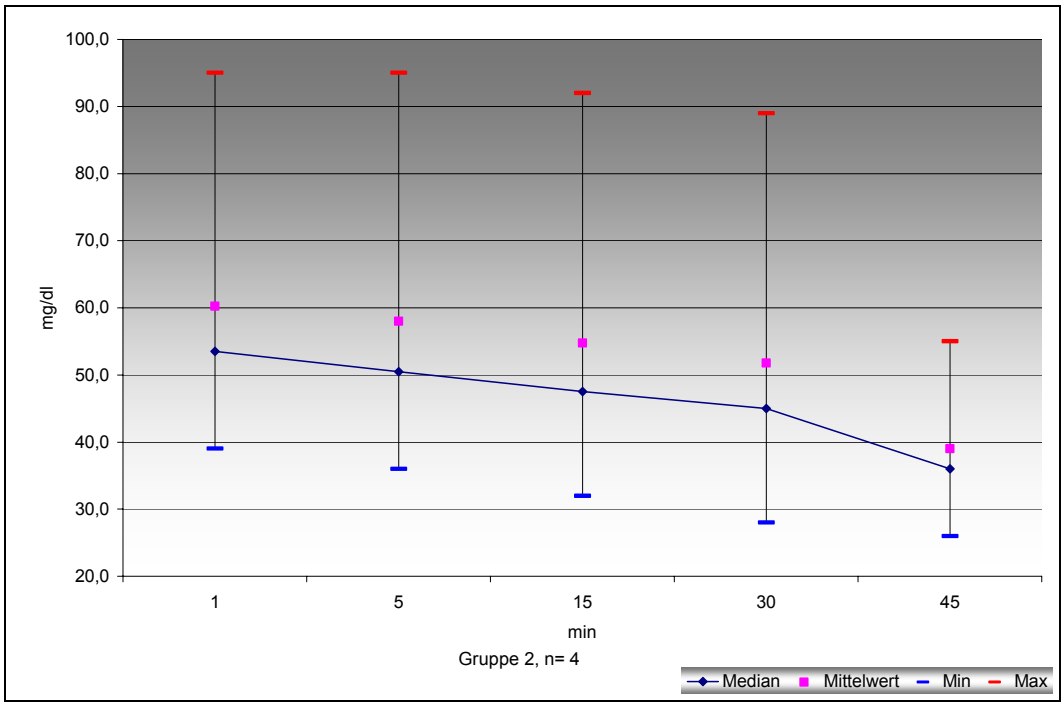


Abb. 3-11: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes der Serumglukose in [mg/dl] in der in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

3.2.4. Nieren und Retentionswerte

Das Monitoring des Kreatininspiegels und der Retentionswerte im Serum dienten ebenfalls der Funktionsprüfung und Überwachung des ex-vivo Perfusionssystems mit dem für die Bluthomöostase maßgeblich verantwortlichen Organ Niere.

In Gruppe 1 sowie in Gruppe 2 waren die Konzentration von Harnstoff, Kreatinin und Harnsäure im Serum über den Untersuchungszeitraum stabil und weitgehend vergleichbar.

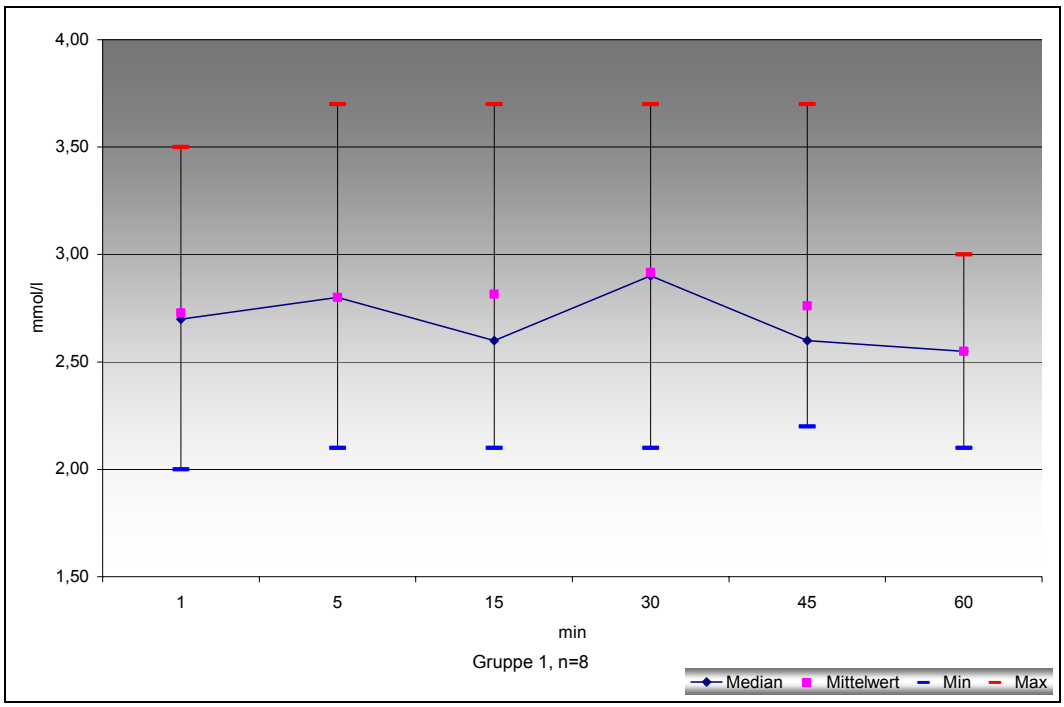


Abb. 3-12: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumharnstoffs in [mmol/L] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

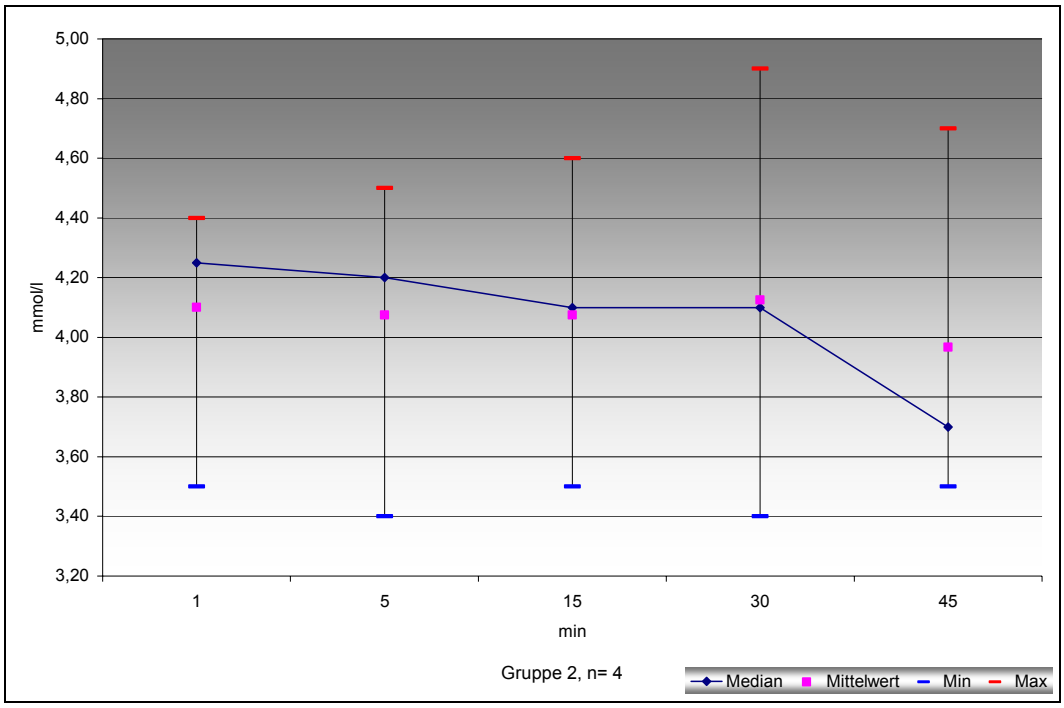


Abb. 3-13: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumharnstoffs in [mmol/L] in der in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

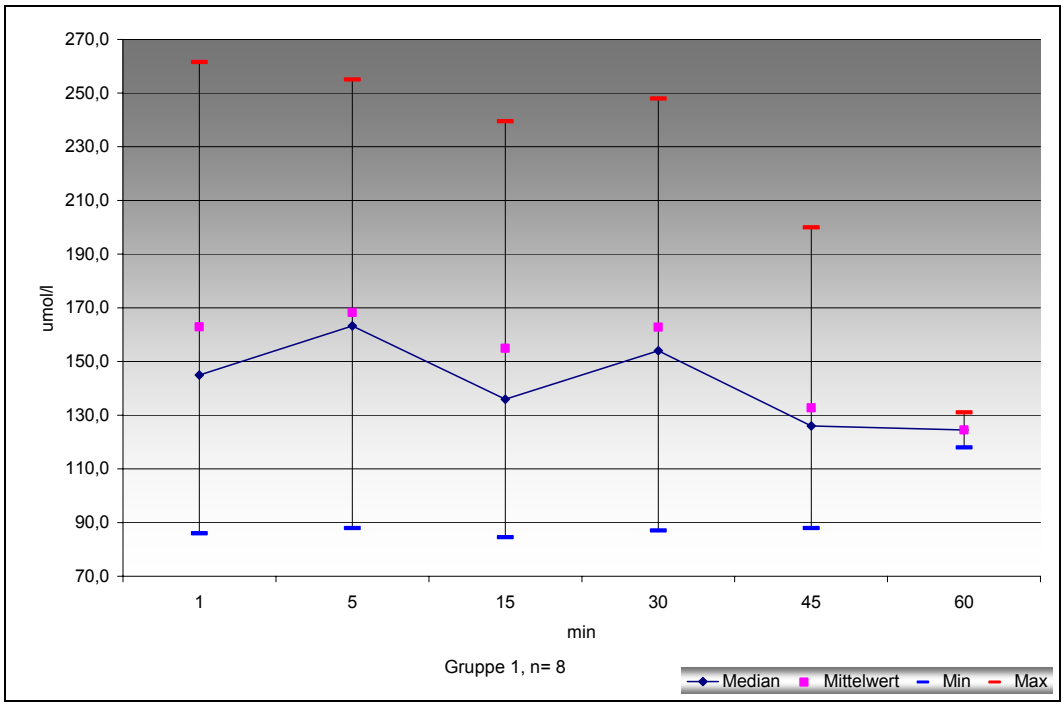


Abb. 3-14: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes der Serumharnsäure in [umol/L] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

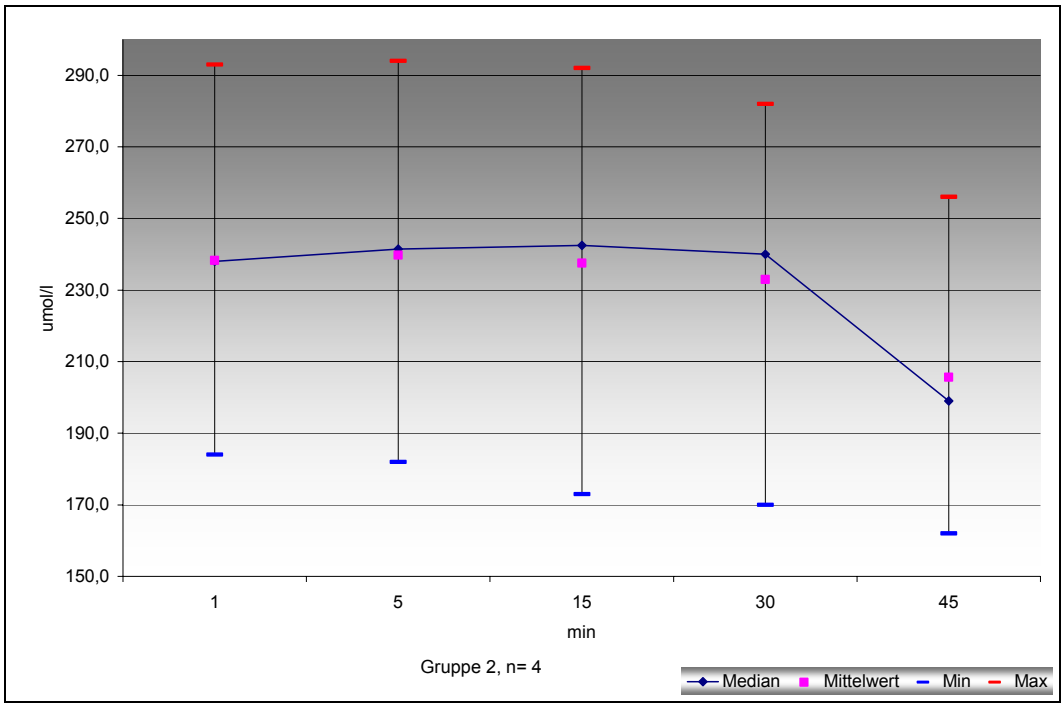


Abb. 3-15: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes der Serumharnsäure in [umol/L] in der in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

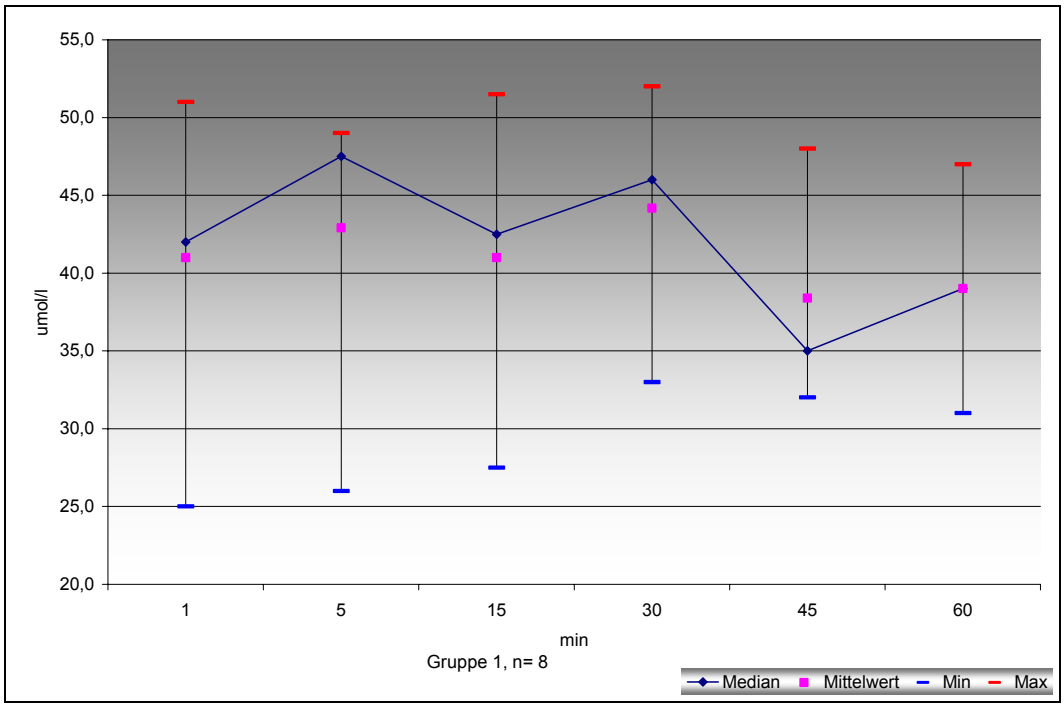


Abb. 3-16: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumkreatinins in [umol/L] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

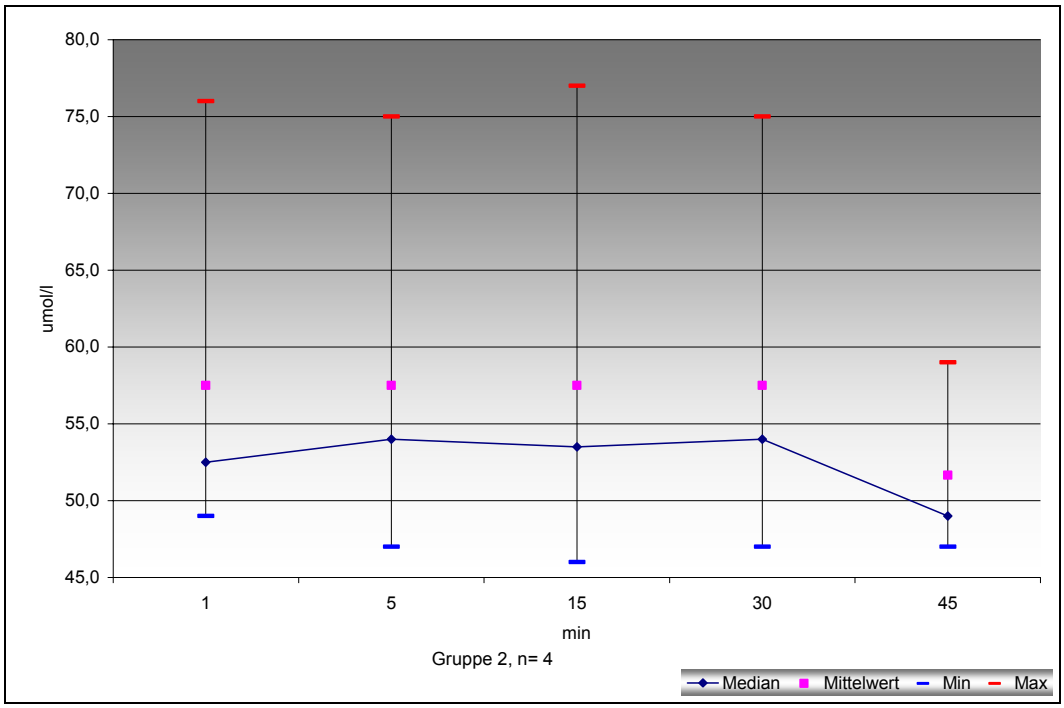


Abb. 3-17: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des Serumkreatinins in [umol/L] in der in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

3.2.5. Laktat

Der Laktatspiegel und dessen relativer Anstieg diente der Überwachung und Dokumentation einer eventuell ablaufenden ischämischen Schädigung der Nieren.

Analog zum Glucoseabfall im Perfusat erfolgte ein Anstieg der arteriellen und venösen Laktatwerte ab der 15. Minute in beiden Gruppen. Der relative Anstieg der arteriellen und venösen Laktatwerte in der Kontrollgruppe ab Minute 30 und 45 ist auffallend steiler als in Gruppe 1.

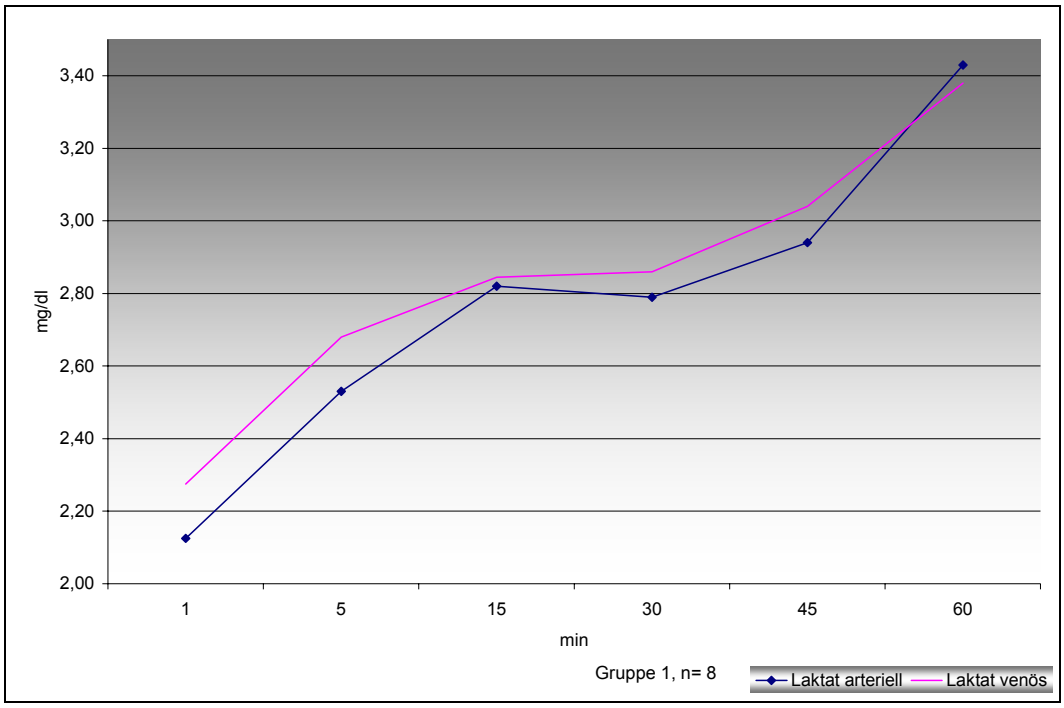


Abb. 3-18: Grafische Gegenüberstellung der Mediane der arteriellen und venösen Laktatwerte in [mg/dl] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

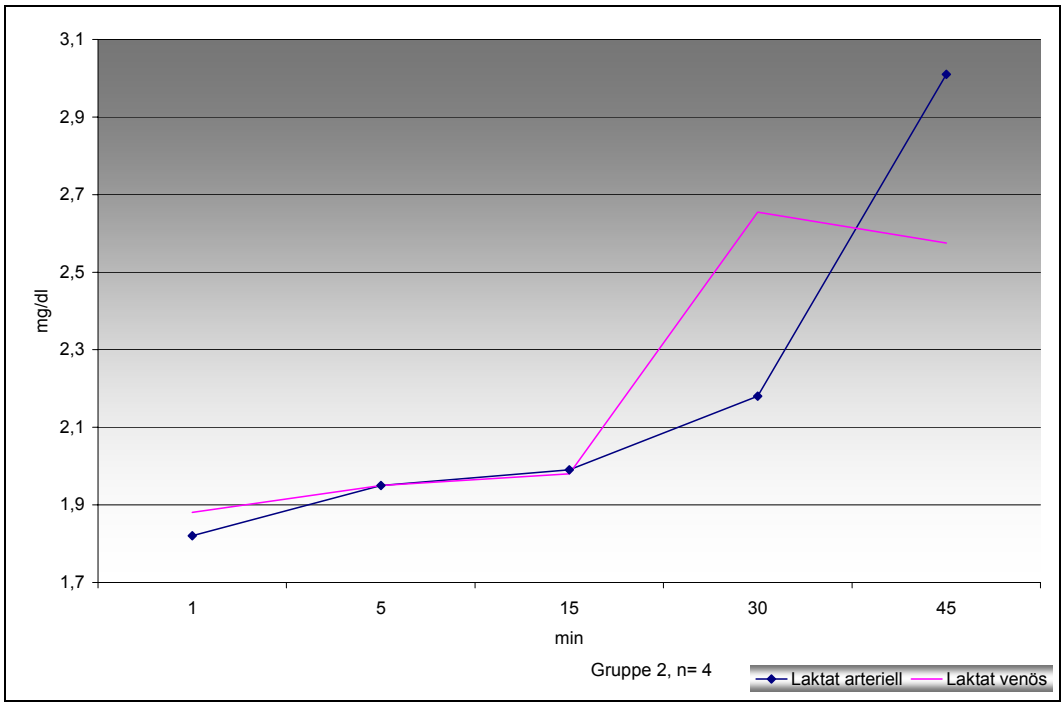


Abb. 3-19: Grafische Gegenüberstellung der Mediane der arteriellen und venösen Laktatwerte in [mg/dl] in der in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

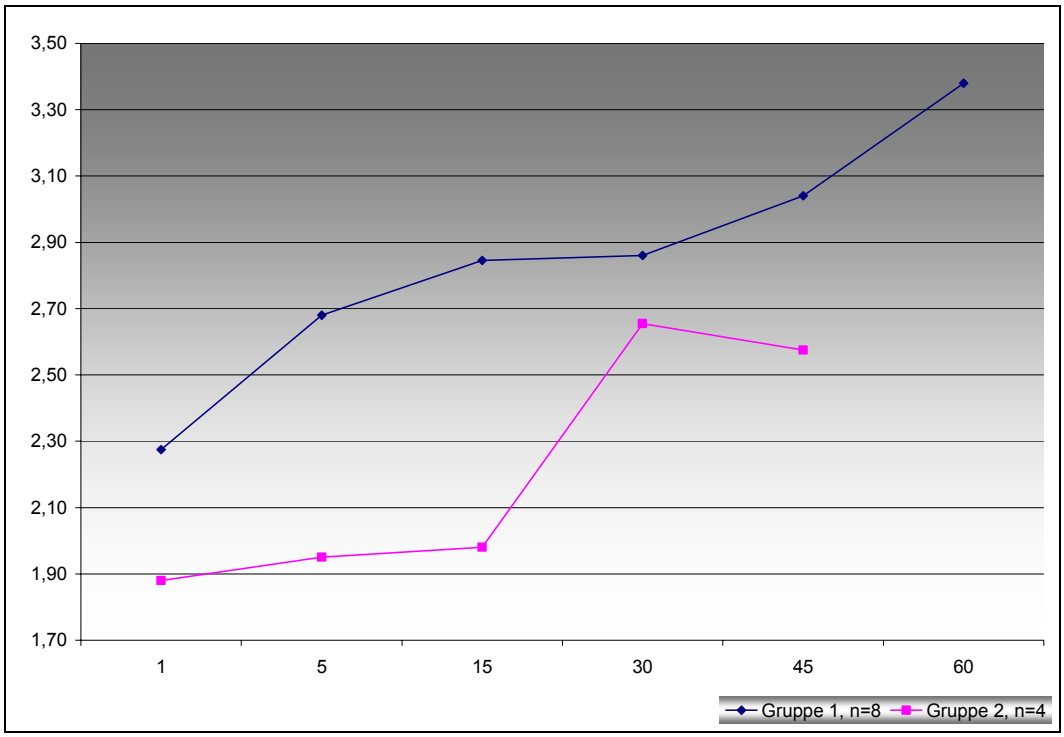


Abb. 3-20: Grafische Gegenüberstellung der Mediane der venösen Laktatwerte in [mg/dl] der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

3.2.6. TNF-alpha

Stellvertretend für die wichtigsten Entzündungsmediatoren wurde TNF-alpha (TNF-α) im Serum bestimmt. Die Serumspiegel von TNF-α stiegen unter der Perfusion in beiden Gruppen an. In der Kontrollgruppe stiegen diese Werte jedoch auf ein sehr viel höheres Niveau und viel steiler als in der Gruppe 1 an. In der Kontrolle erhöhte sich TNF-α von 426 pg/ml auf 710 pg/ml nach 15 Minuten Perfusion. Die Gruppe 1 verzeichnet dagegen im selben Zeitraum nur einen Anstieg von 111 pg/ml auf 423 pg/ml.

Über den Zeitraum von 15 Minuten hinaus stehen nicht mehr beide TNF-α -Kurven zur Verfügung. Die TNF-α -Spiegel in der Kontrollgruppe waren bereits nach 15 Minuten weit außerhalb des Messbereiches des verwendeten Testkits und konnte auf Grund von minimalen Probenvolumina nicht weiter verdünnt werden, um die Werte dennoch mit dem Testkit erfassen zu können. Für die Gruppe 1 stehen die TNF-α Werte für den gesamten Versuchszeitraum zur Verfügung. Diese lagen nach 30 Minuten Perfusion bei 1172 pg/ml, nach 45 bei 1575 pg/ml und nach 60 Minuten bei 2681 pg/ml. Bereits kurz nach Versuchsbeginn lagen die Werte der Gruppe 1 unter dem Level der Kontrollgruppe.

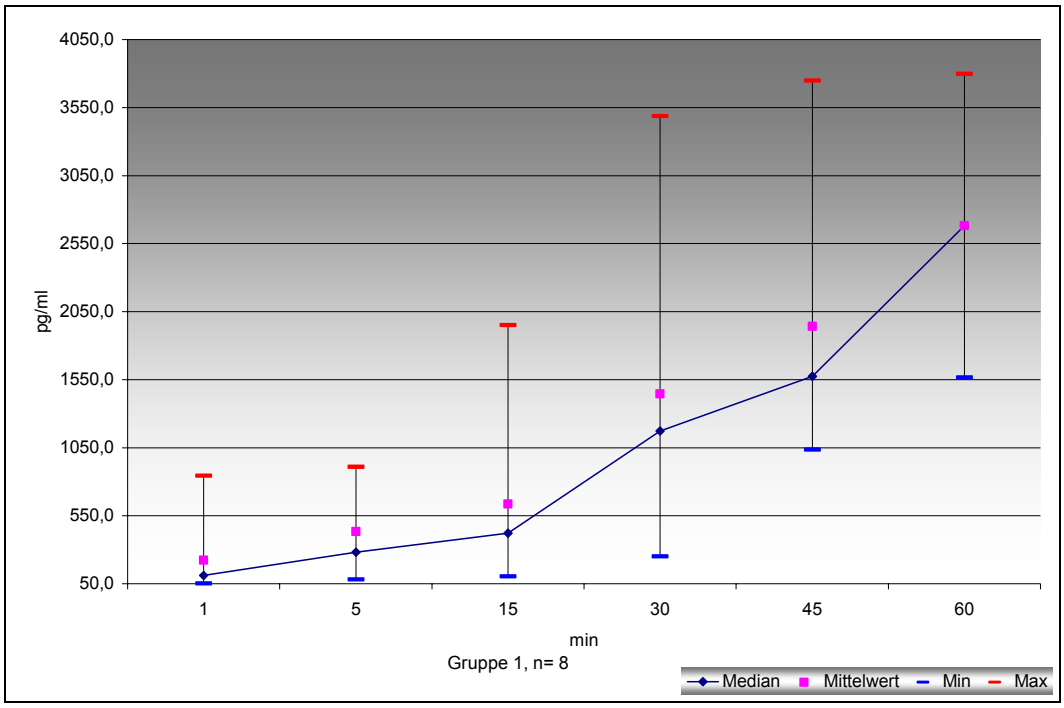


Abb. 3-21: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des TNF-α-Spiegels im Serum in [pg/ml] in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

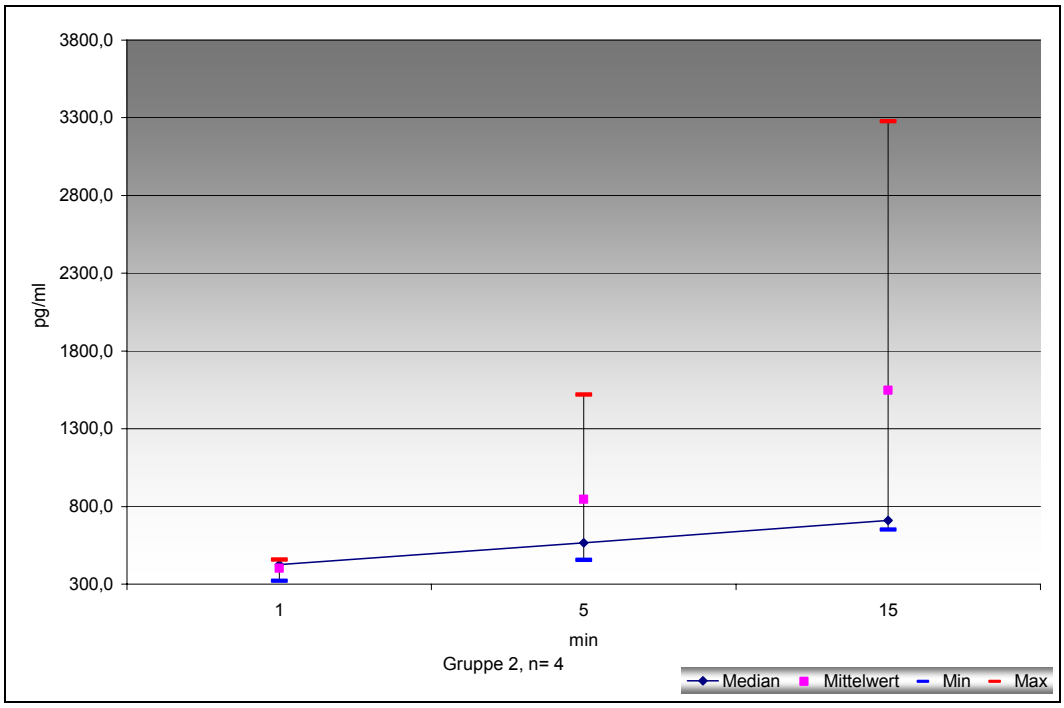


Abb. 3-22: Grafische Darstellung des Median, des Mittel-, des Min- und Maximalwertes des TNF-α-Spiegels im Serum in [pg/ml] in der in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut.

3.3. Urin

Der Urin konnte aufgrund zu geringer Mengen (Gruppe 1) oder gänzlich ausgebliebener Urinproduktion (Gruppe 2) nicht oder nur unvollständig laborchemisch analysiert werden. Somit konnte auch die endogene Kreatininclearance nicht errechnet werden.
In Gruppe 1 produzierten 6 von 8 Nieren Urin, mit einem Beginn der Urinproduktion nach 5 bis 15 Minuten (im Durchschnitt nach 9,6 Minuten). Die produzierte Gesamtmenge des Urins lag nach max. 60 Minuten Perfusion bei 9 ml. In der Kontrollgruppe produzierte keine der reperfundierten Nieren Urin.
Auf Grund minimaler Urinvolumina konnte die endogene Kreatininclearance in beiden Gruppen nicht bestimmt werden. Daraus folgend konnte auch die glomeruläre Filtrationsrate nicht errechnet werden.

3.4. Durchflusszytometrie

Bei zwei Organen (N5 und N7) aus der Kontrollgruppe (Gruppe 2) wurden exemplarisch für die nichttransgenen Nieren unter der Perfusion zu den Zeitpunkten 0, 1, 5, 10, 15. 30 und 45 Minuten Blutproben gezogen und darin durchflusszytometrisch die Lymphozyten sowie deren Aktivierung bestimmt.

Tab. 3-3: Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten für das Organ N5 aus der Kontrollgruppe (Gruppe 2).

N5 (Angaben in %)	0	1	5	10	15	30	45	exp. Range min.	exp. Range max.
Reinheitsgrad d. Lymphozytengates	100	99	100	96	99	100	99	85	100
B-Zellen (CD19+ CD3-)	26	22	24	25	25	24	24	3	12
Helfer-Zellen (CD3+ CD4+)	44	48	39	22	39	40	40	35	65
Suppressor-Zellen (CD3+ CD8+)	28	25	26	27	24	25	25	17	35
NK-Zellen (CD3- CD16CD56+)	8,2	6,9	7,6	6,9	8,7	6,9	7,7	5	20
Zytotoxische T-Zellen (CD3+ CD16CD56+)	14	10	10	8,3	12	6,5	8,8	0	5
aktiv. T-Zellen (CD3+ HLA-DR+)	9,7	9,6	12	11	12	7,6	9,1	0	5
aktiv. T-Zellen (CD3+DR+/CD3+)	14	14	17	16	18	11	13	6	15
T-Zellen gemittelt (CD3+)	66	68	66	61	66	69	68	63	86
Ratio: CD4/CD8	1,6	1,9	1,5	0,8	1,6	1,6	1,6	1	2,3
Summe: T+B+NK-Zellen	100	98	98	93	100	100	100		

Tab. 3-4: Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten für das Organ N7 aus der Kontrollgruppe (Gruppe 2).

N7 (Angaben in %)	0	1	5	10	15	30		exp. Range min.	exp. Range max.
Reinheitsgrad d. Lymphozytengates	99	99	99	99	99	95		85	100
B-Zellen (CD19+ CD3-)	5	9,2	9,9	7,8	3,1	9,7		3	12
Helfer-Zellen (CD3+ CD4+)	70	33	59	60	55	2,1		35	65
Suppressor-Zellen (CD3+ CD8+)	20	22	21	11	21	20		17	35
NK-Zellen (CD3- CD16CD56+)	2,8	7,8	8,3	7,1	8,4	2,7		5	20
Zytotoxische T-Zellen (CD3+ CD16CD56+)	14	12	13	11	11	5,3		0	5
aktiv. T-Zellen (CD3+ HLA-DR+)	6,1	6,8	5,6	5,8	6,9	59		0	5
aktiv. T-Zellen (CD3+DR+/CD3+)	7,5	8,3	6,8	7,1	8,2	71		6	15
T-Zellen gemittelt (CD3+)	87	74	81	73	70	83		63	86
Ratio: CD4/CD8	3,4	1,5	2,8	5,5	2,7	0,1		1	2,3
Summe: T+B+NK-Zellen	95	91	99	88	82	96			

3.5. Morphologische Beurteilung

3.5.1. Makroskopischer Aspekt

Unmittelbar nach erfolgter Reperfusion der Organe im artifiziellen Kreislauf erfolgte eine erste makroskopisch-morphologische Beurteilung. Direkt nach Beginn der Hämoperfusion hatten die Spendernieren eine homogene hellrote Farbe. Innerhalb von 10 bis 45 Minuten zeigte sich eine dunkelrote und zunehmend fleckige Verfärbung. Die Organoberflächen erschienen spiegelnd und das Volumen der Nieren nahm subjektiv zu. Gegen Ende der ex-vivo Perfusionsphase waren einzelne oberflächliche Hämorrhagien erkennbar. Die Ausprägung dieser Befunde war von Niere zu Niere verschieden. Die o.g. Veränderungen traten in der Kontrollgruppe durchschnittlich 22 Minuten früher auf als in Gruppe 1.

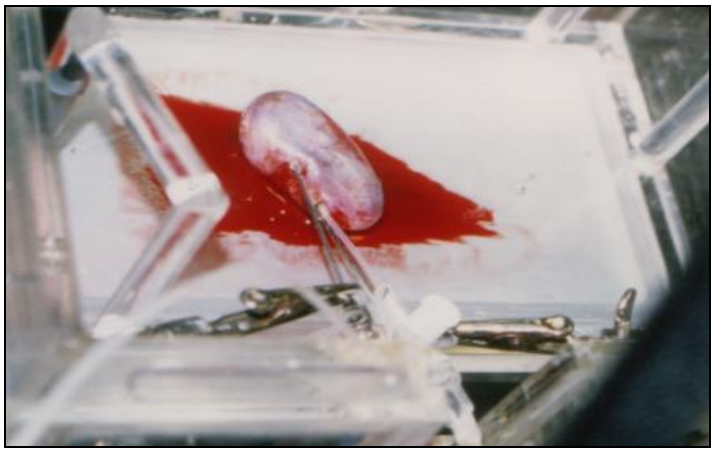


Abb. 3-23: Exemplarische Darstellung einer Niere der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) in der Perfusionsvorrichtung während der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut. Das Organ imponiert hyperämisch, die Kapsel prall, die Nierenoberfläche hell bis dunkelrot.

Unmittelbar nach der Perfusion wurden die Nieren mittels eines Längsschnittes durch das ganze Organ aufgeschnitten, um makroskopisch beurteilt werden zu können. Es zeigten sich dabei die für die hyperakute Abstoßung typischen Zeichen wie Hämorrhagien, interstitielle Einblutungen und Thromben in kleineren Gefäßen. Zwischen den beiden Versuchsgruppen konnte am Ende der Perfusion kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



Abb. 3-24: Hyperakut abgestoßene Niere der Kontrollgruppe (Gruppe 2) nach 30 Minuten ex-vivo-Perfusion mit Humanblut. Deutlich sichtbar sind hier die hämorrhagisch infarzierten Bezirke der Nierenrinde, das Organ erscheint ödematös aufgequollen.

3.5.2. Mikroskopie, Histologie und Immunhistologie

Morphologisch imponieren einige Präparate der Gruppe 1 ischämisch geschädigt. Es finden sich jedoch keine deutlichen Hinweise auf Hämorrhagien oder Thrombosen größerer Gefäße, wie sie zum Beispiel für die hyperakute Abstoßungsreaktion typisch wären.

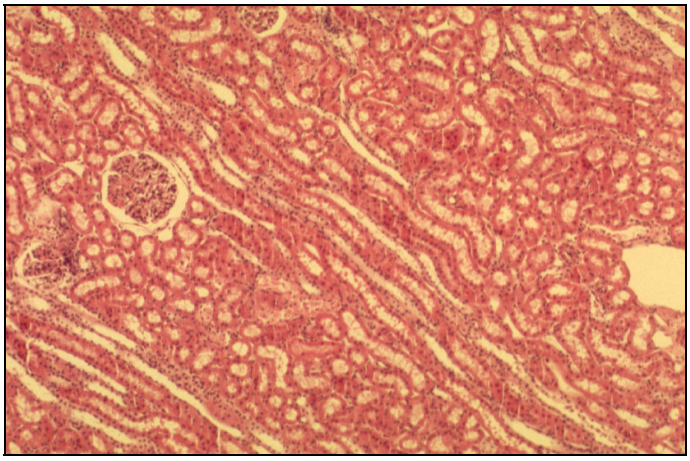


Abb. 3-25: Histologischer Schnitt durch die Niere eines Tieres der Gruppe der hDAF-transgenen Kaninchen (Gruppe 1). Das Organ imponiert morphologisch weitgehend intakt, es gibt hier keine Anzeichen für Hämorrhagien oder Mikrothrombosen. HE-Färbung (50x).

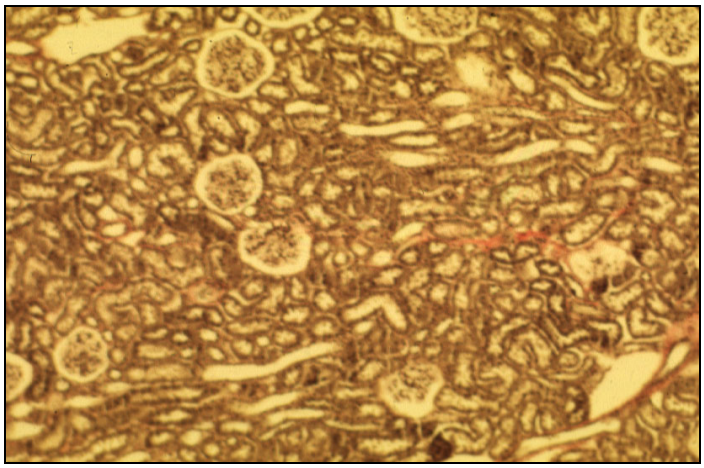


Abb. 3-26: Histologischer Schnitt durch die Niere eines anderen Tieres der Gruppe der hDAF-transgenen Kaninchen (Gruppe 1). Auch hier sind multiple morphologisch intakte Glomeruli, Tubuli und Hehnle-Schleifen auch nach der Perfusion mit Humanblut erkennbar. PAS-Färbung (50x).

In Gruppe 1 ließ sich auch noch nach der Perfusionsphase immunhistochemisch eine hDAF-Expression vor allem in den Glomeruli nachweisen.
Bei der immunhistologischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass auf verschiedenen tierischen Geweben der Gruppe 1 hDAF unterschiedlich stark exprimiert wurde. Auf Herz und Lunge wurde hDAF nur schwach bis gar nicht exprimiert. Bei der semiquantitativen Erfassung der hDAF-Expression nach Hämoperfusion zeigten die Nieren eine interindividuell von Tier zu Tier verschieden starke hDAF-Expression (vgl. Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Expressionsmuster von hDAF in der Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1) nach der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut (semiquantitativ, Spots pro Gesichtsfeld).

Organ	**Glomeruli**	**Tubuli**	**Interstitium**
K1	++	+	++
K3	+	+	++
K5	(+)	-	
K7	+	-	++
K10	++	+	
K12	(+)	-	
K14	+++	+	
K15	+	-	
Legende	**hDAF post perfus.**		
-	Keine Expression		
(+)	Schwache Expression		
+	Expression		
++	Starke Expression		
+++	Sehr starke Expression		

Die Gewebe der Kontrollgruppe (Gruppe 2) waren durchweg hDAF-negativ. Hier wurden histologische Veränderungen wie Thrombosierungen und Verschlüsse von größeren Gefäßen im Sinne einer hyperakuten Abstoßung gesehen.

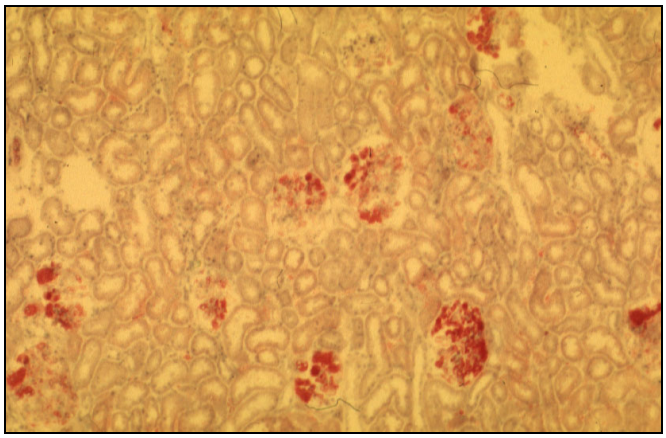


Abb. 3-27: Auf diesem immunhistologischen Schnitt sind nach der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut hDAF-positive Glomeruli in der Niere des Tieres K15, Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1), erkennbar. Immunhistologie (Anti-hDAF, 50x).

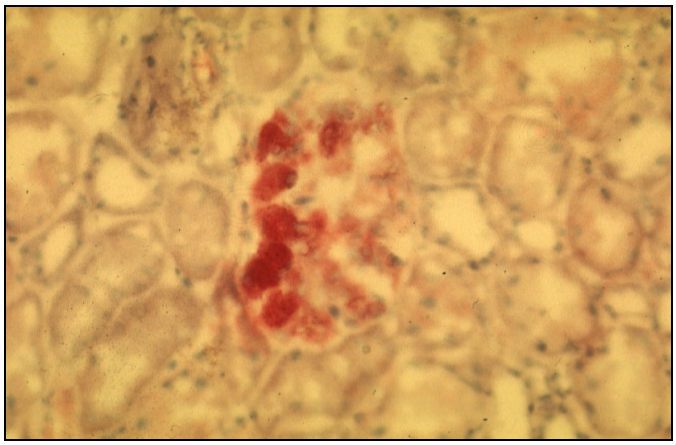


Abb. 3-28: In diesem immunhistologischen Schnitt der Niere des Tieres K13, Gruppe der hDAF-transgenen Kaninchen (Gruppe 1), sind nach der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut hDAF-positive Glomeruli, hier rot gefärbt, erkennbar. Immunhistologie (Anti-hDAF, 300x).

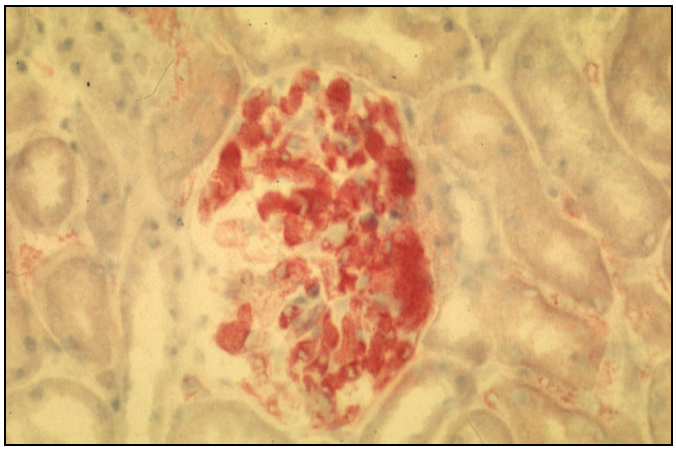


Abb. 3-29: Auch nach der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut sind in der Immunhistologie der Niere des Tieres K15, Gruppe der hDAF-transgenen Tiere (Gruppe 1), hDAF-positive Glomeruli, hier rot gefärbt, erkennbar. Immunhistologie (Anti-hDAF, 300x).

4. Diskussion

4.1. Fragestellung

Bei dieser Arbeit sollte erstmalig eine neuartige hDAF-transgene Kaninchenlinie mit einer dazu geeigneten Vorrichtung mit Humanblut hämoperfundiert werden. Ziel der Untersuchung war die Überprüfung des transgenen Konstrukts unter funktionellen und morphologischen Gesichtspunkten. Zum Vergleich dienten genetisch unveränderte Kaninchennieren, welche in gleicher Art und Weise untersucht wurden.

Die Funktion eines diskordanten Xenotranspantats und die Funktionalität eines Transgens können entweder durch die Reimplantation in einen geeigneten Empfänger (*in-situ*-Perfusion) oder aber durch die Reperfusion in einem künstlichen Kreislauf (*ex-vivo*-Perfusion) untersucht werden.

Die humane diskordante Xenotransplantation stellt ein Sonderfall dar. Unter den heutigen Anforderungen und Qualitätsstandards der Nierenersatztherapie können nicht mit hinreichender Sicherheit tierische Organe auf Patienten transplantiert werden. Als Alternativen dazu stehen die diskordante Xenotransplantation auf einen nichthumanen Primaten Empfänger (z.B. Pavian oder Schimpanse) oder die diskordante *ex-vivo*-Perfusion mit Humanblut zur Verfügung.

Soll die Funktionalität und Stabilität eines neuentwickelten transgenen Konstrukts, welches zur Verwendung in der humanen Xenotransplantation vorgesehen ist, untersucht werden, eignet sich die *ex-vivo*-Perfusion in besonderem Maße: Sie ist eine ungefährliche und sichere Methode, mit der unter kontrollierten Bedingungen in einem annähernd physiologischen Milieu solche Fragestellungen untersucht werden können. Zudem ist sie eine Methode, die tierische Ressourcen schont und spart – ein besonders unter ethischen und juristischen aber auch finanziellen Gesichtspunkten sehr wichtiger Aspekt.

4.2. Methodik

4.2.1. Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Art von genetischem Konstrukt, das YAC E12 [10, 11] verwendet, um die DNA-Sequenzen für eine Reihe humaner Komplementregulatorproteine genomisch zu integrieren und eine entsprechende endotheliale Expression der RCA in der Versuchstierspezies zu erreichen. Dazu wurden mehrere Kopien dieser YAC-DNA-Konstrukte (vgl. Abb. 2-1) in die Embryonen injiziert. Bei der Analyse der integrierten Gene zeigte sich nur eine partielle Integration einer YAC-Kopie. Es wurden die Gene für hDAF und hCR1 integriert. Die ursprünglich beabsichtigte komplette Integration des DNA-Konstrukts mit allen enthaltenen Genen membranständiger humaner Komplementregulatorproteine (MCP, CR1, CR2, DAF) und dem Gen für das lösliche Serumprotein C4bp mit komplementregulatorischer Wirkung gelang nicht.
Auf Grund der konventionellen züchterischen Methoden kam es zu interindividuellen starken Schwankungen in der Genexpression und Transgenexprimierung in den Geweben. Auch zeigte sich eine starke Schwankungsbreite der intraindividuellen hDAF-Exprimierung in den Geweben. Somit muss letztlich von einem Expressionsmosaik ausgegangen werden.
Als Versuchstierspezies wurden Kaninchen gewählt, weil diese aus folgenden Gründen besonders geeignet erschienen:

- Gute Verfügbarkeit
- Kurze Generationszeit
- Leichte Handhabung in Aufzucht und Pflege
- Hinreichende Erfahrung in der Erzeugung transgener Tiere [11]
- Gut erlern- und beherrschbare OP-Technik
- Organe zur ex-vivo Perfusion mit Humanblut prinzipiell geeignet [26, 27, 59]

Zudem konzentrierten sich die bisherigen Bemühungen der Xenotransplantationsforchung aus praktischen Gründen hauptsächlich auf das Hausschwein [15], nichts desto trotz blieb die evolutionäre Einordnung anderer Spezies weiterhin von großer Bedeutung, da die hyperakute Abstoßung unabsehbar auch innerhalb der gleichen zoologischen Familie auftreten kann [23].

Als Nachteile für die Verwendung von Kaninchen zur Untersuchung von Hindernissen der humanen Xenotransplantation erschienen:

- Geringe Organgröße und Gewicht
- Abweichende physiologische Normwerte
- Kaninchen kommen für die definitive Xenotransplantation auf den Menschen nicht in Betracht.

4.2.2. Herstellung transgener Tiere

Die Mikroinjektion von DNA-Konstrukten in die Vorkerne von Spendertierzygoten (Kaninchen, Schweine etc.) war bisher das einzige Verfahren zur Erzeugung transgener Tiere. Dieses Verfahren ist allerdings mit einer Erfolgsquote von 1 – 2% transgenen Tieren nur wenig effizient. Die Integration des Fremdgens erfolgt rein zufällig und die Expression des Transgens wird oft durch Positionseffekte nachteilig beeinflusst [42, 43].

Die hyperakute Abstoßungsreaktion kann mit hinreichender Sicherheit überwunden werden, wenn eine quantitativ ausreichend hohe transgene Expression humaner Komplementregulatoren (hDAF u.a.) im Spendertier erreicht wird [17].

Als alternatives Verfahren zur Erzeugung transgener Tiere könnte die DNA-Mikroinjektion durch somatische Kerntransfers bald ersetzt werden. Mithilfe von somatischen Kerntransfers ist es nun möglich, gezielt Gene hinzuzufügen oder auszuschalten. Beim Schwein konnte gezeigt werden, dass es dadurch möglich ist, beide Allele des Gens, welches für die Gal(α1,3)Gal-Epitope auf den Zelloberflächen kodiert, auszuschalten, ohne dass die Gesundheit der Tiere beeinträchtigt ist. Das erste so genannte „Gal(α1,3)Gal-knock-out-Schwein“ wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Niemann, Hannover gezüchtet und wurde im März 2003 geboren. Für die klinische Realisation der Xenotransplantation jedoch ist wahrscheinlich die Alteration mehrerer immunologisch bedeutender Genloci notwendig. Mit der Verfügbarkeit von funktionsfähigen Kerntransfers ist damit eine wesentliche Voraussetzung geschaffen, polytransgene Tiere zu erzeugen [44].

Für diese Untersuchung stand nur eine limitierte Anzahl von transgenen Tieren zur Verfügung, da es sich hier um eine neue, weltweit einzigartige hDAF-transgene Kaninchienlinie handelte, welche nicht kommerziell erhältlich ist und die auch nicht nachgezüchtet werden konnte. Die Möglichkeit zur Klonierung dieser Tiere bestand zum damaligen Zeitpunkt noch nicht.

4.2.3. Ex-vivo-Hämoperfusion

Mit Humanblut hämoperfundierte Kaninchennieren wurden in der Vergangenheit zur Untersuchung der HAR und der Xenotransplantatabstoßung eingesetzt. Jørgensen et al. konnte zeigen, dass die Methode der ex-vivo Hämoperfusion von Kaninchennieren bei 37°C geeignet ist, die (hyperakute) Abstoßungsreaktion von Kaninchennieren zu untersuchen [26]. Rossmann und Matousovic konnten in ihren Perfusionsversuchen zeigen, dass die ex-vivo-Perfusion von genetisch unveränderten Kannichennieren mit frischem Humanblut innerhalb von 15 bis 30 Minuten zur hyperakuten Abstoßungsreaktion führt [59].

Voraussetzung für die Vergleichbarkeit und klinische Relevanz eines solchen Modells ist die Reproduktion des Abstoßungsprozesses, der in der Kombination Schwein-auf-Primat bzw. Mensch stattfindet [29].

Die Technik der ex-vivo-Perfusion von Organen wurde weiterentwickelt und für die speziellen Bedürfnisse der Xenotransplantationsforschung adaptiert. Damit sind solche Systeme prinzipiell für die funktionelle Untersuchung von Xenotransplantaten geeignet [47].

Die isolierte Perfusion von Tierorganen mit Humanblut ist somit ein wichtiger Zwischenschritt vor der Transplantation xenogener Organe auf den Menschen.

Nur mithilfe der ex-vivo-Hämoperfusion war es überhaupt möglich diese neue hDAF-transgene Kaninchenlinie im diskordanten Tier-auf-Mensch-Modell zu untersuchen. Technisch betrachtet, müssen aber die Vorteile der eHPS gegenüber ihren systemeigenen Nachteilen genau abgewogen werden.

Die Vorteile des verwendeten Verfahrens sind die direkte Beobachtungsmöglichkeit des Organs, die gute Vergleichbarkeit bei standardisierten Untersuchungsbedingungen und der relativ geringe Ressourcenverbrauch.

Ein grundlegender Nachteil der ex-vivo Hämoperfusion ist die limitierte Biokompatibilität der künstlichen Oberflächen (Schläuche, Kunststoffe etc.) [37, 74], sowie die Problematik des Auftretens von Hämolysen. Aus diesem Grund wurden bei diesen Versuchen nur biokompatible oder inerte Materialien (PMNA, Silikonschläuche und chirurgischer Edelstahl) verwendet [67] und die maximale Perfusionsdauer wurde auf eine Stunde begrenzt. Das Ausmaß der Komplementaktivierung wurde in den eigenen Versuchen aus Gründen der verfügbaren Blutmenge nicht überprüft, wurde aber von einer anderen

Arbeitsgruppe, welche den gleichen Oxygenatortyp für die isolierte Perfusion von Lebern verwendet, untersucht [48, 56].

Die Akkumulation von Metaboliten wie etwa Laktat in einem halb geschlossenen System ist ein weiterer Störfaktor, der aber bei einer auf maximal 60 Minuten limitierten Perfusion, wie die Laktatwerte in beiden Gruppen zeigte, ebenfalls keine große Rolle spielt.

Die in dieser Studie verwendete Apparatur zur ex-vivo-Perfusion von Nieren mit humanem Blut wurde unter verschiedenen Gesichtspunkten für die Hämoperfusion von xenogenen Nieren eingesetzt [2, 67, 68, 69, 70] und ist daher zur Bearbeitung der Fragestellung prinzipiell geeignet.

Insgesamt bleibt jedoch festzuhalten, dass die rheologischen Eigenschaften in einem künstlichen Kreislauf (vgl. Hämodialyse, extrakorporale Herz-Lungen-Maschine, etc.) immer in gewissem Maße unphysiologisch sind und daher bei der Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen: in einem ex-vivo-Perfusionssystem sind funktionelle Abnormalitäten zu erwarten, die aber bei standardisierter Versuchsanordnung und festgelegter Experimentierdauer, eine Vergleichbarkeit der erhobenen Daten erlauben.

Die Fremdoberflächenaktivierung des Gerinnungssystems kann nur durch Vollheparinisierung oder durch Antikoagulation mit Hirudin[21] [61, 71] wirksam verhindert werden.

Für diese Versuche wurde vollheparinisiertes, frisches, ungepooltes Humanblut verwendet. Es wurde aus Volumengründen auf einen Hkt. von 30% titriert. Damit wurde eine geringfügige Änderung der physiologischen Eigenschaften des Perfusats in Kauf genommen. Die Perfusataufbereitung wurde für beide Untersuchungsgruppen in gleicher, standardisierter Weise vorgenommen. Eine Vergleichbarkeit der beiden Untersuchungsgruppen ist damit gewährleistet.

Es wurde mit einem mittleren systolischen Perfusionsdruck von 110 mmHg (Zieldruck) gearbeitet. Die Flussraten wurden automatisch angepasst. Der Perfusionsdruck entsprach damit annähernd dem physiologischen systolischen Blutdruck bei Kaninchen (vgl. Tab.2-3). Jørgensen et al. arbeiteten mit einem konstanten Perfusionsdruck von 80 mmHg, die kleinste Flussrate betrug hier 2 ml/min [26, 27, 28]. Die Arbeitsgruppe Rossmann und Matousovic unternahmen ihre Versuche mit einem Perfusionsdruck von 130 mmHg [59].

[21] Refludan® = Lepirudin

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Perfusionswiderstand und Blutfluss

Wie in der Literatur üblich wird der Perfusionswiderstand (analog dem Ohm'schen Gesetz: R=U/I) als Quotient aus (Druck/Fluss) berechnet [75]. Dieser ist ein bei der isolierten Organperfusion recht einfach zu bestimmender Parameter, der einen guten Aufschluss über die Organdurchblutung gibt.

Die durchgängig niedrigeren Werte in der Gruppe der transgenen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe veranschaulichen die bessere Organdurchblutung und damit die später in geringerem Ausmaß einsetzende hyperakute Abstoßungsreaktion der transgenen Kaninchennieren und damit den protektiven Effekt von hDAF. Viel auffälliger noch als die Zeitspanne bis zum Anstieg des Perfusionswiderstandes ist der Unterschied in der relativen Höhe des Perfusionswiderstandes beider Gruppen (vgl. Abb. 3-3) von der ersten Minute der Perfusion an.

75% der Xenotransplantate der Gruppe 1 (n=8) wurden innerhalb von 45 bis 60 Minuten hyperakut abgestoßen, während die Xenotransplantate der Kontrollgruppe bereits zwischen 30 und 45 Minuten nach Beginn der Hämoperfusion hyperakut abgestoßen wurden.

Die HAR manifestierte sich klinisch durch eine funktionelle Verschlechterung der Perfusionsverhältnisse mit einem relativ steilen Anstieg der Perfusionswiderstandswerte. Das zentrale immunologisch ausgelöste pathophysiologische Phänomen dabei war der Anstieg des Strömungswiderstandes mit vermindertem venösem Rückfluss, partieller Ischämie und generalisierter Stauung der Nieren. Die pathologisch-anatomische Korrelate dieser hämodynamischen Veränderungen waren die fleckigen, dunkelrot-lividen und hämorrhagischen Verfärbungen der Nieren, welche mit einer derben Konsistenz-, Volumen- und Gewichtszunahme einhergingen.

Bei den Untersuchungen, die Jørgensen et al. durchführten, wurden die mit Humanblut xenoperfundierten Nieren innerhalb von 30 Minuten abgestoßen, wohingegen die autoperfundierten Nieren auch nach 60 Minuten nicht „abgestoßen" wurden. Die Abstoßung wurde gemessen als Reduktion des Blutflusses bei konstantem Perfusionsdruck. Der Blutfluss in den xenoperfundierten Nieren zeigte einen anfänglichen Abfall, der sich in einen Anstieg nach 1 bis 3 Minuten umkehrte und nach 2,5 bis 8 Minuten irreversibel auf $\leq$ 2 ml/min abfiel [26].

Rossmann und Matousovic konnten bei der Hämoperfusion von (genetisch unveränderten)

Kaninchennieren mit Humanblut ebenfalls eine anfängliche Abnahme des Blutflusses, gefolgt von einem intermediären Anstieg und einen terminalen irreversiblen Abfall des Blutflusses nach etwa 7 Minuten feststellen [59].
Der anfängliche Abfall, mit einem kurz darauf folgenden Anstieg und einem terminalen Abfall des Blutflusses wurde auch in den eigenen Versuchen beobachtet.
Die Autoregulation des Nieren-Blutflusses ist innerhalb der ersten Stunde der Reperfusion weitgehend intakt, danach wird eine Zunahme des Flusses auf Grund einer Herabsetzung des Gefäßtonus beschrieben [45]. Andererseits können in späteren Stadien der Reperfusion mögliche Widerstandserhöhungen infolge kapillärer Fettembolie auftreten [8]. Die begrenzte Versuchsdauer von max. 60 Minuten trägt diesen möglichen Fehlerquellen Rechnung, und schließt damit in hohem Maße Artefakte hierdurch aus.

4.3.2. Laborchemische Messwerte

Bei der Diskussion der Laborwerte ist darauf zu verweisen, dass Mensch und Kaninchen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können. Beide Spezies haben unterschiedliche Normalwerte z.B. für Laborwerte wie Serum-Elektrolyte, Hkt. etc. So kommt es, dass die gemessenen Werte durchaus außerhalb der für den Menschen geltenden Referenzbereiche liegen können. Dies trifft auch für andere Versuchstiere, insbesondere Schweine, aber auch Primaten, die in Modellen für die humane Xenotransplantation eingesetzt wurden, zu [23].
Ebenso sind etwaige Verdünnungseffekte durch die Flüssigkeitssubstitution zu beachten, die aber in beiden Gruppen in gleicher Weise und nur in sehr begrenztem (Volumen-) Umfang durchgeführt wurde. Unterschiede ergeben sich hier auch durch die unterschiedliche Dauer der Perfusion.
Die Überwachung und Dokumentation der laborchemischen Parameter diente sowohl der Funktionsprüfung, als auch zur Stabilitäts- und Verlaufskontrolle des ex-vivo Perfusionssystems. Die Verläufe von Natrium, Kalium, Calcium, Laktat und der Blutglukose sowie der Blutgase und pH-Werte waren in beiden Gruppen ähnlich. Unter der gesamten Perfusion konnte in beiden Versuchsgruppen ein weitgehend physiologisches Milieu und damit vergleichbare Bedingungen gewährleistet werden.

4.3.3. Urinproduktion

Die Urinproduktion als das augenscheinlichste Merkmal der Nierenfunktion ist als einer der wichtigsten und sensibelsten Parameter zu deren Beurteilung anzusehen. Eine ischämische Schädigung, wie sie bei der HAR zu erwarten ist, führt infolge tubulärer Zellschwellung, interstitieller Ödembildung und Tubulusverlegung durch sequestriertes Epithel und Zelldetritus zu einer schnellen Reduktion bzw. zu einem verzögerten Beginn des Urinflusses oder zum totalen Sistieren der Urinproduktion. Die Beobachtung des Beginns der Urinproduktion kann somit gute Hinweise auf die Funktionsfähigkeit der Nieren und dem Auftreten einer HAR geben.

Während keine der Nieren der Kontrollgruppe die Urinproduktion unter der Reperfusion aufnahm, produzierten doch 6 transgene Nieren Urin. Die Gesamtmenge des produzierten Urins lag nach max. 60 Minuten Perfusion im Mittel bei 9 ml Urin pro Niere. Der totale Ausfall der Urinproduktion der Nieren der Kontrollgruppe gibt hier also einen guten Hinweis auf das sehr frühe Auftreten einer HAR in den genetisch unveränderten Nieren.

4.3.4. Morphologie, Expression und Stabilität des Transgens

Die histologische Beurteilung der perfundierten Nieren erfolgte auf der Grundlage der „Banff working classification of kidney transplant pathology“ [62]. Diese formale Klassifikation beinhaltet auch die Definition und histologische Kriterien für eine hyperakute Abstoßung: polymorphe Ablagerungen von präformierten Antikörpern in glomerulären und peritubulären Kapillaren eine Stunde post transplantationem mit daraus folgender endothelialer Schädigung und kapillären Thrombosen.

Histologisch zeigten die Nieren der Kontrollgruppe die für die hyperakute Abstoßungsreaktion typischen Zeichen, besonders interstitielle Hämorrhagien. Inmmunhistochemisch zeigten die abgestoßenen Nieren Ablagerungen von humanem IgM, IgG und C3, welche ebenfalls regelhaft in der hyperakuten Abstoßung von porcinen Organen, die auf Primaten transplantiert wurden gefunden werden [51, 19].

Andere Untersucher sahen bei der hyperakuten Abstoßung menschlicher Nierentransplantate Fibrinablagerungen in den glomerulären Kapillaren und peritubulären Gefäßen [65] oder ausgedehnte Mikrothrombosen in den Glomeruli und juxtaglomerulären Arteriolen [30].

Die intra- und interindividuell verschiedene Expression von hDAF, die histologisch auch

nach Perfusion mit Humanblut nachgewiesen werden konnte, lässt Rückschlüsse auf die mögliche Unterlegenheit der älteren Methode der DNA-Mikroinjektion mit anschließender konventioneller Züchtung im Vergleich zur neueren Methodik des somatischen Kerntransfers mit anschließender Klonierung der Tiere zu. Ex-vivo Perfusionsversuche mit transgenen Tieren, die mittels somatischen Kerntransfers und anschließender Klonierung produziert wurden, wären wünschenswert.

Bezüglich der histologisch-morphologischen Beurteilung sei folgendes anzumerken:

- Die zu erwartenden Vorteile durch die transgene Expression von hDAF in den Nieren der Gruppe 1 sind möglicherweise nicht ausreichend, um zu einer Verbesserung des mikroskopischen Bildes zu führen.
- Einige Schnitte waren in einem schlechten morphologischen Zustand, die Kerne teilweise aufgelöst und die Tubuli „wolkig“. Eine Wiederholung der Versuche, um eine bessere Histologie zu erhalten, war aus Gründen der Verfügbarkeit der Tiere nicht möglich.
- Eine bessere oder schlechtere Nierenfunktion korreliert oft nicht mit dem histologischen Schnittbild, d.h. eine histologisch qualitativ gut imponierende Niere muss nicht unbedingt eine gute Funktion aufweisen und vice versa [9].

Damit ist festzustellen, dass die histologische Beurteilung für dieses Modell keine optimale Methode zur Einschätzung der Funktion eines transgenen Organs und dem Auftreten der HAR darstellt. Die histologischen Befunde korrelieren oft nicht mit den physikalisch beobachteten und gemessenen Größen und dem klinischen Eindruck während der Perfusion.

4.4. Schlussfolgerung

Eine Voraussetzung für die Xenotransplantation ist die ausreichende Expression des humanen Transgens auch nach sekundären Einwirkungen wie Ischämie und Belastung durch Metaboliten. In diesem Experiment konnte der positive Einfluss der hDAF-Expression auf die Frühfunktion des Organs demonstriert werden, dennoch geben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die Expression des Transgens auf Grund starker intra- und interindividueller Schwankungen für klinische Belange noch unzureichend ist. Weitere Untersuchungen zum Ischämieverhalten des Transgens wären hier sicherlich von Interesse.
Am Kleintiermodell konnte gezeigt werden, dass der hDAF-Transfer technisch möglich ist. Die Expression ist für den klinischen Einsatz aber möglicherweise unzureichend. Weitere Einschränkungen des Modells ergeben sich aus der Speziesauswahl, zum einen aus technischen, zum anderen aus physiologischen Gründen. Ebenso konnte hier eindrücklich demonstriert werden, wie schwierig der Gentransfer multipler Gene und die anschließende konventionelle Züchtung der transgenen Tiere ist.
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die pathophysiologischen Mechanismen der hyperakuten Abstoßungsreaktion im vorliegenden ex-vivo Perfusionsmodell (von Kaninchennieren mit Humanblut) vergleichbar mit denen der HAR in der ex-vivo Perfusion (eHPS) von porcinen Nieren mit Humanblut und mit Einschränkungen auch vergleichbar mit der in-situ Perfusion im menschlichen Empfänger sind.
Das Kaninchen-auf-Mensch-Modell hat folgende Vorteile: Es ist klinisch relevant, Untersuchungen können mit relativ geringen Kosten betrieben werden, die Versuchstiere sind auf breiter Basis verfügbar, die Technik des genetischen Engeneerings von Kaninchen ist wohl bekannt und beherrschbar, die eHPS ist technisch relativ unkompliziert und liefert gut reproduzierbare Ergebnisse.

5. Zusammenfassung

Heute, fast 50 Jahre nach der ersten Nierentransplantation durch Joseph E. Murray in Boston, der 1990 dafür mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde, besteht ein gravierendes Missverhältnis zwischen den Patienten auf der Warteliste für eine Transplantation und tatsächlich realisierten Transplantationen (bzw. verfügbaren Spenderorganen).

Die Bereitschaft in der allgemeinen Bevölkerung zur postmortalen Organspende ist seit Jahren eher rückläufig, und auch die Nieren-Lebendspende kann diesen Engpass in der Bereitstellung von geeigneten Spenderorganen nicht überwinden helfen. Viele Patienten, die eine lebensrettende Transplantation (z.B. Herz oder Leber) bräuchten, sterben auf der Warteliste. Bei Patienten, die an einer terminalen Niereninsuffizienz leiden, könnte durch eine Nierentransplantation die Lebensqualität wesentlich verbessert, die Therapiekosten gesenkt und die Prognose verbessert werden.

Die humane Xenotransplantation, d.h. die Transplantation von tierischen Orangen auf den Menschen, könnte in mittlerer Zukunft eine Möglichkeit bieten, diesen Engpass in der Bereitstellung geeigneter Spenderorgane zu überwinden. Bisherige klinische Versuche und Erfahrungen zeigten allerdings noch nicht die international geforderten Funktions- und Überlebensraten, um die Xenotransplantation als klinische Standardverfahren zu etablieren. Aus diesem Grund ist noch einige Arbeit an Grundlagenforschung und präklinischen Untersuchungen notwendig.

Eine der Hauptbarrieren der Xenotransplantation stellt nach wie vor die durch präformierte Xenoantikörper ausgelöste, komplementvermittelte hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) dar. Die Erzeugung transgener Tiere, welche humane Komplementregulatorproteine auf ihren Zelloberflächen exprimieren und damit die HAR wirksam verhindern können, eröffnet neue Möglichkeiten für die Xenotransplantation.

Grundlegende Voraussetzung für die Xenotransplantation ist die ausreichende Expression des humanen Transgens auf den tierischen Zellen, auch nach sekundären Einwirkungen wie z.B. Ischämie. In diesem Experiment konnte der positive organprotektive Einfluss der Expression des humanen Komplementregulatorproteins "decay accelerating factor" (hDAF) auf die Frühfunktion der Niere demonstriert werden. Am Kleintiermodell konnte gezeigt werden, dass der hDAF-Transfer mittels Desoxyribonucleinsäure-Mikroinjektion technisch möglich ist. Dennoch geben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die Expression des Transgens für klinische Belange noch unzureichend ist.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass das E12 "yeastlike artificial chromosome" partiell genomisch integriert wurde, die Größe betrug 700 Kilobasen. Der humane "decay accelerating factor" konnte auf Kaninchennierengewebe auch noch nach der ex-vivo-Perfusion mit Humanblut nachgewiesen werden. Die hDAF Expression war allerdings inhomogen und unterlag interindividuell starken Schwankungen. Insgesamt ergab sich jedoch ein Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe.

Neue Verfahren zur Herstellung und Klonierung polytransgener Tiere lassen auf weitere Fortschritte in der Xenotransplantationsforschung hoffen. Wünschenswert wären weitere ex-vivo-Hämoperfusionsversuche mit polytransgenen Tieren.

6. Literatur

1. Abbas AK, Lichtman AH und Pober JS Das Komplementsystem. In: Abbas, AK, Lichtman, AH und Pober, JS (Hrsg) Immunologie. Hans Huber, Bern Göttingen Toronto Seattle, S. 354-380 (1996)

2. Abendroth D, Prestel R, Storck M, Steinbach G, Pooth R und Hammer C: Effect of Na/K/2Cl transporter inhibition with piretanide on postischemic kidney function. Transplant Proc 28: 83-84 (1996)

3. Abouna GM, Boehmig HG, Serrou B, Amemiya H und Martineau G: Long-term hepatic support by intermittent multi-species liver perfusions. Lancet 2: 391-396 (1970)

4. Bailey LL: Role of cardiac replacement in the neonate. J Heart Transplant 4: 506-509 (1985)

5. Bailey L, Concepcion W, Shattuck H und Huang L: Method of heart transplantation for treatment of hypoplastic left heart syndrome. J Thorac Cardiovasc Surg 92: 1-5 (1986)

6. Barnard CN: The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. S Afr Med J 41: 1271-1274 (1967)

7. Barnard CN, Wolpowitz A und Losman JG: Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass. S Afr Med J 52: 1035-1038 (1977)

8. Belzer FO, Ashby BS, Huang JS und Dunphy JE: Etiology of rising perfusion pressure in isolated organ perfusion. Ann Surg 168: 382-391 (1968)

9. Benzer H, Buchardi H, Larsen R und Sulter PM: Intensivmedizin. Springer, New York London Paris. S. 1993

10. Brem G, Hartl P, Besenfelder U, Wolf E, Zinovieva N und Pfaller R: Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits. Gene 149: 351-355 (1994)

11. Brem G, Besenfelder U, Aigner B, Muller M, Liebl I, Schutz G und Montoliu L: YAC transgenesis in farm animals: rescue of albinism in rabbits. Mol Reprod Dev 44: 56-62 (1996)

12. Calne RY: Organ transplantation between widely disparate species. Transplant Proc 2: 550-556 (1970)

13. Carrel A: The surgery of blood vessels, etc. Johns Hopkins Hosp. Bull 18: 18-ff. (1907)

14. Chari RS, Collins BH, Magee JC, DiMaio JM, Kirk AD, Harland RC, McCann RL, Platt JL und Meyers WC: Brief report: treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. N Engl J Med 331: 234-237 (1994)

15. Cooper DKC, Ye Y, Rolf LL und Zuhdi N The pig as a potential organ donor for man. In: Cooper, DKC, Kemp, E, Reemtsma, K und White, DJG (Hrsg) Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species. 1. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 481-500 (1991)

16. Cooper DKC, Koren E und Oriol R: Natural antibodies, α-galactosyl oligosaccarides and discordant xenografting. Xeno 2: 22-25 (1994)

17. Cozzi E und White DJ: The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. Nat Med 1: 964-966 (1995)

18. Cramer DV: The use of xenografts for acute hepatic failure. Transplant Proc 27: 80-82 (1995)

19. Dalmasso AP: The complement system in xenotransplantation. Immunopharmacology 24: 149-160 (1992)

20. Fritze D und Matzdorff A: Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. In: Bop, A und Bop, K (Hrsg) Innere Medizin. 1. Aufl. Georg Thieme, Stuttgart, S. 1354-1356 (2001)

21. Grinyo JM, Cruzado JM und Torras J: Hyperacute rejection models: ex vivo xenoperfusion systems. Transplant Proc 31: 970-971 (1999)

22. Hammer C: Isohemagglutinins and preformed natural antibodies in xenogeneic organ transplantation. Transplant Proc 19: 4443-4447 (1987)

23. Hammer C: Natures obstacles to xenotransplantation. Transplant Rev 8: 1-11 (1994)

24. Jilge und Kuhnt Skriptum Versuchstierkundlicher Block-Kurs. TFZ Universität, Ulm (2000)

25. Johnston PS, Wang MW, Lim SM, Wright LJ und White DJ: Discordant xenograft rejection in an antibody-free model. Transplantation 54: 573-576 (1992)

26. Jørgensen KA, Kemp E, Barfort P, Starklint H, Larsen S, Jacobsen IA, Dieperink H, Frifelt JJ und Munk-Andersen G: Xeno- and auto-perfusion of rabbit kidney. Machine perfusion with blood at 37 degrees C. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A] 93: 305-310. (1985)

27. Jørgensen KA, Kemp E, Barfort P, Starklint H, Larsen S und Munk-Andersen G: On the role of platelets and leucocyte in renal xenoperfusion. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A] 94: 223-227 (1986)

28. Jørgensen KA, Kemp E, Barfort P, Starklint H, Larsen S und Munk-Anderson G: Platelet aggregation is not essential for xenograft rejection. Thromb Res 43: 87-90 (1986)

29. Kerr SR, Dalmasso AP, Apasova EV, Chen SS, Kirschfink M und Matas AJ: Mouse-to-rabbit xenotransplantation: a new small animal model of hyperacute rejection mediated by the classical complement pathway. Transplantation 67: 360-365 (1999)

30. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP und Fjeldborg O: Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. Lancet 2: 662-665 (1966)

31. Land W: Möglichkeiten und Grenzen der xenogenen Organtransplantation. Chirurg 42: 172-178 (1971)

32. Land W, Schilling A, Aldenhoff J, Lamerz R, Pielsticker K, Mendler N und Brendel W: In vitro studies on the mechanism of hyperacute xenograft rejection. Transplant Proc 3: 888-890 (1971)

33. Langford GA, Yannoutsos N, Cozzi E, Lancaster R, Elsome K, Chen P, Richards A und White DJ: Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. Transplant Proc 26: 1400-1401 (1994)

34. Larsen S und Starklint H Histopathology of kidney xenograft rejection. In: Cooper, DKC, Kemp, E, Platt, JL und White, DJG (Hrsg) Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species. 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, S. 244-246 (1996)

35. Latinne D, Soares M, Havaux X, Cormont F, Lesnikoski B, Bach FH und Bazin H: Depletion of IgM xenoreactive natural antibodies by injection of anti-mu monoclonal antibodies. Immunol Rev 141: 95-125 (1994)

36. Leventhal JR, Sakiyalak P, Witson J, Simone P, Matas AJ, Bolman RM und Dalmasso AP: The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in nonhuman primates. Transplantation 57: 974-978 (1994)

37. Moat NE, Shore DF und Evans TW: Organ dysfunction and cardiopulmonary bypass: the role of complement and complement regulatory proteins. Eur J Cardiothorac Surg 7: 563-573 (1993)

38. Mozes MF, Gewurz H, Gunnarson A, Moberg AW, Westberg NG, Jetzer T und Najarian JS: Xenograft rejection by dog and man: isolated kidney perfusion with blood and plasma. Transplant Proc 3: 531-533 (1971)

39. Müller-Plathe O Säure-Basen-Gleichgewicht und Blutgase. In: Thomas, L (Hrsg) Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 5. erw. Aufl. TH-Books, Frankfurt/Main, S. 329 (2000)

40. Murray JE, Tilney NL und Wilson RE: Renal transplantation: a twenty-five year experience. Ann Surg 184: 565-573 (1976)

41. Neethling F, Taniguchi S, Li S, Koren E, Oriol R, Cummings R und Cooper DKC Roles of Anti-αGal Antibody and Oligosaccaride Therapy in Xenotransplantation. In: Cooper, DKC, Kemp, E, Platt, JL und White, DJG (Hrsg) Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Barcelona, S. 340-359 (1997)

42. Niemann H: Transgene Schweine für Xenotransplantate für den Menschen. Zentralbl Chir 123: 781-784 (1998)

43. Niemann H und Kues WA: Transgenic livestock: premises and promises. Anim Reprod Sci 60-61: 277-293 (2000)

44. Niemann H, Rath D und Wrenzycki C: Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. Reprod Domest Anim 38: 82-89 (2003)

45. Nizet A: The isolated perfused kidney: possibilities, limitations and results. Kidney Int 7: 1-11 (1975)

46. Otte KE, Jorgensen KA, Bonnevie V, Barfort P, Larsen S, Starklint H, Pirotzky E und Kemp E: Xenoperfusion of rabbit kidney and the impact of BN 52021: a specific antagonist of platelet-activating factor. Transplant Proc 22: 1089-1090 (1990)

47. Otte KE, Steinbruchel D, Kain H und Kemp E: Xenoperfusion experiments are suitable for xenotransplantation research. Transplant Proc 24: 449-450 (1992)

48. Pascher A, Poehlein CH, Storck M, Abendroth D, Mueller-Hoecker J, Young VK, Koenig W, White DJ und Hammer C: Human decay accelerating factor expressed on endothelial cells of transgenic pigs affects complement activation in an ex vivo liver perfusion model. Transplant Proc 28: 754-755 (1996)

49. Pino-Chavez G, Cary N, Young V, Cozzi E, Horsley J, Langford G und White DJ: The effect of h-DAF expression on endothelial cell activation of porcine xenografts. Transplant Proc 28: 590-591 (1996)

50. Platt JL, Lindmann BJ, Chen H, Spitalnik SL und Bach FH: Endothelial cell antigens recognized by xenoreactive human natural antibodies. Transplantation 50: 817-822 (1990)

51. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM und Bach FH: Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. Transplantation 52: 214-220 (1991)

52. Platt JL, Lindman BJ, Geller RL, Noreen HJ, Swanson JL, Dalmasso AP und Bach FH: The role of natural antibodies in the activation of xenogenic endothelial cells. Transplantation 52: 1037-1043 (1991)

53. Platt JL und Logan JS: Use of transgenic animals in xenotransplantation. Transplant Rev 10: 69-77 (1996)

54. Platt JL Hyperacute xenograft rejection. In: Cooper, DKC, Kemp, E, Platt, JL und White, DJG (Hrsg) Xenotransplantation : the transplantation of organs and tissues between species. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Barcelona, S. 8-16 (1997)

55. Platt JL und Saadi S: The role of complement in transplantation. Mol Immunol 36: 965-971 (1999)

56. Pöhlein C, Pascher A, Storck M, Young VK, Konig W, Abendroth D, Wick M, Thiery J, White DJ und Hammer C: Transgenic human DAF-expressing porcine livers: their function during hemoperfusion with human blood. Transplant Proc 28: 770-771 (1996)

57. Reemtsma K: Xenografts. Transplant Proc 21: 517-518 (1989)

58. Reemtsma K und Benvenisty A Experience with clinical kidney xenotransplantation. In: Cooper, DKC, Kemp, E, Reemtsma, K und White, DJG (Hrsg) Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species. 1. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 531-540 (1991)

59. Rossmann P und Matousovic K: The production of lesions in the rabbit kidney by xenoperfusion with fresh human blood. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 382: 95-111 (1979)

60. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL und McKenzie IF: Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 11391-11395 (1993)

61. Schelzig H, Vogel A, Krischer C, Simon F und Abendroth D: Role of recombinant hirudin in a pig-to-human lung transplantation model. Transplant Proc 34: 2384-2386 (2002)

62. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF und et al.: International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. Kidney Int 44: 411-422 (1993)

63. Starling EH und Verney EB: The secretion of urine as studied in the isolated kidney. Proc R Soc Biol 97: 321-363 (1925)

64. Starzl TE, Marchioro TL, Peters GN, Kirkpatrick CH, Wilson WEC, Porter KA, Rifkind D, Odgen DA, Hitchcock CR und Waddell WR: Renal heterotransplantation from Baboon to man: experience with 6 cases. Transplantation 2: 752-776 (1964)

65. Starzl TE, Lerner RA, Dixon FJ, Groth CG, Brettschneider L und Terasaki PI: Shwartzman reaction after human renal homotransplantation. N Engl J Med 278: 642-648 (1968)

66. Storck M: Die humane xenogene Nierentransplantation im konkordanten und diskordanten ex-vivo Hämoperfusionsmodell. Med Habilitationsschrift, Universität Ulm 1996

67. Storck M, Reichel S, Techt B, Sirsjo A, Krombach F, Hammer C und Abendroth D: Effect of LFA-1 inhibition on immediate organ function in concordant ex-vivo hemoperfusion of primate kidneys. Transplant Proc 28: 765-766 (1996)

68. Storck M, Abendroth D, Prestel R, Pino-Chavez G, Muller-Hoker J, White DJ und Hammer C: Morphology of hDAF (CD55) transgenic pig kidneys following ex-vivo hemoperfusion with human blood. Transplantation 63: 304-310 (1997)

69. Storck M, Krombach F, Prestel R, Hammer C und Abendroth D: Role of leukocyte adhesion molecules during ex vivo kidney xenoperfusion. Transplant Proc 29: 3011-3012 (1997)

70. Storck M, Abendroth D, White DJ, Pino-Chavez G, Fakler JA und Hammer C: Transgenic swine as potential organ donors? Results of the ex-vivo hemoperfusion hDAF transgenic kidney with human blood. Zentralbl Chir 123: 785-792 (1998)

71. Strobel S: Hirudin als Antikoagulans in der xenogenen ex-vivo Hämoperfusion. 4. Symposium Xenotransplantation, Universität Giessen, Schloss Rauischholzhausen (2000)

72. Suckfüll M, Mudsam M, Pieske O, Enders G, Babic R und Hammer C: Immunohistological studies of complement activation after xenogeneic perfusion of a working heart model. Transpl Int 7: 324-328 (1994)

73. Taniguchi S und Cooper DKC Clinical Xenotransplantation - A brief review of the world experience. In: Cooper, DKC, Kemp, E, Platt, JL und White, DJG (Hrsg) Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species. 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, S. 776-784 (1996)

74. Thadhani R, Pascual M und Bonventre JV: Acute renal failure. N Engl J Med 334: 1448-1460 (1996)

75. Tublin ME, Tessler FN und Murphy ME: Correlation between renal vascular resistance, pulse pressure, and the resistive index in isolated perfused rabbit kidneys. Radiology 213: 258-264 (1999)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Abendroth für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die Bereitstellung der notwendigen Ressourcen und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung. Ebenso möchte ich Prof. Dr. M. Storck für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung danken. Mein Dank gilt auch Dr. H. Schelzig für seine Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und den Organentnahmen.
Herrn Prof. Dr med. Dr. med. vet. C. Hammer danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit und für die Nutzung der Räumlichkeiten im ICF, München. Herrn Prof. Dr. L. Sunder-Plassmann danke ich für die Möglichkeit in den Forschungslabors der Abteilung Chirurgie II der Chirurgischen Universitätsklinik Ulm zu arbeiten.
Ganz besonders danke ich auch Herrn Prof. Dr. Brem für die Überlassung der transgenen Tiere. Für die Unterstützung bei der Befundung der histologischen und immunhistologischen Schnitte danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. U. Heemann.
Mein besonderer Dank gilt meinem Mitdoktoranden Herrn Christian Schliep für seine Unterstützung bei dieser Arbeit. Frau Simone Müßler danke ich besonders für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Steffen Peter Strobel
Dauernde Anschrift:	Scheffelstraße 4
	73092 Heiningen, Germany
Email:	steffen.strobel@web.de

Geburtstag:	23. Mai 1975
Geburtsort:	Göppingen, Baden-Württemberg
Eltern:	Heinz-Peter Strobel und Inge Riekert, geb. Müller
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Persönlicher Werdegang

1982 – 1985	Grundschule Heiningen.
1985 – 1991	Hermann-Hesse-Realschule Göppingen. Abschluss mit der mittleren Reife.
1991 – 1992	Technisches Gymnasium Göppingen.
1992 – 1993	Upper Arlington High-School, Columbus, OH, USA, PPP-Stipendium des Deutschen Bundestags und US-Kongresses.
1993 – 1995	Technisches Gymnasium, Göppingen. Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife.
1995 – 1996	Zivildienst im Deutsches Institut für ärztliche Missionen (DIFÄM), Tropenklinik Paul-Lechler Krankenhaus (TPLK), Tübingen..
10/1996 – 04/2003	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm.
04/2003	Drittes Staatsexamen am Bundeswehrkrankenhaus Ulm .
09/2003 – 12/2003	Arzt im Praktikum in der Helfenstein Klinik Geislingen, Abt. Innere Medizin (Chefarzt Dr. A. Schuler).
Ab 01/2004	Arzt im Praktikum in der Klinik am Eichert Göppingen, Medizinische Klinik I (Chefärzte Prof. Dr. H. Sigel und Dr. K-D. Hanel).

Göppingen, 22.10.2004