

Aus der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie
im Zentrum Chirurgie der
Medizinischen Hochschule Hannover



Die Bedeutung des Komplementsystems
bei hyperakuter und akut vaskulärer Abstossungsreaktion
nach diskordanter Nieren-Xenotransplantation im Primatenmodell:
Implikationen für Therapie und Prophylaxe

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Jens Martin Hecker
aus Leverkusen

Hannover, 2003

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 03.02.2003

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Rektor: Professor Dr. med. Horst von der Hardt

Betreuer der Arbeit: Professor Dr. med. Michael Winkler

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ivo Steinbruck

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Radermacher

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2003

Promotionsausschussmitglieder: Professor Dr. med. Henning Zeidler

Professor Dr. med. Gorig Brunner

Professor Dr. med. Jörn Elsner

MEINEN ELTERN
gewidmet

Inhalt

1. EINLEITUNG	1
1.1. Hyperakute Abstossung	6
1.1.1. Xenoreaktive Natürliche Antikörper.....	7
1.1.2. Komplement	8
1.2. Posthyperakute Abstossungsmechanismen.....	11
1.2.1. Akut vaskuläre Abstossung	11
1.2.2. Zelluläre und chronische Abstossungsreaktion.....	12
1.3. Schritte zur klinischen Xenotransplantation.....	12
1.4. Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	13
2. MATERIAL & METHODEN.....	14
2.1. Tiermodell	14
2.2. Operative Technik	14
2.2.1. Organentnahme.....	14
2.2.2. Transplantation.....	15
2.3. Immunsuppression	17
2.3.1. Basisimmunsuppression	17
2.3.2. Behandlung von Abstossungsreaktionen	18
2.4. Postoperatives Management.....	20
2.5. Klinische Definition der Abstossungsreaktionen.....	21
2.5.1. Hyperakute Abstossung	21
2.5.2. Akut vaskuläre Abstossung	21
2.6. Bestimmung der Komplementspiegel im Plasma	21
2.6.1. Bestimmung der C3a-Konzentration	22
2.6.2. Bestimmung der sC5b-9 Konzentration	23
2.7. Bestimmung der funktionellen C1-INH Aktivität im Plasma	23
2.8. Statistische Auswertungen	23

3. ERGEBNISSE	24
3.1. Gruppeneinteilung	24
3.1.1. Gruppe Ia.....	25
3.1.2. Gruppe Ib.....	26
3.1.3. Gruppe IIa.....	27
3.1.4. Gruppe IIb.....	28
3.2. Komplementspiegel unmittelbar nach Transplantation.....	31
3.2.1. Komplementspaltprodukt C3a	31
3.2.2. Komplementspaltprodukt sC5b-9	32
3.3. Postoperative Nierenfunktionsparameter	33
3.4. Komplementspiegel während AVR.....	34
3.5. Untersuchungen zum C1-INH	36
3.6. Komplementspiegel während AVR unter C1-INH Therapie.....	37
3.7. Klinischer Verlauf	40
3.8. Immunhistologie	43
3.9. Kontinuierliche Gabe von C1-INH zur AVR-Prophylaxe	45
4. DISKUSSION	49
4.1. Hyperakute Abstossung (HAR)	49
4.2. Akut vaskuläre Abstossung (AVR)	53
5. ZUSAMMENFASSUNG	59
6. VERZEICHNISSE	61
6.1. Literatur	61
6.2. Abkürzungen	78
6.3. Abbildungen & Tabellen	79
DANKSAGUNG	80
LEBENSLAUF	81
PUBLIKATIONEN	82
ERKLÄRUNG	90

1. Einleitung

Die heutzutage routinemässig durchgeführte Nierentransplantation zeigt gute Ergebnisse bei Patienten mit terminalem Organversagen und Überlebensraten, welche sich nicht signifikant von der durchschnittlichen Lebenserwartung in der Gesamtbevölkerung unterscheiden ¹. Die mangelnde Verfügbarkeit menschlicher Organe führt jedoch dazu, dass nur für etwa 20 Prozent der auf ein Organ wartenden Patienten Transplantate verfügbar sind ². Auch das Inkrafttreten des Transplantationsgesetzes am 1. Dezember 1997 konnte die stetig wachsende Diskrepanz zwischen Organbedarf und Organangebot nicht verhindern (Abbildung 1).

Warteliste und Nierentransplantationen

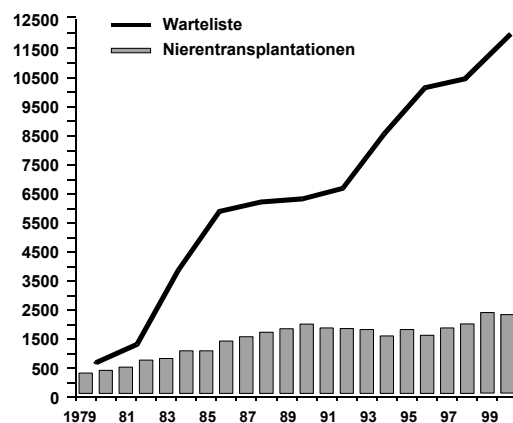


Abbildung 1: Die Diskrepanz zwischen Warteliste und Nierentransplantationen in Deutschland steigt stetig an.

Die Spenderorganknappheit verhindert derzeit eine breitere Anwendung der Organtransplantation als Therapie des terminalen Organversagens.

Die Xenotransplantation (XTx), also die Übertragung spezie fremder Zellen, Gewebe oder Organen, könnte eine Möglichkeit darstellen, den Mangel an menschlichen Spenderorganen zu kompensieren ³. Die experimentelle Xenotransplantation ist historisch gesehen sogar älter als die Allotransplantation. Bereits 1905 wurden einem Kind Teile einer Kaninchenniere transplantiert ⁴. Die Verwendung von tierischen Organen oder Geweben als Ersatz für ein menschliches Organ oder Gewebe könnte ausserdem in manchen Fällen das Wiederauftreten der Grunderkrankung in

transplantierten Organen (z.B. Hepatitis-Reinfektion nach Lebertransplantation) verhindern. Dieses Konzept stellte 1993 die Grundlage für eine Lebertransplantation vom Pavian auf den Menschen dar ⁵. Damals wurde einem 35jährigen Patienten mit einer chronisch aktiven Hepatitis B Infektion eine Pavianleber transplantiert. Der Patient verstarb jedoch 70 Tage später an einer Pilzsepsis. Eine Alternative zur Xenotransplantation ist der mechanische oder biologische Organersatz (tissue engineering), welcher jedoch zur Zeit ebenfalls - wie die Xenotransplantation - noch nicht reif für den klinischen Einsatz ist ⁶. In Zukunft lassen sich möglicherweise aus Stammzellen, gewonnen aus Nabelschnurblut, oder auch aus adulten Körperzellen menschliche Gewebe und Organe für die autologe Transplantation regenerieren ⁷. Solche Fortschritte in der Zelltherapie bzw. im tissue engineering scheinen jedoch derzeit noch weiter entfernt als die Xenotransplantation ^{8 9}.

Die phylogenetische Distanz zwischen Spender und Empfänger spielt eine wichtige Rolle für den Erfolg einer Xenotransplantation. Je grösser der phylogenetische Abstand zweier Spezies, desto grösser ist die Zahl der unterschiedlichen Antigene. Aus immunologischer Sicht würde daher eine dem Menschen möglichst nahestehende Spezies wie beispielsweise Schimpansen oder Paviane als Xenotransplantatspender in Frage kommen. Tatsächlich wurden diese nicht-menschlichen Primaten in frühen klinischen Studien als Xenotransplantatspender verwendet.

Heute sprechen einige Überlegungen für das Schwein als den geeignetsten Organspender. Zum einen sind Schweine in ausreichender Zahl verfügbar und lassen sich darüber hinaus leicht reproduzieren. Die nicht-menschlichen Primaten dagegen sind häufig vom Aussterben bedroht und ihr Regenerationszyklus nimmt ungleich mehr Zeit in Anspruch. Schweineorgane stimmen in ihrer Morphologie und Grösse relativ gut mit denen des Menschen überein. Weiterhin ist das Schwein als Nutztier weitestgehend akzeptiert und es bestehen hier weit weniger ethische Bedenken als bei der Verwendung von dem Menschen näher verwandten Spenderspezies. Ausserdem erscheint die Spezies Schwein besser für molekulargenetisch induzierte genetische Veränderungen geeignet zu sein, um z.B. Abstossungsreaktionen möglichst gering zu halten. Schliesslich steigt das Risiko für die Übertragung von Xenozyoonosen mit näherer phylogenetischer Verwandtschaft ^{10 11}.

Im Gegensatz hierzu ist aus immunologischer und physiologischer Sicht gerade wegen der grossen phylogenetischen Distanz die Verwendung von Schweinen als

Spenderspezies problematischer als beispielsweise der Einsatz von Primaten. Die phylogenetische Distanz ist der Grund für die heftige und irreversible Abstossung des Xenografts¹² sowie für weitere biologische Inkompatibilitäten¹³. Bis heute stellen insbesondere die nach Transplantation vom Schwein auf Primaten auftretenden Abstossungsreaktionen das grösste Hindernis für den klinischen Einsatz der Xenotransplantation dar.

Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben zur Erforschung der Xenotransplantatabstossung beigetragen und die Hoffnung geweckt, die Abstossung vaskularisierter Xenotransplantate therapeutisch verhindern zu können^{14 15 16 17 18 19 20 21}. Verschiedene nicht-immunologische Faktoren beeinflussen ebenfalls den Erfolg der Xenotransplantation. So stellt sich die Frage, ob das speziesfremde Organ seine physiologische Funktion auch im Empfängerorganismus adäquat übernehmen kann²². Im Hinblick auf die Xenotransplantation von Nieren zwischen Mensch und Schwein besteht Kompatibilität in den wichtigsten Eigenschaften wie Morphologie, renalem Blutfluss, glomerulärer Filtrationsrate, Elektrolytspiegeln und Säure-Basen-Gleichgewicht. Trotzdem muss der Einfluss der Schwerkraft auf den aufrechten Gang des Menschen gegenüber den meisten anderen Säugetieren und die mögliche Inkompatibilität von Enzymen, Zytokinen, vasoaktiven Substanzen und Wachstumshormonen berücksichtigt werden^{23 24}. Es muss die Frage geklärt werden, ob unterschiedliche Konzentrationen von Serumproteinen und Transportmolekülen Auswirkungen auf die Transplantatfunktion haben²³. Die Bedeutung dieser nicht-immunologischen Einflüsse ist entscheidend davon abhängig, ob es sich bei dem Transplantat um einzelne Zellen, einen Gewebsverband oder um ein vaskularisiertes Organ handelt.

Isolierte zelluläre Xenotransplantate beziehen ihre Gefässversorgung vollständig vom Wirt. Die Erhaltung der physiologischen Funktion dieser Zellen ist von der Interaktion mit umgebenden Wirtszellen und wirtseigenen Wachstumsfaktoren abhängig. Weil Wachstumshormone von immundefizienten Mäusen inkompatibel mit porciner Knochenmark sind, kommt es hier nicht zu Wachstum und Differenzierung von transplantierten porcinen Knochenmarkszellen²⁵.

Xenogene solide Organtransplantate sind vaskularisiert und werden an den Blutkreislauf des Empfängers angeschlossen. Der direkte Kontakt von Empfängerblut mit Spenderendothel stellt hier ein grosses Problem dar, welches bei zellulären

Transplantaten nicht besteht. So ist beispielsweise porcines Thrombomodulin nicht ausreichend dazu in der Lage, mit humanen Thrombin zu interagieren. Thrombomodulin gehört zur Familie der Oberflächenproteine von Endothelzellen und sorgt für die Bereitstellung von aktiviertem Protein C, indem es mit Thrombin interagiert. Steht dieses antikoagulierend wirkende Protein C wegen der fehlenden Wechselwirkung zwischen porcinem Thrombomodulin und humanem Thrombin nicht zur Verfügung, kommt es zu gesteigerter Formation von Fibrinagglomeraten ²⁶.

Da die Xenotransplantation als elektiver Eingriff durchgeführt werden könnte, wäre es im Unterschied zur Allotransplantation möglich, die Ischämiezeit gering zu halten und dadurch den Reperfusionsschaden zu minimieren sowie die immunsuppressive Therapie zu einem optimalen Zeitpunkt, evt. auch vor der Transplantation, einzuleiten. Da jedoch bei der Xenotransplantation voraussichtlich eine wesentlich stärkere Immunsuppression notwendig werden wird als bei der Allotransplantation, ist wohl mit schwereren Nebenwirkungen der verabreichten Medikation zu rechnen.

Sollte allerdings ein Langzeitüberleben von porcinen Xenotransplantaten erreicht werden, stellt die mögliche Gefahr von Xenozoonosen, wie z.B. die Übertragung von porcinen endogenen Retroviren (PERV), eine weitere Hürde für die klinische Anwendung dar ^{27 28 29}. Es gab jedoch bisher keinen Nachweis einer Infektion durch porcine DNA bzw. Retroviren bei Patienten nach Kontakt mit porcinen Organen ^{30 31 32}. Auch nach Transplantation von porcinen Endothelzellen oder ganzen Organen in Paviane oder Javaner-Affen wurde keine Infektion festgestellt ^{33 34}.

Trotzdem gibt es derzeit keine endgültige Antwort über die Sicherheit von Schweinen als Organquelle ³⁵. Durch die Züchtung transgener Schweineorgane mit Hilfe menschlicher Gene könnte es sogar zur Präadaptation von Viren auf den prospektiven Wirt kommen ³⁶. Andererseits lässt sich möglicherweise das Risiko durch genetische Veränderungen, Züchtung von Schweinen mit Expression von für den Menschen nicht pathogenen PERVs, entsprechende Diagnostik und evtl. sogar Impfung ³⁷ weiter reduzieren.

Die immunologischen Einflüsse auf das Transplantat sind wesentlich von der phylogenetischen Distanz zwischen Spender und Empfänger abhängig. Je weiter Empfänger und Spender entwicklungsgeschichtlich voneinander entfernt sind, desto grösser ist die Zahl der Antigene, gegen die sich das Empfängerimmunsystem richten

wird. Bestimmte genetisch kontrollierte Antigene haben jedoch einen besonders grossen Einfluss auf das Transplantatüberleben. So führt die Expression des α -1,3-Galaktosyltransferase-Gens zur Synthese von Galaktose- α -1,3-Galaktose-Resten auf oberflächlichen Oligosaccharidketten. Dieses sogenannte Gal- α -1,3-Gal-Epitop ist bei sämtlichen Säugetierspezies ausser Altweltaffen und Menschen nachweisbar ³⁸.

Damit wird für potentielle Xenotransplantatempfänger, die dieses Enzym nicht exprimieren und entsprechend (nach postnataler Immunisierung gegen Gal- α -1,3-Gal exprimierende Bakterien) Antikörper gegen Galaktose- α -1,3-Galaktose in der Zirkulation aufweisen, die Antigenität des Xenotransplantates um ein vielfaches gesteigert ^{39 40}. Diese Antikörper stellen einen zusätzlichen Infektabwehrmechanismus gegen Viren und insbesondere Bakterien dar und können als xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA) bezeichnet werden ³⁸. Die Interaktion der XNA mit dem Antigen nach Reperfusion transplanteder diskordanter Xenotransplantate führt zur Komplementaktivierung über den klassischen Aktivierungsweg und letztlich zur hyperakuten Abstossung des Xenografts. Die meisten Zelloberflächenmoleküle, welche physiologischerweise eine Komplementaktivierung inhibieren können (sog. Regulators of Complement Activation; RCA), scheinen überwiegend speziesspezifisch zu wirken und sind damit nicht in der Lage, die Aktivierung des Empfängerkomplementsystems zu unterbinden. So erlauben beispielsweise die Endothelzellen des Meerschweinchens die ungehemmte Aktivierung des alternativen Komplementweges der Ratte, woraufhin Organe des Meerschweinchens, nachdem sie in die Ratte transplantiert wurden, besonders heftig abgestossen werden ⁴¹. Die Komplementaktivierung über den alternativen Weg nach Transplantation porcinen Gewebes scheint jedoch beim Menschen eine geringere Rolle zu spielen ^{42 43}.

Neuere Daten zeigen allerdings, dass porcines CD59 sehr wohl in der Lage ist, ein transgenes Mäuseherz vor einer humanen Komplementaktivierung zu schützen ⁴⁴. Dies lässt darauf schliessen, dass eine strenge Speziesspezifität für RCAs nicht besteht.

Die bei der Xenotransplantation vorkommenden Abstossungsreaktionen (Abbildung 2) können prinzipiell ebenso bei der Allotransplantation auftreten, sind hier jedoch wohl wesentlich seltener und weniger stark verlaufend.

Abstoßungsreaktionen nach Xenotransplantation

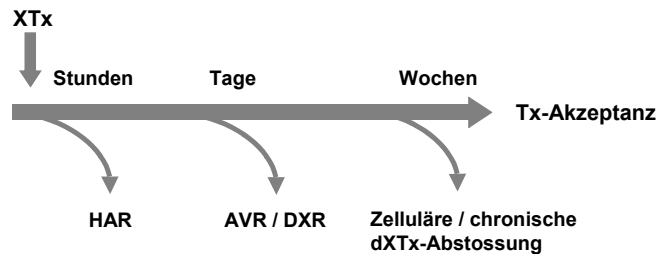


Abbildung 2: Mechanismen der immunologisch bedingten Transplantatschädigung nach diskordanter Xenotransplantation.

1.1. Hyperakute Abstoßung

Organtransplantationen zwischen phylogenetisch weit entfernten Spezies führen innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden zur hyperakuten Abstoßung (HAR), verursacht durch bereits im Empfängerimmunsystem vorbestehende xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA) ¹². Eine HAR kann nur bei primär vaskularisierten Xenotransplantaten beobachtet werden. Kombinationen von Empfänger und Spender, in denen eine HAR auftritt, werden definitionsgemäss als diskordante Xenotransplantation bezeichnet ⁴⁵. Bei den sogenannten konkordanten Xenotransplantationen wird per definitionem keine HAR beobachtet ⁴⁶.

Die histopathologischen Merkmale der HAR sind gekennzeichnet durch interstitielle Hämorrhagien, Ödeme, Thrombozytenaggregation und schwere Endothelzellschäden ^{47 48}. In einigen Fällen wurden deutliche neutrophile Infiltrate beobachtet ⁴⁹. Hauptangriffsziel des Empfänger-Immunsystems bei HAR sind die Endothelzellen des Xenografts. Charakteristische histologische Merkmale bei HAR sind hierbei Schwellung, Bläschenbildung, Schädigung der zellulären Verbindungen und eventuell sogar Lyse. Die immunhistologische Aufarbeitung zeigt Komplement- und Antikörperablagerungen auf den Endothelzellen ⁴⁸.

Die Komplementaktivierung ist entscheidend für die Entwicklung der HAR und tritt auf in Folge der Bindung der XNA des Empfängers an die Endothelzellen des Transplantates

mit folgender Komplementaktivierung über den klassischen Weg. Aufgrund der mehr oder weniger fehlenden Komplementregulation im fremden Organ wird die Komplementkaskade noch weiter getriggert^{50 51}. Dabei sind die Endothelzellen das Hauptangriffsziel der Immunantwort⁵².

1.1.1. Xenoreaktive Natürliche Antikörper

Bei allen Säugetieren sind Antikörper gegen eine Vielzahl von Antigenen vorhanden. Solche Antikörper, die ohne vorherige Sensibilisierung nachweisbar sind, können als natürliche Antikörper bezeichnet werden. Diese Antikörper stellen eine Reaktion des sich entwickelnden Immunsystems auf die Kolonisation des Dickdarmes mit Kolibakterien im Neugeborenenalter dar⁵³. Zur Gruppe der natürlich vorkommenden Antikörper gehören auch solche Antikörper, die gegen Blutgruppenantigene gerichtet sind⁵⁴ und solche, die an die Oberfläche von xenogenen Endothelzellen binden⁵⁵.

Die pathophysiologische Bedeutung der natürlichen Antikörper (XNA) für die HAR⁵⁶ ergibt sich aus folgenden Befunden: 1) Entfernt man mittels Plasmapherese die XNA aus dem Empfängerblut, so kommt es bei nachfolgender diskordanter Xenotransplantation nicht zur HAR⁴⁸. 2) Transplantiert man das Xg in einen neugeborenen Primaten, welcher noch keine XNA gebildet hat, so tritt keine HAR auf^{57 58 59}. 3) Die HAR kann im Kleintiermodell bei einem Xenotransplantatempfänger durch die zusätzliche Gabe von XNA induziert werden⁶⁰.

XNA vom IgM-Typ führen eher zur HAR von Schweineorganen im Primatenmodell als solche vom IgG-Typ⁶¹. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass aber auch IgG und IgA im Xg abgelagert werden^{62 63}. Frühe Biopsien von Xg, die vom Schwein auf Primaten transplantiert wurden, zeigen IgM-Ablagerungen auf den Endothelzelloberflächen, wohingegen IgG vorwiegend im Interstitium und in Fibrinthromben gefunden wird. IgA ist gewöhnlich nicht zu finden⁶¹. Bei *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass menschliches IgM und IgG an Schweineendothelzellen binden⁵⁵, wobei lediglich die Bindung von IgM zur Komplementaktivierung führt^{61 43}. Entfernt man IgM aus menschlichem Serum verhindert dies die Endothelzellaktivierung^{43 64}.

Menschliche XNA erkennen im wesentlichen ein Epitop: Galaktose- α -1,3-Galaktose⁶⁴
⁶⁵ ⁶⁶ ⁶⁷. 70-95 % der XNA sind gegen dieses Gal- α -1,3-Gal Epitop gerichtet⁶⁸.
Dieser Zuckerrest wird in „New World Monkeys“ und niederen Säugetieren, nicht jedoch
im Menschen, Menschenaffen, Pavianen und Makakken exprimiert. Menschen und
Altweltaffen haben, wie oben erläutert, natürliche Antikörper, die gegen dieses Epitop
gerichtet sind³⁸. Beim Menschen sind durchschnittlich 5-40 μ g IgM/ml Plasma gegen
Gal- α -1,3-Gal gerichtet⁶⁴. Die Menge an IgG, die gegen dieses Epitop gerichtet ist,
liegt zwischen 0 und 20 μ g/ml Plasma⁶⁹. Die funktionellen Eigenschaften und die
Konzentration der Gal- α -1,3-Gal-spezifischen XNA im Serum ähneln den Antikörpern,
die gegen die Blutgruppenantigene A und B gerichtet sind. Es wird vermutet, dass sie
eine Familie von natürlichen Antikörpern bilden⁶⁴ ⁶⁹.

Die Bindung von XNA an Schweinezellen kann blockiert werden, indem man gereinigte
Gal- α -1,3-Gal-Zuckerreste verabreicht, welche die Antikörper abfangen⁷⁰. Ausserdem
lassen sich die gegen Gal- α -1,3-Gal gerichteten Antikörper aus dem
Empfängerorganismus entfernen, indem man ein Schweineorgan mit dessen Blut
perfundiert⁶⁶. Fibroblasten, welche mit dem Galactosyltransferase-Gen transfiziert
wurden und daraufhin Gal- α -1,3-Gal auf ihren Oberflächen exprimieren, induzieren die
Bindung von XNA⁶⁵. Die Entfernung der Gal- α -1,3-Gal-Zuckerreste von
Schweinezellen verhindert die Antigen-Antikörper-Reaktion an den so behandelten
Zelloberflächen⁷¹.

Die Expression von Gal- α -1,3-Gal ist die Voraussetzung für die Entwicklung der HAR,
wie auch bei Herztransplantation von einem „New World Monkey“ auf einen Pavian
gezeigt werden konnte⁷². Entfernt man die Gal- α -1,3-Gal-spezifischen Antikörper aus
dem Blut von Pavianen, so kommt es nicht zur Ausbildung der HAR nach
Transplantation von Schweineorganen⁷³. Möglicherweise sind noch weitere
Kohlenhydrate neben Gal- α -1,3-Gal an der Reaktion mit den XNA beteiligt⁷⁴.

1.1.2. Komplement

Die Komplementaktivierung ist der entscheidende Schritt bei der Entwicklung der
hyperakuten Abstossungsreaktion⁵⁰ ⁷⁵. Verschiedene Beobachtungen belegen die
Bedeutung des Komplementsystems für die HAR: 1) Nach Anastomose eines

diskordanten Xenografts kommt es zu einem raschen Abfall der Komplementspiegel im Serum des Empfängers ⁷⁶, während es gleichzeitig zu Ablagerungen von Komplement im Transplantat kommt ⁶¹. 2) Das Transplantatüberleben kann entscheidend durch Administration von Inhibitoren der Komplementaktivierung wie „Cobra Venom Factor“, soluble Complement Receptor Type 1 (sCR-1) oder Immunglobulinen verlängert werden ^{77 78 79}. 3) In kongenital komplement-defizienten Empfängern kommt es nach Xenotransplantation nicht zur HAR ⁸⁰.

Histopathologische Untersuchungen an abgestossenen Xenografts zeigten eine massive Ablagerung von C4 zusammen mit IgM, jedoch nur vereinzelt Komponenten des alternativen Komplementweges wie Faktor P und B ⁶¹. Wenn aus menschlichem Serum IgM oder C2 depletiert werden, so kommt es bei Perfusion von Schweineendothel nicht zur Komplementaktivierung ⁵². Dies zeigt, dass die Komplementaktivierung einer vorhergehenden Antikörperbindung und eines intakten klassischen Komplementweges bedarf. Die Komplementaktivierung auf Schweineendothelzellen nach Perfusion mit menschlichem Serum kann durch Gabe von C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) unterbunden werden ^{81 82}.

Trotzdem kann es wohl (in anderen Spezieskombinationen als Schwein auf Primat) auch über den alternativen Aktivierungsweg zu einer Komplementaktivierung bei HAR kommen ⁸³. Transplantiert man Organe des Meerschweinchens in eine Ratte oder Organe vom Hasen in neugeborene Schweine, so wird das Komplementsystem über den alternativen Weg direkt auf den Endothelzellen aktiviert ⁴¹. Eine HAR, welche über den alternativen Weg der Komplementaktivierung eingeleitet wurde, verläuft in der Regel besonders fulminant. Die Ursache hierfür könnte sein, dass sie nicht von der Kinetik der Antigen-Antikörper-Reaktion abhängig ist.

Die Unfähigkeit des xenogenen Endothels zur Regulation des menschlichen Komplementsystems stellt ein grosses Problem der Xenotransplantation dar. Physiologischerweise wird das Komplementsystem von zellassozierten Glykoproteinen wie dem „Decay Accelerating Factor (DAF)“, dem „Membrane Cofactor Protein (MCP)“ sowie CD59 kontrolliert. MCP reguliert die Komplementkaskade auf Höhe der C3-Convertase, während CD59 die Formation des „Terminal Complement Complex (TCC)“ unterbindet. Die genannten Moleküle scheinen überwiegend spezies-spezifisch zu wirken ⁸⁴ und machen daher Xenotransplantate besonders empfindlich gegenüber

einer Komplementaktivierung⁸⁵. Andererseits ist porcines CD59 in der Lage, ein transgenes Mäuseherz vor einer humanen Komplementaktivierung zu schützen⁴⁴. Dies würde eher gegen eine strenge Spezifität für RCAs sprechen. Zu berücksichtigen ist stets die Expressionsdichte des komplementregulierenden Proteins auf dem Endothel.

Die Entwicklung einer HAR ist im wesentlichen von der Bildung des terminalen Komplementkomplexes (C5b-9 oder TCC) abhängig. In Empfängern, die einen angeborenen Mangel an C6 aufweisen, kommt es nicht zur Ausbildung der HAR^{80 86}. Blockiert man C5 mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, so wird ebenfalls die klassische HAR verhindert⁸⁷. Die Entwicklung einer HAR hängt jedoch nicht nur von der Ausbildung des TCC ab. So kommt es in Organen von CD59-transgenen Schweinen zur HAR, obwohl CD59 die Bildung des TCC signifikant hemmt⁸⁸. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung dadurch erklären, dass auch C5b67 alleine dazu in der Lage ist, die Endothelzellen zu schädigen⁸⁹. Es ist jedoch ebenso denkbar, dass CD59 die Ausbildung des TCC nicht in ausreichendem Maße inhibiert.

C1-INH ist der einzige Inhibitor für die aktivierten Komplementkomponenten C1r und C1s, die am Beginn des klassischen Weges der Komplementaktivierung stehen. Er verhindert daher eine überschüssige Aktivierung des Komplementsystems. Ausserdem ist C1-INH der physiologisch bedeutendste plasmatische Inhibitor für den aktivierten Gerinnungsfaktor XIIa und für Kallikrein, mit denen er schnell und irreversibel einen inaktiven Komplex bildet. Damit ist C1-INH der wichtigste Regulator der Kontaktphase.

Ein erblicher Mangel an C1-INH ruft das hereditäre angioneurotische Ödem (HANE), eine Sonderform des Quincke-Ödems, hervor. Erworbene Mangelzustände kommen bei malignen Erkrankungen, Leberzirrhose, Präeklampsie, Pneumonie und anderen Infektionen vor.

1.2. Posthyperakute Abstossungsmechanismen

1.2.1. Akut vaskuläre Abstossung

Nach diskordanter Xenotransplantation kommt es nach Überwindung der HAR (beispielsweise mittels des Einsatzes von RCA transgenen Spendertieren) zur akuten vaskulären Abstossung (AVR)⁹⁰, oft auch als verzögerte Xenograft Abstossung (DXR) bezeichnet⁹¹. Histopathologisches Kennzeichen der AVR sind Endothelzellschaden, Schwellung, Ischämie und diffuse Thrombose. Manchmal wird ein Infiltrat aus Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beobachtet⁹¹. Mehrere Untersuchungen unterstützen die These, dass das Wiederauftreten von (durch das Xenograft induzierten) XNA die AVR bzw. DXR verursacht^{15 60 62}, während die Komplementaktivierung hier eine geringere Rolle zu spielen scheint^{52 89 92 93}.

Wenn XNA und Komplement vorübergehend aus der Zirkulation des Xenotransplantat-Empfängers entfernt werden, kommt es im Kleintiermodell in manchen Fällen nicht zur Ausbildung einer AVR - trotz Wiederauftreten der XNA. Dieser Vorgang wurde von F. Bach „Accommodation“ (Anpassung) genannt^{94 95 96 97} und scheint (im Kleintiermodell) nur dann aufzutreten, wenn das Wiederauftreten der XNA besonders langsam vor sich geht⁹⁸. Interessanterweise ist für die Allotransplantation ABO-inkompatibler Nieren ebenfalls das Wiederauftreten von Isoagglutininen trotz funktionierendem inkompatiblen Transplantat beschrieben, ein Zustand der ebenfalls als Akkomodation bezeichnet werden kann^{99 100}.

Ein Zustand der Akkomodation kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden^{52 61}. Es gibt die Möglichkeit, dass die natürlichen Antikörper ihre funktionellen Eigenschaften und/oder ihre Spezifität ändern^{99 100 101} oder aber dass sich die Antigenstruktur im Xg nach Transplantation ändert. Akkomodation kann dazu führen, dass das Endothel resistent gegen XNA und Komplement wird. Bei Akkomodation in Nagetieren wurde die Expression von „schützenden“ Endothelzellen beobachtet¹⁰². Nach längerer Stimulation von Endothelzellen mit Antikörpern und/oder Komplement sinkt deren Empfindlichkeit¹⁰³. Nach Stimulation von Endothelzellen mit Endotoxin oder Interleukin-1 werden diese bei erneuter Exposition resistent gegen diese Substanzen¹⁰⁴. Sollte es auch in humanen Epithelien zur Akkomodation des

Transplantatempfängers an das Xg kommen, wird es wahrscheinlich nicht nötig sein, die XNA dauerhaft aus dem Empfängerkreislauf zu entfernen.

1.2.2. Zelluläre und chronische Abstossungsreaktion

Xenotransplantate, welche nicht der Zerstörung durch HAR oder AVR/DXR zum Opfer gefallen sind, werden Angriffsziel der zellulären und chronischen Abstossungsreaktion¹⁰⁵. Hier scheinen vor allem natürliche Killerzellen (NK) und T-Lymphozyten beteiligt zu sein. Die chronische Abstossungsreaktion eines Xenografts scheint sich von der eines Allografts zu unterscheiden^{106 107}. Einschränkend muss jedoch konstatiert werden, dass im Primatenmodell anders als für die AVR bisher nur relativ wenige Empfängertiere Überlebenszeiten von mehr als 2 Wochen erreicht haben und somit auch nur sehr vereinzelt Daten zu möglichen chronischen Transplantatschädigungen vorliegen.

Die Bedeutung der T-Zell-Immunität für die Rejektion von Xenotransplantaten ist umstritten. Einige *in vitro* Untersuchungen legen die Vermutung nahe, die Bedeutung der T-Zellen bei der Xenotransplantation sei geringer als bei der Allotransplantation^{108 109 110 111}. Andere Autoren sprechen aber von einer zumindest gleich grossen, wenn nicht sogar grösseren Bedeutung in der Xenotransplantation^{18 52 92 112 113 114}. T-Zell vermittelte Reaktionen spielen bei posthyperakuten Abstossungsreaktionen eine wichtige Rolle¹¹⁵. Nach der Transplantation von Schweinenieren in Paviane und Unterdrückung einer HAR durch geeignete Plasmapheresestrategien konnte gezeigt werden, dass eine beginnende Abstossungsreaktion mittels Gabe von T-Zell-Immunsuppressiva (CyA und ATG) behandelt werden kann¹¹⁶. Die Abstossung eines Herz-Xenotransplantates (Meerschweinchen auf Ratte) wird beschleunigt, wenn man Lymphozyten von sensibilisierten Tieren verabreicht¹¹⁷.

1.3. Schritte zur klinischen Xenotransplantation

Der klinische Einsatz der Xenotransplantation ist einen bedeutenden Schritt nähergerückt, seitdem transgene Schweine als potentielle Organspender zur Verfügung stehen und ein Langzeitüberleben im Primatenmodell (Wochen bis Monate) erreicht werden konnte²⁰. Es besteht jedoch derzeit Einigkeit darüber, dass vor einer

klinischen Xenotransplantation zunächst die oben angerissenen Fragen zur Infektionssicherheit ausreichend geklärt sein müssen.

Die klinische Entwicklung der Xenotransplantation wird sehr wahrscheinlich schrittweise erfolgen: So ist die Transplantation einzelner xenogener Zellverbände, aber auch der extrakorporale Einsatz eines xenogenen Organs beispielsweise im Rahmen von *ex vivo* Leberperfusionen wohl mit geringeren Risiken (insbesondere bezüglich der Infektionssicherheit) verbunden und erscheint daher eher durchführbar ^{118 119 120 121}. Der nächste Schritt wäre die Verwendung von Xenotransplantaten als temporäre Transplantate (sog. „bridging“) im menschlichen Organismus bei Patienten mit akut lebensbedrohlichem Organversagen bis zur Verfügbarkeit eines Allotransplantates. Schliesslich könnte man solchen Patienten ein Xenotransplantat dauerhaft übertragen, für welche aus verschiedenen Gründen kein menschliches Allograft in Frage kommt. Erst wenn der Einsatz in den beschriebenen Situationen erfolgreich ist, kann man darüber nachdenken, die Xenotransplantation als Alternative zur Allotransplantation einzusetzen ^{122 123 124}

1.4. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

An der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover wurde in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Primatenzentrum in Göttingen ein Primatenmodell zur Transplantation unmodifizierter und Komplementregulator transgener porciner Nieren entwickelt. In diesem Modell sollten Abstoßungsformen nach xenogener Nierentransplantation näher charakterisiert und geeignete Therapiestrategien abgeleitet werden.

Spezielles Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Komplementsystems auf die Pathophysiologie der posthyperakuten Abstoßungsreaktionen zu untersuchen und denkbare Interventionsmöglichkeiten aufzuzeigen.

2. Material & Methoden

2.1. Tiermodell

Als Spendertiere wurden 11 „large-white“ Schweine (Schweinezuchtverband Weser-Ems, Oldenburg) sowie 12 h-DAF (CD55) transgene „large-white“ Schweine (Fa. Imutran, Cambridge, UK) verwendet. Die Schweine waren 3-17 Wochen alt und wogen 6-38 kg (Mittelwert=21; Median=22; Standardabweichung=9,3). 23 Cynomolgus-Affen (*Maccaca fascicularis*, Javaner-Affen; Deutschen Primatenzentrum, Göttingen) in einem Alter von 1,5 bis 3,5 Jahren und einem Gewicht von 3,3 bis 9 kg (Mittelwert=4,4; Median=3,8; Standardabweichung=1,5) wurden als Empfängertiere verwendet.

Die Primaten wurden ausschliesslich für Tierversuchs-Zwecke gezüchtet und nach Quarantänisierung und infektiologischem Screening auf Erkrankungen wie Hepatitis, Macaque Herpes B- (Cercopithecine Herpes Virus Typ 1), Ebola-, Marburg-, Simian T-Zell Leukämie- (STLV), Simian Retro- D (SRV) und Simian Immunodeficiency Virus (SIV) über das Deutsche Primatenzentrum in das Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) überstellt. Alle operativen Eingriffe an den Tieren und deren postoperative Betreuung wurden in Übereinstimmung mit den gültigen Tierschutzbestimmungen und nach Genehmigung der Versuche durch die Bezirksregierung Hannover (Tierversuchsantragsnummer 604-I-42502-97/971) durchgeführt.

2.2. Operative Technik

2.2.1. Organentnahme

Die Schweine wurden mit 5 mg/kg KG Azaperon (Stressnil[®], Fa. Janssen-Cilag, Neuss) prämediziert und nach Narkoseeinleitung mit Propofol (Disoprivan 1%[®], Fa. Zeneca, Plankstadt; 2 mg/kg KG) orotracheal intubiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte per inhalationem mit einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch im Volumenverhältnis 1:2 sowie 1% Isofluran (Isofluran-Lilly[®], Fa. Lilly, Bad Homburg), supplementiert mit Buprenorphin (Temgesic[®], Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim) 150-300 µg i.m. . Der operative Eingriff begann zunächst als mediane Laparotomie. Nach Präparation, Freilegung und Kanülierung von Aorta abdominalis und V. cava erfolgte nach

systemischer Antikoagulation mit 300 IE/kg KG Heparin (Liquemin[®], Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen) eine *in situ*-Perfusion der abdominalen Organe mit kalter HTK-Lösung (Fa. Köhler-Chemie GmbH, Alsbach-Höhnlein) über ca. 10 min. Anschliessend wurden die Nieren entnommen und auf Eis lagernd präpariert.

2.2.2. Transplantation

Die Narkoseeinleitung der Empfängertiere begann mit der Gabe von Ketamin (Ketanest 10%[®], Fa. Parke-Davis, Berlin; 8-10 mg i.m.), Legen eines venösen Zuganges, Narkosevertiefung mit Propofol (Disoprivan 1%[®], Fa. Zeneca, Plankstadt; 0,5-1,5 mg/kg KG i.v.) und anschliessender Intubation. Die Narkose wurde mit einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch im Verhältnis 1:2, Isofluran 1% und Fentanyl (Fentanyl Janssen[®], Fa. Janssen-Cilag, Neuss; 3-10 µg/kg KG) aufrechterhalten. Die Narkoseüberwachung der Tiere erfolgte mittels EKG, nicht-invasiver arterieller Blutdruckmessung, Messung der Rektaltemperatur, des zentralen Venendruckes über einen Katheter in der rechten V. jugularis interna, sowie der inspiratorischen und expiratorischen Atemgase. Die Volumensubstitution erfolgte mit 0,9% NaCl-Lösung und Hydroxyethylstärke (HAES-steril 6%[®], Fa. Fresenius, Bad Homburg; 1ml/kg KG + 50% des Transplantatgewichtes in Gramm + isovolämischen Ersatz des Blutverlustes). Auf eine exogene Katecholamingabe wurde verzichtet.

In tiefer Intubationsnarkose erfolgte zunächst die Durchführung einer medianen Laparotomie. Die infrarenale Aorta sowie die Vena cava inferior des Empfängers wurden exponiert und mit der porcinen A. bzw. V. renalis in End-zu-Seit-Technik anastomosiert ¹²⁵. Nach Fertigstellung der Anastomose wurde das Transplantat reperfundiert (Abbildung 3). Die kalte Ischämiezeit lag hierbei zwischen 90 und 238 Minuten (Mittelwert=173; Median=175; Standardabweichung=42) ¹²⁵.

Porcine Niere *in situ* nach Reperfusion

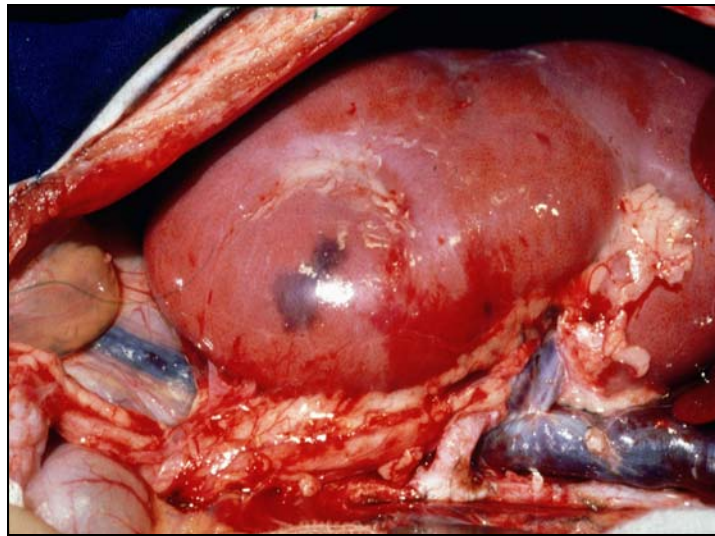


Abbildung 3: Das Bild zeigt eine porcine Niere mit Initialfunktion nach Reperfusion.

Im nächsten Schritt erfolgte dann die Ureterozystoneostomie. Um ein Überlebensmodell (life-supporting-model) zu erhalten, wurden dann beidseitig die Eigenureteren des Empfängers mit nicht-absorbierbarem Nahtmaterial doppelt ligiert¹²⁶. Diese Ligaturen mit konsekutiv auftretendem Harnstau wurden bei ausgewählten Tieren im postoperativen Verlauf mittels Ultraschall oder MRT (Abbildung 4) bzw. in allen Tieren bei Autopsie überprüft.

Vor Bauchverschluss wurde eine offene Transplantatbiopsie entnommen. Anschliessend wurde das Abdomen mit fortlaufender Naht und kutanen Einzelknopfnähten verschlossen. Zur Verabreichung von Medikamenten bzw. zur Volumentherapie wurde zusätzlich ein venöses Portsystem (Fa. C. R. Bard Inc., New Jersey, USA) in die rechte V. jugularis implantiert.

MRT einer porcinen Niere *in situ*

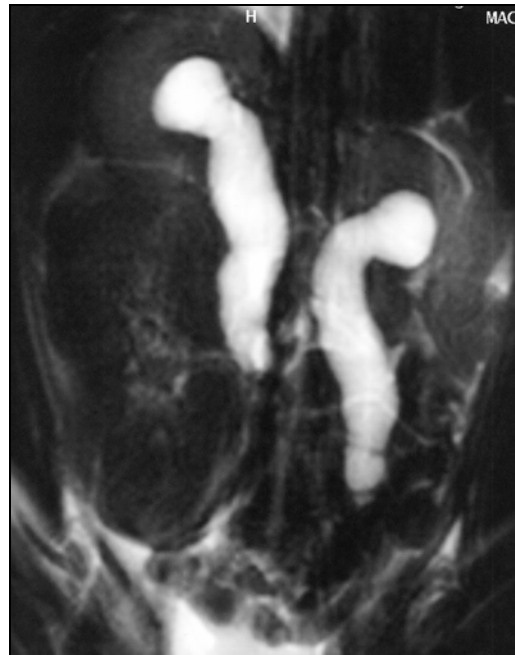


Abbildung 4: MRT eines transplantierten Affen. Deutlich sichtbar sind die dilatierten Eigenureteren aufgrund der intraoperativ angelegten Ligatur.

2.3. Immunsuppression

2.3.1. Basisimmunsuppression

Zur Prävention von Abstossungsreaktionen wurden die Empfängertiere mit einer Dreifachkombination bestehend aus Cyclosporin A (CyA, Sandimmun Optoral[®], Fa. Novartis, Nürnberg), Cyclophosphamid (CyP, Endoxan[®], MHH) und Steroiden immunsupprimiert ^{125 127 128 129 130}. Die Medikation mit CyA wurde am präoperativen Tag eingeleitet mit einer Dosierung von 100mg/kg KG. Nach der Transplantation orientierte sich die Dosierung am täglich gemessenen CyA-Blutspiegel, so dass dieser im Bereich von 400-600 ng/ml (Normalbereich für Primaten) zu liegen kam ^{131 132 133}. CyP wurde an den Tagen -1, 0 und +2 intravenös in einer Dosierung von 40, 10 bzw. 20 mg/kg KG gegeben. Im weiteren Verlauf dosierten wir CyP so, dass die Leukozytenwerte im Bereich von $2-4 \times 10^9/L$ lagen ^{128 129}. Steroide wurden wie folgt verabreicht: 1mg/kg KG Methylprednisolon (Urbason[®], Fa. Hoechst Marion

Roussel, Frankfurt/Main) i.v. an Tag 0, gefolgt von 1mg/kg KG Prednisolon (Decortin-H[®], Fa. Merck, Darmstadt) p.o. in der ersten postoperativen Woche. Danach wurde die Dosierung schrittweise reduziert auf eine Erhaltungsdosis von 0,2mg/kg KG.

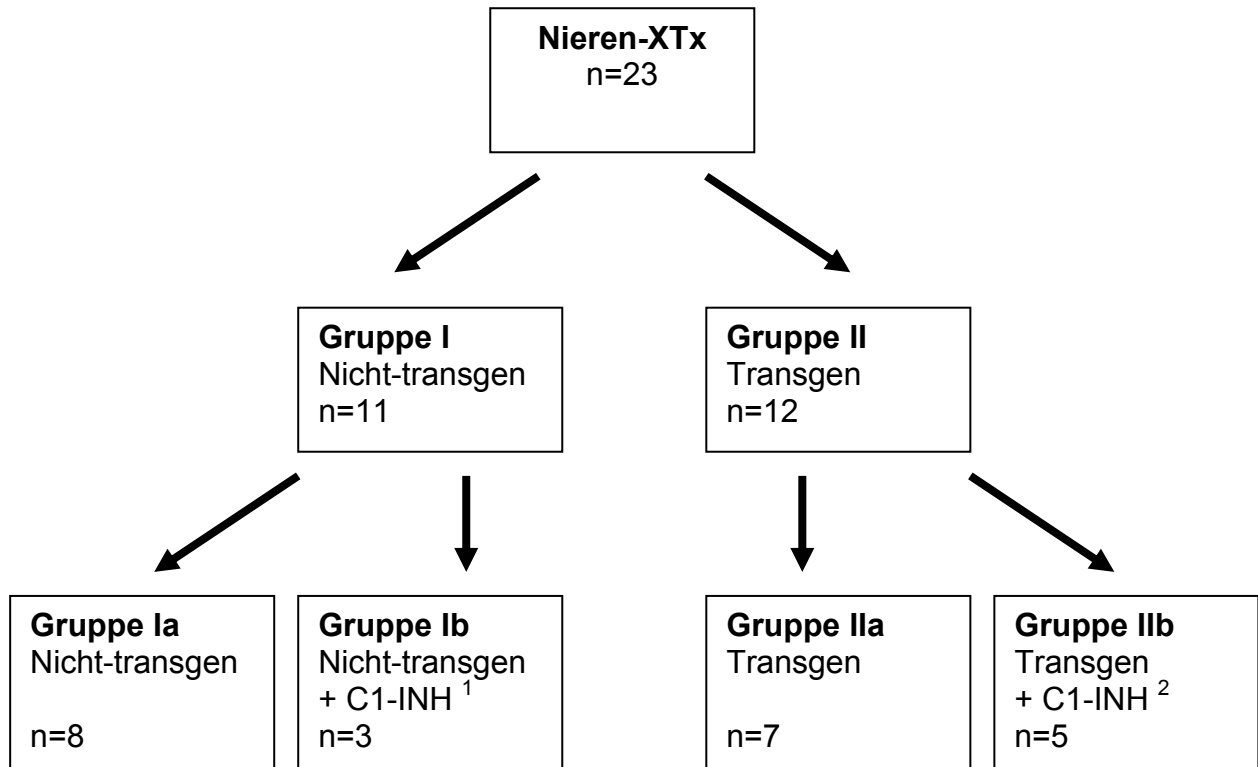
Bei einigen Tieren wurden aufgrund der im Verlauf der Experimente gefundenen Erfahrungen die CyP-Gaben auf eine Induktionstherapie bis zum Tag +2 beschränkt (Gruppe Ib). Zusätzlich wurde bei diesen Tieren zur Basisimmunsuppression Mycophenolat-Mofetil (MMF, Cellcept[®], Fa. Roche, Grenzach-Whylen), welches i.v. über Portanlage bzw. p.o. über Magensonde einmal täglich verabreicht wurde, appliziert. Auch hier wurde eine Blutspiegel-adaptierte Therapie (MPA Ziel-Spiegel 3-6 µg/ml) durchgeführt. Insgesamt wurde damit das immunsuppressive Regime näher an die klinische Situation in der Nieren-Allotransplantation angepasst.

Da bei manifester AVR ein Anstieg der Komplementspaltprodukte festgestellt werden konnte, wurde in Gruppe IIb zur Behandlung der AVR zusätzlich zu Steroid-Boli der Immunmodulator C1-INH (Berinert[®] HS, Fa. Centeon Pharma, Marburg) über 3 Tage eingesetzt. Bei den Tieren der Gruppe Ib wurde C1-INH als kontinuierliche tägliche Gabe verabreicht, so dass eine Gesamt-C1-INH Aktivität über 150 % erreicht wurde. Eine C1-INH Aktivität im Plasma von 150 % und darüber war gewünscht, da bei Tieren in den Gruppen Ia, IIa und IIb bei Werten unterhalb dieser Marke retrospektiv gehäuft Abstossungen zu beobachten waren. Die erste Gabe erfolgte 1 Stunde vor Reperfusion.

2.3.2. Behandlung von Abstossungsreaktionen

Abstossungsreaktionen wurden mit einer 3-tägigen Therapie bestehend aus intravenöser Gabe von Methylprednisolon (Urbason[®], Fa. Hoechst Marion Roussel, Frankfurt/Main) in einer Dosierung von 15 mg/kg KG plus einem einmaligen Bolus von 20 mg/kg KG CyP i.v. behandelt. Aufgrund der Ergebnisse aus den Messungen der Komplementspiegel während AVR in den vorausgehenden Experimenten der Gruppen Ia und IIa wurde bei insgesamt 5 Tieren (Gruppe IIb) zusätzlich zur Abstossungstherapie C1-INH (500 IE/Tag) über 3 Tage intravenös verabreicht.

Versuchsgruppen im Überblick



Ausgewertete Tiere :

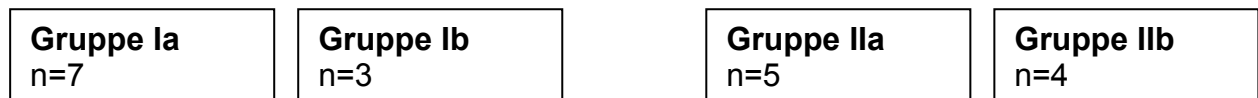


Abbildung 5: Einteilung der durchgeführten Nieren-Xenotransplantationen in Gruppen nach Art der verwendeten Spenderorgane und der eingesetzten Immunsuppression. Darunter: Tatsächlich ausgewertete Tiere nach Ausschluss von technischen Versagern. (¹ C1-INH als Basisimmunsuppression; ² C1-INH bei AVR-Therapie)

2.4. Postoperatives Management

Die Analgesie erfolgte unmittelbar postoperativ und im weiteren Verlauf bei Hinweis auf Schmerzen mit Buprenorphin (5-10 µg/kg KG i.m). Nach intramuskulär applizierter Kurznarkose mit Ketamin (Ketanest 10%[®], Fa. Parke-Davis, Berlin) wurden Körpergewicht, rektale Körpertemperatur, Hautturgor, Atemfrequenz sowie arterieller- und zentralvenöser Blutdruck täglich erfasst, die Lungen auskultiert sowie die Operationswunde inspiziert. Blutentnahmen (Vacutainer Systems, Fa. Becton Dickinson, UK) wurden durchgeführt, um das Blutbild (Abteilung für Hämatologie, MHH), Kreatinin, Harnstoff, Elektrolyte (Institut für klinische Chemie, MHH), CyA-Spiegel (EMIT 2000[®], Fa. Behringwerke, Liederbach), MMF-Spiegel und Komplementspiegel bestimmen zu können. Der 24-Stunden-Urin wurde zur Bilanzierung gesammelt und analysiert. Die i.v.-Medikation erfolgte über das am OP-Tag implantierte Portsystm. Da sich die perorale Medikation nur schwierig durchführen liess, wurde täglich eine Magensonde gelegt.

Eine antibiotische Prophylaxe bestand standardmässig aus Cefazolin (Elzogram[®], Fa. Lilly, Bad Homburg) 30 mg/kg KG und Cotrimoxazol (Cotrim[®], Fa. Ratiopharm, Ulm) 5 mg/kg KG.

Furosemid (Furosemid-Ratiopharm[®], Fa. Ratiopharm, Ulm) wurde postoperativ eingesetzt, um eine ausreichende Diurese aufrecht zu erhalten. Zunächst wurde es intravenös, später vorwiegend subkutan verabreicht. Die Dosierung orientierte sich hierbei an der zuvor ausgeschiedenen Urinmenge, der getrunkenen Wassermenge und an den Elektrolytwerten. Intravenöse Volumensubstitution erfolgte mit Natriumchloridlösung (NaCl, Fa. Braun Melsungen, Melsungen) bzw. Hydroxyethylstärke nach Bilanzierung.

Weitere Bedarfsmedikamente waren Diazepam (Diazepam-Ratiopharm[®], Fa. Ratiopharm, Ulm), Ranitidin (Ranitic[®], Hexal, Holzkirchen), Metoclopramid (Paspertin[®], Fa. Solvay, Hannover), Clemastin (Tavegil[®], Fa. Novartis, München), Ceftazidim (Fortum[®], Fa. Glaxo Wellcome, Bad Oldesloe) und Enrofloxacin (Baytril[®], Fa. Bayer, Leverkusen).

2.5. Klinische Definition der Abstossungsreaktionen

2.5.1. Hyperakute Abstossung

Als hyperakute Abstossungsreaktion (HAR) wurde eine sofort auftretende Dunkelverfärbung und Schwellung des Transplantates mit kompletter Thrombosierung innerhalb von 60 Minuten nach Reperfusion definiert. Die Transplantate zeigten weiterhin keine intraoperative Diurese, immunhistologisch fanden sich – anders als bei Organen ohne HAR – Ablagerungen von C5b-9 im Transplantat. Technische Fehler mussten zuvor ausgeschlossen werden ^{125 127}.

2.5.2. Akut vaskuläre Abstossung

Die AVR wurde nach klinischen Parametern diagnostiziert. Ein Anstieg der Kreatininwerte von über 20% gegenüber dem Ausgangswert wurde nach Ausschluss von anderen Ursachen wie Sepsis oder technischen Fehlern (z.B. Ureterstenose) als AVR gedeutet.

2.6. Bestimmung der Komplementspiegel im Plasma

Zur Bestimmung der Komplementspiegel wurde zunächst täglich mit EDTA antikoaguliertes Blut entnommen. Direkt nach Blutentnahme wurde die Probe für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert (Biofuge Primo 230 V, Fa. Heraeus, Hanau) und das Plasma bei -70°C bis zur Messung eingefroren. Die Konzentrationen des Komplementspaltproduktes C3a, sowie des terminalen Komplementkomplexes (TCC bzw. sC5b-9) wurden mit einem ELISA-Kit (Fa. Quidel, San Diego, USA) gemessen, bei denen eine Kreuzreaktion mit Cynomolgus-Komplement nachgewiesen ist (Firmeninterne Forschung der Fa. Quidel). Der Referenzbereich im Cynomolgusaffen wurde an 4 gesunden, nicht transplantierten Tieren ermittelt und stimmt mit dem menschlichen Referenzintervall überein. Die menschliche C3a-Konzentration im EDTA-Plasma liegt durchschnittlich bei 221,5 +/- 192,4 ng/ml. Für sC5b-9 werden 243,5 +/- 124 ng/ml gemessen.

2.6.1. Bestimmung der C3a-Konzentration

Es handelte sich um eine Sandwich-Technik, bei der die C3a-Fragmente aus der Probe mit monoklonalen Antikörpern der Maus, mit denen die Mikrotiterplatte beschichtet ist, gebunden werden. Nicht gebundene Komponenten werden herausgewaschen (Puffer mit 0,01% Thiomerosal). C3a-spezifische Antikörper aus dem Peroxidase beladenen Konjugat (Peroxidase-konjugiertes anti-human C3a vom Kaninchen) reagieren mit den an die Mikrotiterplatte gebundenen Komplexen. Nach einem erneuten Waschvorgang wird Substrat hinzugegeben und es kommt zur enzymatischen Spaltung unter Bildung eines Farbwechsels. Nach Zugabe einer Stopplösung (1 N H₂SO₄) wird die Reaktion terminiert und die optische Dichte kann bei 450nm gemessen werden (Anthos HTIII Elisareader, Anthos Mikrosysteme, Krefeld). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Kalibrierungskurve wurde C3a bekannter Konzentration aus humanem Plasma verwendet. Die Auswertung erfolgte rechnergestützt, um eine bestmögliche Annäherung (lineare Regression) zu erreichen.

Prinzip des ELISA zur Messung der Plasma Komplementspiegel

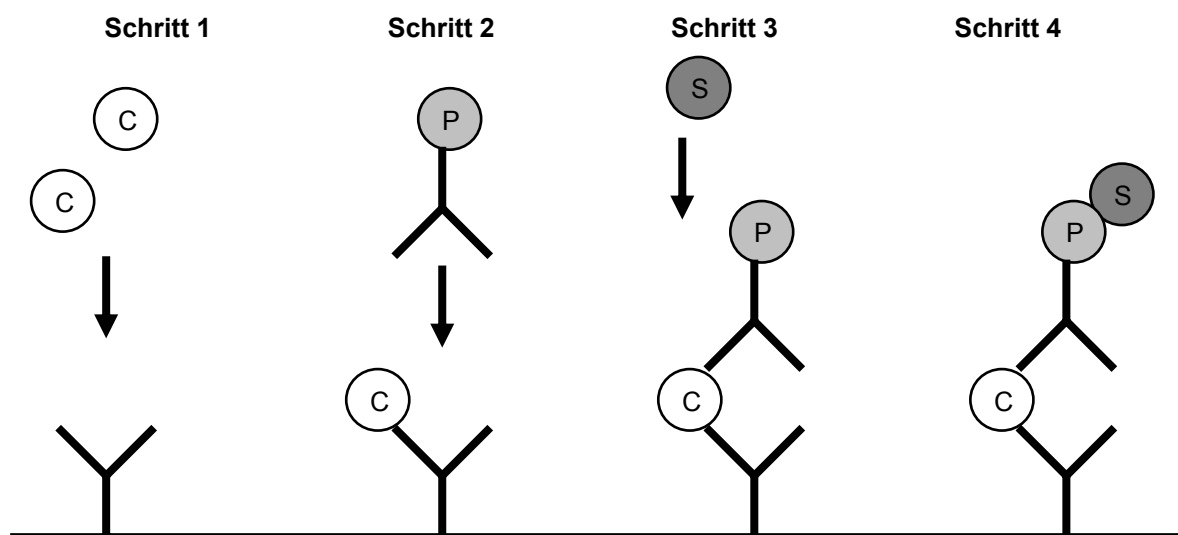


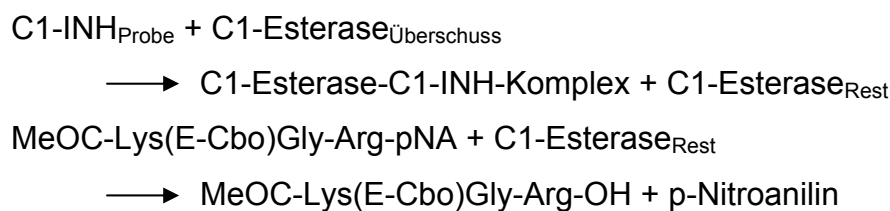
Abbildung 6: Durch die Reaktion des Substrates mit dem Antikörper-Peroxidase-Komplex kommt es zum photometrisch messbaren Farbwechsel (C=Complement, P=Peroxidase, S=Substrat).

2.6.2. Bestimmung der sC5b-9 Konzentration

Die Messung des TCC erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Als Konjugat wurde Peroxidase-konjugiertes anti-humanes sC5b-9 der Ziege verwendet. Substrat war 2-2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazol schweflige Säure) Diammonium Salz. Als Stopplösung diente 0,25 molare Oxalsäure.

2.7. Bestimmung der funktionellen C1-INH Aktivität im Plasma

Die funktionelle Aktivität des C1-INH wurde mit einer amidolytischen Methode (Berichrom[®], Fa. Dade Behring, Marburg) gemessen, bei der ein Überschuss an C1-Esterase und C₂H₅Co-Lys(E-Cbo)-Gly-Arg-pNa als Substrat vorliegt. Dabei hemmt C1-INH der Probe die vorgelegte C1-Esterase und damit die Abspaltung eines chromogenen Substrates. Die Restaktivität der C1-Esterase wird in einem kinetischen Test mit Extinktionszunahme bei 405nm bestimmt (Chromotimer[®], Fa. Behring Diagnostics, Marburg).



Als Probe wird Citratplasma verwendet, welches zuvor im Wasserbad zusammen mit den Reagenzien auf 37°C temperiert wurde. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei eine Abweichung von bis zu 10 % toleriert wurde. Der Referenzbereich wurde mittels gepooltem menschlichen Plasma (Standard-Human-Plasma, Fa. Dade Behring, Marburg) erstellt und liegt zwischen 70 und 130 %.

2.8. Statistische Auswertungen

Statistische Berechnungen wurden mittels Microsoft Excel 9.0 (Microsoft Cooperation, USA), GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., USA) sowie SPSS 10.0.7 für Windows durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Gruppeneinteilung

Im Zeitraum von 1997 bis 2001 wurden insgesamt 23 Nierentransplantationen durchgeführt. Diese lassen sich wie folgt einteilen:

Gruppenübersicht

Gruppe	h-DAF	n	Basis- Immunsuppression	Abstossungs- therapie	nicht auswertbare Tiere	auswertbare Tiere
Ia	Nein	8	CyP, CyA, Steroide	CyP, Steroide	1 Ureterstenose	7
Ib	Nein	3	CyP, CyA, Steroide, MMF, C1-INH	CyP, Steroide	0	3
IIa	Ja	7	CyP, CyA, Steroide	CyP, Steroide	1 Kardiovaskulärer Schock 1 V. cava Thrombose	5
IIb	Ja	5	CyP, CyA, Steroide	CyP, Steroide, C1-INH	1 Kardiovaskulärer Schock	4

Abbildung 7: Aufteilung der transplantierten Tiere nach Art des Spenderorgans (transgen vs. nicht-transgen), postoperativer Immunsuppression und Abstossungstherapie.

3.1.1. Gruppe Ia

Es handelte sich hierbei um eine Kontrollgruppe, bei der 8 nicht-transgene Nieren (Transplantatgewicht=22-90g; Median=40,5g; Mittelwert=50,9g) transplantiert wurden. Ein Tier mit einer Ureterobstruktion an Tag 6 musste euthanasiert werden, was als technisches Versagen gewertet wurde und nicht in die Auswertung einging. Bei den verbleibenden 7 Tieren wurden 2 hyperakute Abstossungen beobachtet. Diese Tiere mussten daraufhin am 1. bzw. 2. postoperativen Tag euthanasiert werden. Die Überlebenszeiten der 7 ausgewerteten Tiere betragen zwischen 1 und 11 Tagen (Median=3, Standardabweichung=3,7). Insgesamt zeigten nur 2 Tiere eine stabile Transplantatfunktion über den 4. postoperativen Tag hinaus. Bei diesen Tieren trat an Tag 8 bzw. 5 eine AVR auf, die mit der eingeleiteten Therapie aus CyP und Methylprednisolon nicht beherrscht werden konnte. Die beiden Tiere starben daraufhin an Tag 11 bzw. 7.

Überlebenszeiten der Tiere in Gruppe Ia

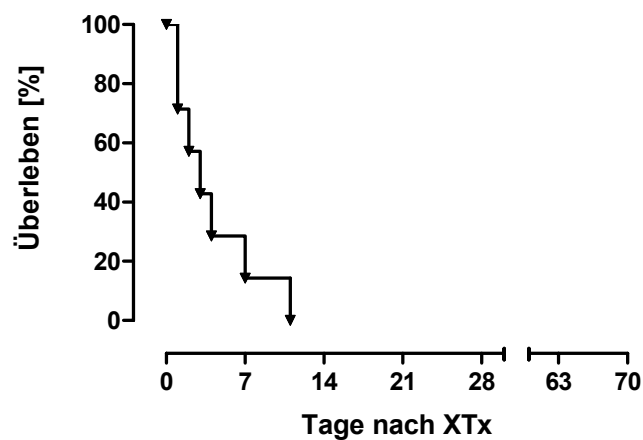


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeiten in Gruppe Ia (Median=3).

3.1.2. Gruppe Ib

Nach XTx von 3 nicht-transgenen Nieren wurde, zusätzlich zur Basisimmunsuppression mit CyP (als Induktionstherapie an Tag -1, 0, 2 und 4), MMF, CyA und Steroiden, täglich C1-INH in einer Dosierung von 250 IE intravenös appliziert, so dass ein endogener C1-INH Spiegel von 150 – 200 % funktioneller Aktivität über Normwert aufrecht erhalten wurde.

Alle 3 Tiere konnten in die Auswertung einbezogen werden. Bei keinem der 3 Tiere wurde eine HAR beobachtet. Eine AVR trat ebenfalls nicht auf. Jedoch verstarben die Tiere jeweils aufgrund eines fulminanten septischen Geschehens an den Tagen 5, 15 und 13 (Median=13, Standardabweichung=5,3) mit funktionstüchtigem Transplantat (letzter Kreatininwert jeweils 96, 112 und 96 $\mu\text{mol/l}$).

Überlebenszeiten der Tiere in Gruppe Ib

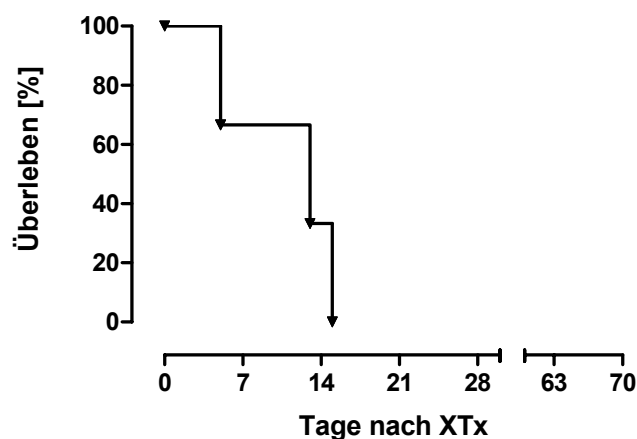


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeiten in Gruppe Ib (Median=13).

3.1.3. Gruppe IIa

In Gruppe IIa und IIb wurden h-DAF transgene Schweine als Organspender verwendet. Insgesamt wurden 12 transgene Schweinenieren (Transplantatgewicht=20-90g; Median=61,5g; Mittelwert=64,8g) mit immunhistochemisch gesicherter h-DAF Expression transplantiert. Es wurden zwei Untergruppen gebildet, die sich in der jeweiligen Abstossungstherapie bei manifester AVR unterschieden.

Die Tiere in Gruppe IIa sollten bei Auftreten einer AVR wie die nicht-transgene Kontrollgruppe Ia therapiert werden (CyP, CyA, Steroide). Von insgesamt 7 Tieren trat lediglich in einem Fall eine HAR auf. Dieses Tier verstarb an Tag 3 und hatte mit 349,5 MFI (mean fluorescence intensity) den höchsten in dieser Versuchsreihe gemessenen präoperativen antiporcinen IgM Antikörpertiter. Ein weiteres Tier aus dieser Gruppe starb am 1. postoperativen Tag an einem kardiovaskulären Schock (technischer Versager). Ein drittes Tier wurde aufgrund einer Thrombose der V. cava am 4. postoperativen Tag euthanasiert, was ebenfalls als technischer Versager gewertet wurde.

In den restlichen 4 Fällen setzte bereits intraoperativ eine Urinproduktion ein. Alle zeigten eine stabile Transplantatfunktion über den 4. postoperativen Tag hinaus. Bei diesen 4 Tieren wurde je eine AVR diagnostiziert (jeweils an den Tagen 9, 7, 6 und 12). Keine dieser 4 Episoden reagierte auf die Standard-Abstossungstherapie und die Tiere verstarben letztlich. Das Überleben in Gruppe IIa lag im Median bei 11 Tagen (Standardabweichung 4,4).

Überlebenszeiten der Tiere in Gruppe IIa

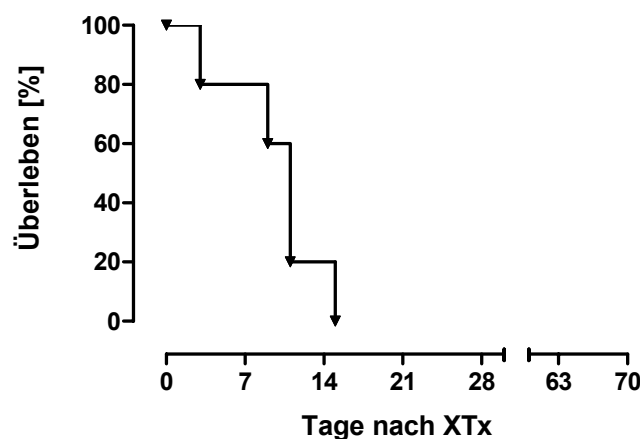


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeiten in Gruppe IIa (Median=11).

3.1.4. Gruppe IIb

Gruppe IIb umfasste 5 Tiere. Bei diesen Tieren sollte die Abstossungstherapie nach h-DAF transgener XTx bei AVR zusätzlich zur Standardtherapie mit täglich 500 IE C1-INH über 3 Tage erfolgen. 4 von 5 Tieren in dieser Gruppe hatten auch nach Tag 4 eine stabile Transplantatfunktion. Ein Tier verstarb intraoperativ an Herz-Kreislauf-Versagen und wurde als technischer Versager gewertet und aus den weiteren Auswertungen ausgeschlossen. Insgesamt wurden bei den verbleibenden 4 Tieren 12 Episoden einer AVR beobachtet. Davon wurden 7 zusätzlich mit C1-INH behandelt, worauf 6 dieser 7 AVRs erfolgreich respondierten. Das mediane Überleben betrug in Gruppe IIb 24,5 Tage (Range=18-68; Standardabweichung=23,2). In dieser Gruppe überlebte ein Tier 68 Tage, was bis heute als weltweit längstes Transplantatüberleben in diesem Modell (ohne Splenektomie des Empfängertieres) gilt.

Überlebenszeiten der Tiere in Gruppe IIb

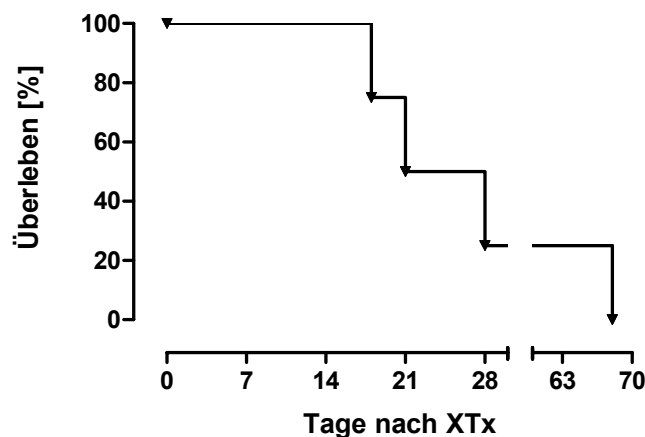


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeiten in Gruppe IIb (Median=24,5).

Der folgenden Tabelle sind nähere Daten der einzelnen Tiere zu Überlebenszeiten, Auftreten einer HAR oder AVR und Todesursachen zu entnehmen:

Die transplantierten Tiere im Einzelnen

Gruppe	Tier	h-DAF	Überleben	HAR	AVR	Todesursache
Nr	Nr	Ja/Nein	Tage	+/-	Tag	Diagnose
Ia	8/143	Nein	3	-	-	Urämie/Xg-Dysfunktion
Ia	9/323	Nein	2	+	-	HAR
Ia	10/1363	Nein	1	-	-	Pneumonie
Ia	11/135	Nein	4	-	-	Pneumonie
Ia	12/343	Nein	11	-	8	Abstossung
Ia	16/367	Nein	1	+	-	Lungenembolie/HAR
Ia	17/331	Nein	7	-	5	Abstossung
Ib	28/192	Nein	5	-	-	Septikämie
Ib	29/075	Nein	15	-	-	Septikämie
Ib	30/057	Nein	13	-	-	Septikämie
IIa	15/017	Ja	11	-	9	Abstossung
IIa	18/013	Ja	9	-	6	Abstossung
IIa	20/755	Ja	3	+	-	HAR
IIa	23/427	Ja	11	-	7	Abstossung
IIa	24/521	Ja	15	-	12	Abstossung
IIb	19/457	Ja	68	-	7,17,27,33,62	Hypophosphatämie
IIb	21/699	Ja	18	-	7,16	Pneumonie
IIb	26/057	Ja	28	-	3,13,21	Septikämie
IIb	27/023	Ja	21	-	5,15	Anämie

Nicht ausgewertet:

Ia	14/087	Nein	6	-	-	Ureterstenose
IIa	13/229	Ja	1	-	-	Kardiovaskulärer Schock
IIa	22/545	Ja	4	-	-	V. cava Thrombose
IIb	25/315	Ja	1	-	-	Kardiovaskulärer Schock

Abbildung 12: Art des Transplantates, Überleben, Auftreten einer HAR bzw. AVR und jeweilige Todesursache der Tiere im Einzelnen.

Im postoperativen Verlauf wurde bei den Empfängertieren regelmässig Blut abgenommen, um C3a und sC5b-9 im Plasma bestimmen zu können. Eine Auswertung dieser Daten erfolgte zum einen für die Zeit unmittelbar nach Transplantation (bis Tag 4, *Kapitel 3.2*), um die Rolle des Komplementsystems während Reperfusion des Organs und HAR beurteilen zu können und zum anderen während des Auftretens einer AVR (*Kapitel 3.4*).

3.2. Komplementspiegel unmittelbar nach Transplantation

3.2.1. Komplementspaltprodukt C3a

In Gruppe Ia wurde ein Anstieg des Komplementspaltproduktes C3a auf 136% an Tag 1 gegenüber dem präoperativen Wert (=100%) gemessen (Abbildung 13). Dies bedeutete einen realen Anstieg von durchschnittlich 177 auf 241 ng/ml. Am 2. postoperativen Tag fiel C3a wieder auf das Niveau der Vorwerte ab. Im Anschluss daran stieg der Spiegel ohne Therapie kontinuierlich bis auf 346% (Tag 4) gegenüber dem präoperativen Wert an.

In Gruppe Ib fielen dagegen die Werte von 247 präoperativ auf 35 ng/ml (14% des Ausgangswertes). An Tag 4 waren dann die Ausgangswerte wieder erreicht (317 ng/ml).

Bei Verwendung h-DAF transgener Spenderorgane (Gruppe II) kam es am 1. postoperativen Tag zu einem Abfall von C3a um 53% bezogen auf den Ausgangswert. Im weiteren Verlauf stiegen zwar auch hier die Werte an, jedoch war der Anstieg moderater als in der nicht-transgenen Gruppe und erreichte an Tag 4 lediglich 176% des Ausgangswertes. Die Subgruppen IIa und IIb konnten für diese Auswertung zusammengefasst werden, da sie sich erst bei Therapie einer AVR voneinander unterschieden, welche erst nach Tag 4 auftritt.

Postoperative C3a Komplementspiegel

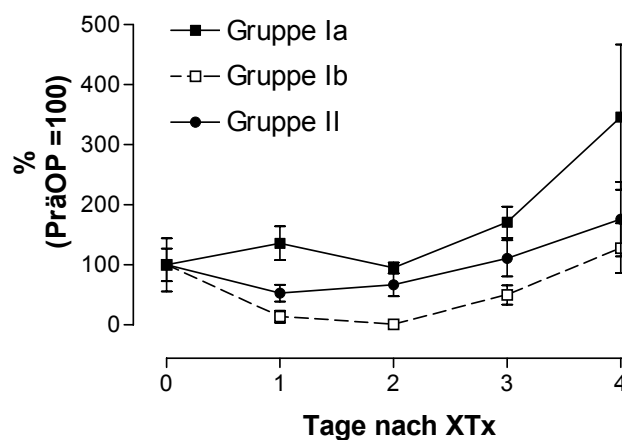


Abbildung 13: Plasma-Komplementspiegel (C3a) im frühen postoperativen Verlauf.

3.2.2. Komplementspaltprodukt sC5b-9

Bei Betrachtung der Ergebnisse für sC5b-9 (terminaler Komplementkomplex) fiel ein noch deutlicherer Unterschied zwischen den 3 Gruppen auf (Abbildung 14). Bei Verwendung der nicht-transgenen Nieren (Gruppe Ia) wurde ein starker Anstieg unmittelbar nach der Reperfusion gemessen. Präoperativ wurde hier ein Wert von allerdings nur 7 ng/ml gemessen, der bis zum Tag 4 auf 371ng/ml anstieg (in der Abbildung nicht darstellbar). In Gruppe Ib (kontinuierliche C1-INH Applikation) wurde an Tag 0 eine Konzentration von 242ng/ml und an Tag 4 nach zwischenzeitlichem leichtem Abfall 243 ng/ml gemessen, womit demnach die Ausgangswerte erreicht waren. In der transgenen Gruppe (Gruppe II) stieg der sC5b-9-Spiegel von 45ng/ml an Tag 0 bis auf 242ng/ml an Tag 4 an.

Postoperative sC5b-9 Komplementspiegel

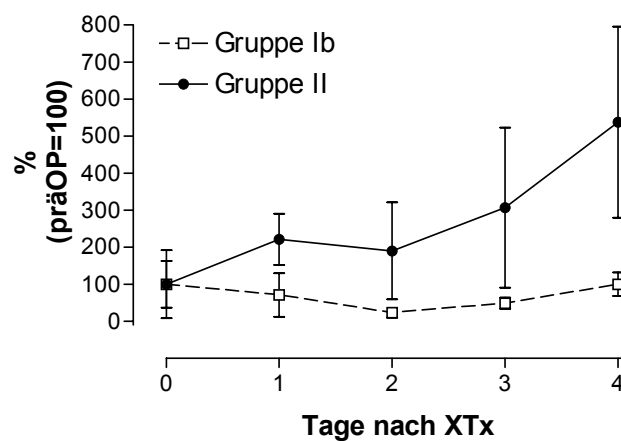


Abbildung 14: Plasma-Komplementspiegel (sC5b-9) im frühen postoperativen Verlauf.

3.3. Postoperative Nierenfunktionsparameter

Betrachtet man die postoperativen Kreatininwerte, so sieht man zunächst stets einen steilen Anstieg nach Transplantation. Bis Tag 2 unterscheiden sich die einzelnen Gruppen nicht deutlich voneinander. Erst danach wird ein Unterschied sichtbar. In Gruppe Ia stiegen die Kreatininwerte von präoperativ 73 $\mu\text{mol/L}$ auf 245 $\mu\text{mol/L}$ (336%) an Tag 4 an. In Gruppe II lagen die Ausgangswerte bei durchschnittlich 68 $\mu\text{mol/L}$ und stiegen bis Tag 4 um 397% auf 270 $\mu\text{mol/L}$. Die mit kontinuierlicher C1-INH Gabe behandelten Tiere (Gruppe Ib) hatten die durchschnittlich niedrigsten Kreatininwerte. Sie stiegen von 65 $\mu\text{mol/L}$ an Tag 0 zunächst auf 303 $\mu\text{mol/L}$ an, um dann kontinuierlich auf 192 $\mu\text{mol/L}$ (295%) an Tag 4 abzufallen. Die Unterschiede im frühen postoperativen Kreatininverlauf zwischen den 3 Gruppen waren allerdings nicht signifikant. Die ebenfalls gemessenen Harnstoffwerte (hier nicht gezeigt) verhalten sich synchron in Bezug zu den Kreatininwerten. Ihre Änderungen sind zeitlich um ca. einen Tag versetzt.

Postoperative Kreatininpiegel

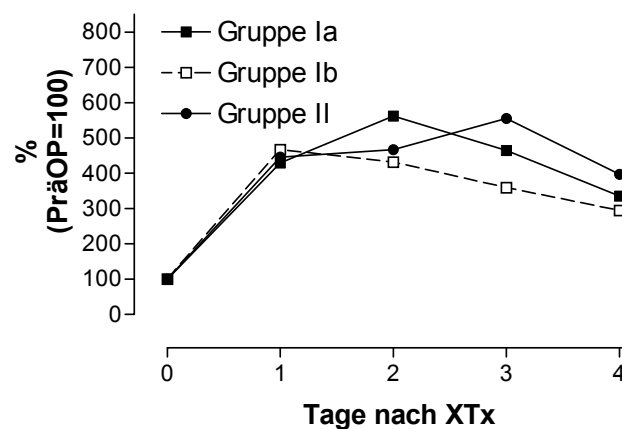


Abbildung 15: Die Kreatininpiegel im frühen postoperativen Verlauf.

3.4. Komplementspiegel während AVR

Bei einem Anstieg des Kreatininwertes von 20 % gegenüber dem Vorwert wurde eine AVR diagnostiziert und eine Therapie eingeleitet. Insgesamt wurden in Gruppe II (transgene Spender) 12 Nieren transplantiert (Gruppe IIa: 7; Gruppe IIb: 5). Schliesst man die 3 technischen Versager von dieser Auswertung aus, verbleiben 9 Tiere, bei denen insgesamt 16 Episoden einer AVR auftraten. 7 AVR wurden zusätzlich zur Standardtherapie aus CyP und Methylprednisolon mit C1-INH behandelt (Gruppe IIb). Retrospektiv wurden bei allen Tieren die Komplementspaltprodukte C3a sowie sC5b-9 im Plasma bestimmt.

Bei den Tieren, die ein h-DAF transgenes Xenotransplantat erhalten hatten und bei denen die AVR mit einer Standardtherapie behandelt wurde (Gruppe IIa), zeigte sich, dass bereits 1 Tag vor klinischer Diagnosestellung der AVR ein deutlicher Anstieg der Komplementfaktoren C3a und sC5b-9 festzustellen war (Abbildung 16). Die C3a Werte stiegen auch am Folgetag nach Diagnosestellung der AVR weiter an, um anschliessend kontinuierlich zu fallen. Der Ausgangswert an Tag -3 betrug 523 ng/ml (SEM = 97) und stieg bis Tag +1 auf 759 (SEM = 114), was einem prozentualen Anstieg um 45% entsprach.

Der Höchstwert der sC5b-9 Werte war am Tag der Diagnosestellung der AVR mit 790 (SEM = 245) erreicht. Der Ausgangswert von Tag -3 von 348 (SEM = 202) war somit um 127% gesteigert.

Die Abfälle in den C3a und sC5b-9 Spiegel nach Diagnosestellung der AVR waren teilweise bedingt durch den Tod einzelner Tiere mit sehr hohen Komplementkonzentrationen bei Ineffektivität der AVR-Therapie.

Komplementspiegel während AVR unter Standardtherapie

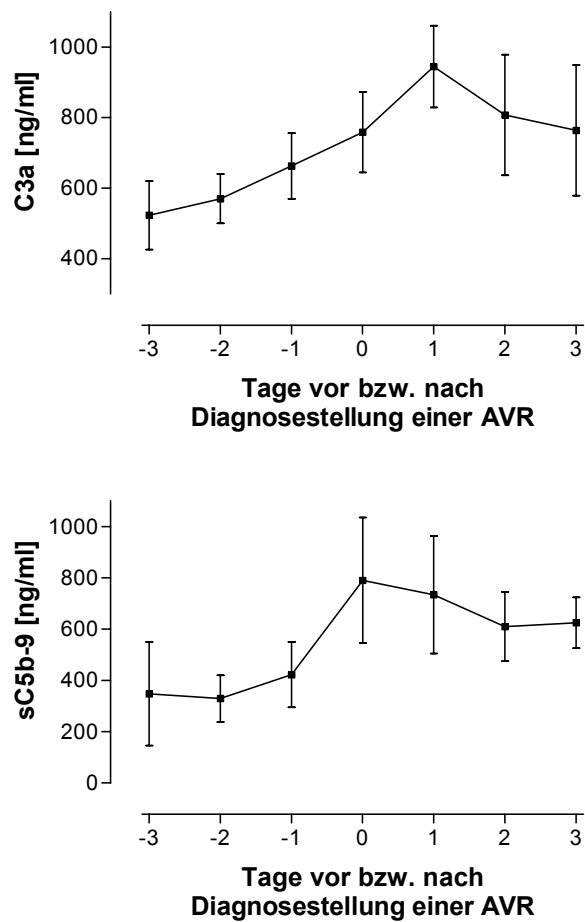


Abbildung 16: Verlauf der Plasma-Komplementspiegel C3a und sC5b-9 während AVR unter Standard AVR-Therapie nach Transplantation transgener Nieren (Gruppe IIa).

3.5. Untersuchungen zum C1-INH

Aufgrund der gezeigten massiven Komplementaktivierung während manifester AVR mit konsekutiver Organschädigung trotz Expression des membrangebundenen Komplementinhibitors h-DAF erschien eine zusätzliche Komplementinhibition sinnvoll. Hierfür wurde angereinigter C1-INH eingesetzt.

C1-INH ist ein löslicher Serinesteraseinhibitor, welcher bereits zu Beginn des klassischen Komplementweges angreift und den alternativen Weg unbeeinflusst lässt. Um grobe pharmakokinetische Aussagen über C1-INH in unserem Modell machen zu können, wurde dessen funktionelle Aktivität an 2 gesunden, nicht transplantierten Cynomolgus-Affen über 24 Stunden gemessen.

C1-INH Pharmakokinetik

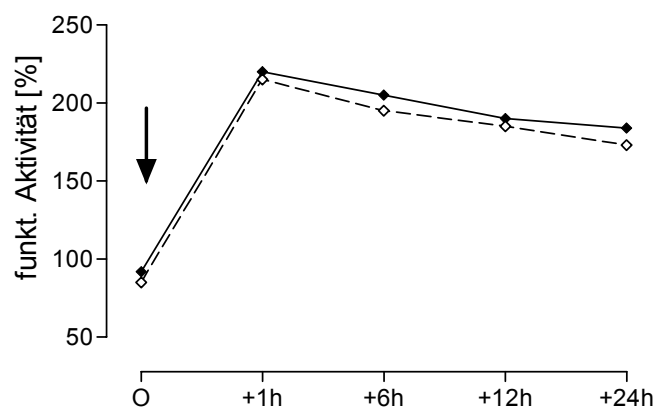


Abbildung 17: Funktionelle C1-INH Aktivität über 24 Stunden in 2 gesunden, nicht-transplantierten Tieren nach einmaliger intravenöser Gabe von 500 IE C1-INH.

Es wurde ein rascher Anstieg der funktionellen C1-INH Aktivität nach intravenöser Gabe von 500 IE auf über 200 % und ein nur langsam fallender Spiegel über 24 Stunden beobachtet. Die Halbwertszeiten betragen 72 und 90 Stunden. Die Clearance-Halbwertszeit beim Menschen liegt bei ungefähr 28 Stunden ¹³⁴. Die Grundaktivität von C1-INH in gepooltem menschlichen Plasma liegt zwischen 70 und 130 %, was sich mit den beim Affen gefundenen Werten deckt.

3.6. Komplementspiegel während AVR unter C1-INH Therapie

Bei den Tieren der Gruppe IIb wurde zusätzlich zur Bolus-Therapie mit CyP und Steroiden jeweils 500 IE (basierend auf den pharmakokinetischen Daten der zwei in Abbildung 17 gezeigten Tiere) C1-INH über drei Tage verabreicht. Die Analyse der Plasma-Konzentrationen von C3a und sC5b-9 in dieser Tiergruppe ergab, dass unter C1-INH-Therapie die Konzentrationen der beiden gemessenen Komplementspaltprodukte deutlich geringer als in Gruppe IIa waren (Abbildung 18; Werte dargestellt als prozentuale Abweichung von Tag 0 als dem Tag der Diagnosestellung). Sowohl die Werte für C3a als auch die für sC5b-9 lagen nach C1-INH Behandlung sogar unterhalb der 3 Tage vor Diagnosestellung ermittelten Werte. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war ab Tag +1 sowohl bei den absoluten C3a- als auch sC5b-9 Werten statistisch signifikant ($p < 0,05$; T-Test für unabhängige Stichproben).

Unter der Standardtherapie der AVR (CyP und Steroide) stieg der Kreatininwert der behandelten Tiere trotz Therapie weiter an. In der Tiergruppe mit zusätzlicher C1-INH Therapie blieb der Kreatininwert unter Therapie konstant, dieses entsprach klinisch einem Ansprechen der behandelten Tiere auf die Therapie in 6 von 7 behandelten Episoden (siehe unten).

Komplement- und Kreatininspiegel während AVR

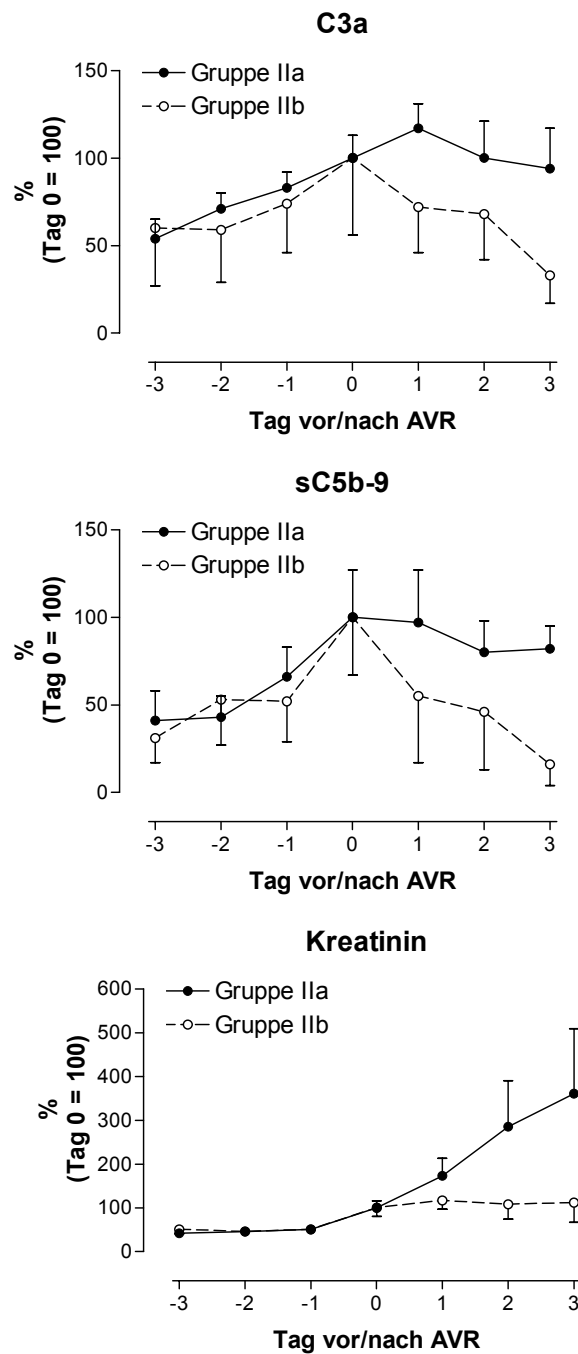


Abbildung 18: Abgebildet sind die C3a-, sC5b-9- sowie Kreatininwerte (von oben nach unten) als prozentuale Abweichung von Tag 0 als dem Tag der Diagnosestellung (Gruppe IIa vs. Gruppe IIb).

Abbildung 19 fasst die Responseraten bei AVR Therapie nach Tiergruppen getrennt zusammen.

In Gruppe Ia traten lediglich 2 AVRs auf, welche nicht auf die Standardtherapie ansprachen.

In den 5 auswertbaren Tieren in Gruppe IIa trat bei 4 Tieren je eine AVR auf, welche jedoch ebenfalls nicht erfolgreich mit der Standardtherapie behandelt werden konnten.

Unter Hinzunahme von C1-INH zur Abstossungstherapie in Gruppe IIb respondierten 6 von 7 aufgetretenen AVRs (86%). Es wurden erstmalig mehrere AVRs hintereinander in einem Tier beobachtet und das mediane Überleben stieg auf 24,5 Tage.

Bei den 3 Tieren, die eine kontinuierliche C1-INH Gabe erhalten hatten (Gruppe Ib), wurde keine AVR gesehen.

AVR-Therapie und Erfolgsrate

Gruppe	Transplantat + Abstossungstherapie	therapierte AVRs	Response
Ia	n-tg + Standard	2	0 / 2 (0%)
Ib	n-tg + kontinuierlich C1-INH	0	-
IIa	tg + Standard	4	0 / 4 (0%)
IIb	tg + Standard mit C1-INH	7	6 / 7 (86%)

Abbildung 19: Übersicht aller therapierten AVRs mit Responseraten aufgeschlüsselt nach Therapieverfahren der AVR.

3.7. Klinischer Verlauf

Die Urinproduktion setzte intraoperativ in Gruppe Ia bei 4 von 8 (50%), in Gruppe Ib bei 3 von 3 (100%), bei Gruppe IIa bei 5 von 7 (71%) und in Gruppe IIb bei 4 von 5 (80%) Tieren ein. Erwartungsgemäss zeigte die nicht-transgene Kontrollgruppe mit nur 50 % die geringste Rate an initialer Urinproduktion. Bei Komplementinhibition durch Expression des membranständigen h-DAF in den porcinen Nieren der Gruppe II stieg die Initialfunktionsrate auf 71 (Gruppe IIa) bzw. 80% (Gruppe IIb). Die beiden Gruppen IIa und IIb unterschieden sich hier im Ergebnis nicht deutlich voneinander, da die zusätzliche C1-INH Gabe in Gruppe IIb erst ab der ersten AVR erfolgte und die beiden Subgruppen somit bis zum Auftreten einer AVR identisch waren.

Die Tiere der Gruppe Ia, bei denen bereits vor Reperfusion mit der C1-INH Therapie begonnen wurde, zeigten mit 100% (3 von 3 Tieren) am häufigsten eine initiale Grafffunktion.

Diese Beobachtungen in den 4 Gruppen korrespondieren sehr gut mit den gemessenen Komplementspiegeln unmittelbar nach Transplantation.

Trotz der theoretisch denkbaren physiologischen und metabolischen Inkompatibilitäten zwischen den beiden Spezies waren die porcinen Nieren bis zu einem maximalen Überleben von 68 Tagen in der Lage, die biochemischen Parameter der Nierenfunktion auch im Affen aufrecht zu erhalten.

Unmittelbar nach der Transplantation waren die Nierenfunktionsparameter Kreatinin und Harnstoff meist deutlich erhöht und fielen in den ersten postoperativen Tagen ab. Die Retentionsparameter waren danach im Verlauf weitestgehend konstant bis zum Auftreten einer AVR. Ein Harnstoffanstieg war dabei meist erst einen Tag nach Kreatininanstieg erkennbar. Konnte eine AVR nicht therapiert werden, so wurde das Tier daraufhin ca. 3-5 Tage später euthanasiert.

In den folgenden beiden Abbildungen wurden die gemessenen Nierenfunktionsparameter Kreatinin und Harnstoff am Beispiel des Tieres #19/457 (Gruppe IIb) graphisch dargestellt:

Nierenfunktionsparameter im postoperativen Verlauf

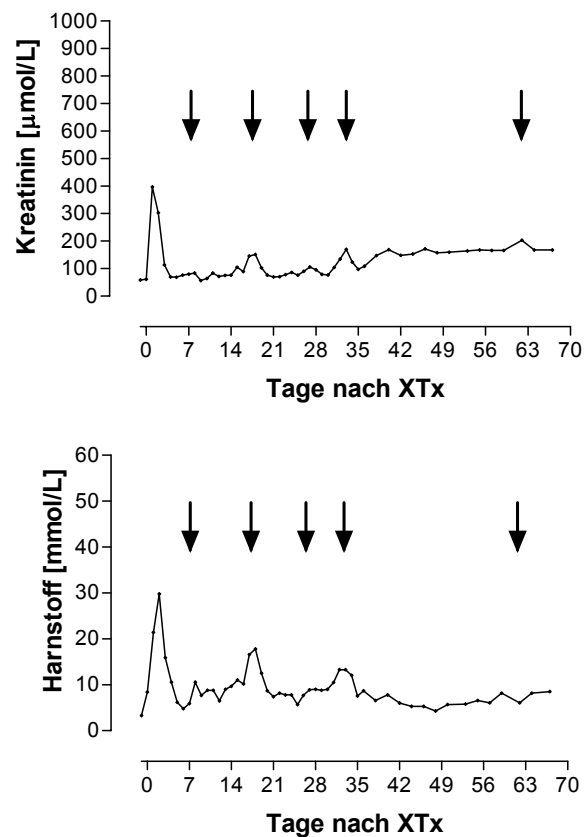


Abbildung 20: Kreatinin- und Harnstoffverlauf bei Tier #19/457. AVR gekennzeichnet durch Pfeil an den Tagen 7, 17, 27, 33 und 62.

Im folgenden wird der klinische Verlauf zweier weiterer Tiere aus Gruppe IIb gezeigt (Abbildung 21 und 22), um die Abläufe unter Abstossungstherapie mit C1-INH zu demonstrieren. Bereits vor Erkennbarkeit einer beginnenden AVR anhand des steigenden Kreatininwertes liess sich ein Anstieg der Komplementfaktoren C3a und sC5b-9 im Plasma nachweisen. Nach Applikation von C1-INH (Pfeile) stieg dessen funktionelle Aktivität auf Werte um 200% an und die Komplementspiegel (C3a und sC5b-9) fielen konsekutiv ab.

Bei Tier 26/057 (Abbildung 21) normalisierten sich die Kreatininwerte jeweils wieder. Bei Tier 27/023 (Abbildung 22) entwickelte sich eine therapierefraktäre Abstossung nach erfolgreicher Therapie einer ersten Episode einer AVR.

Der initiale Anstieg der C3a und sC5b-9 Spiegel nach Reperfusion (Abbildung 21 und 22; Tag 1) war stets zu finden (*siehe auch Kapitel 4.2*).

Klinischer Verlauf bei Tier 26/057 (Gruppe IIb)

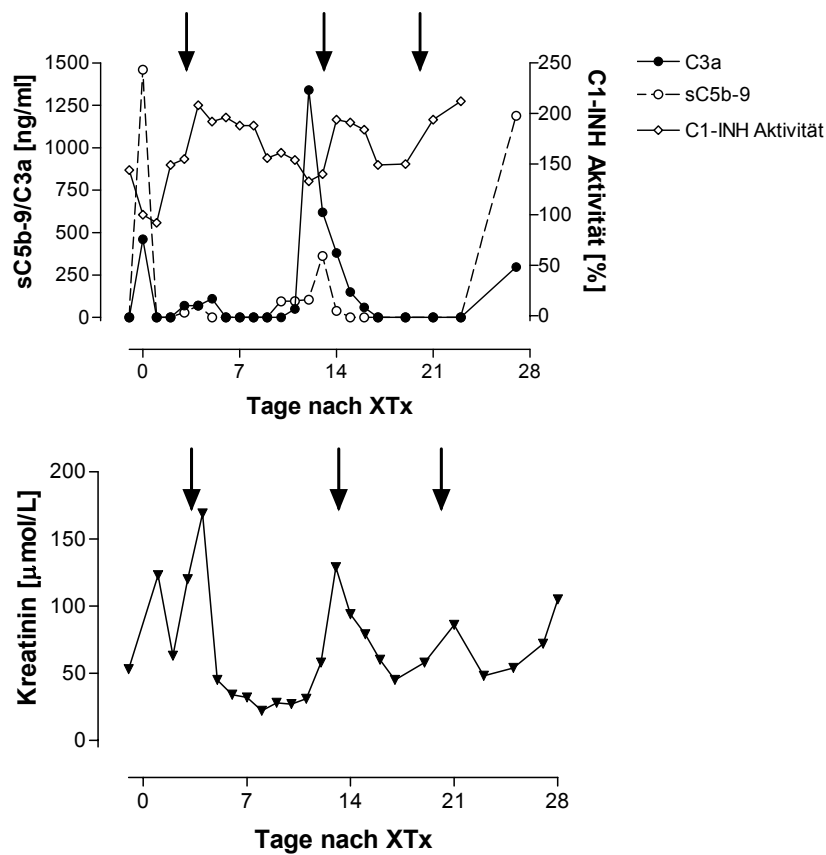


Abbildung 21: Bei diesem Tier wurde an den Tagen 3, 13 und 21 eine AVR diagnostiziert (Pfeile). Zusätzlich zur Standard-Abstossungstherapie wurde mit C1-INH behandelt.

Klinischer Verlauf bei Tier 27/023 (Gruppe IIb)

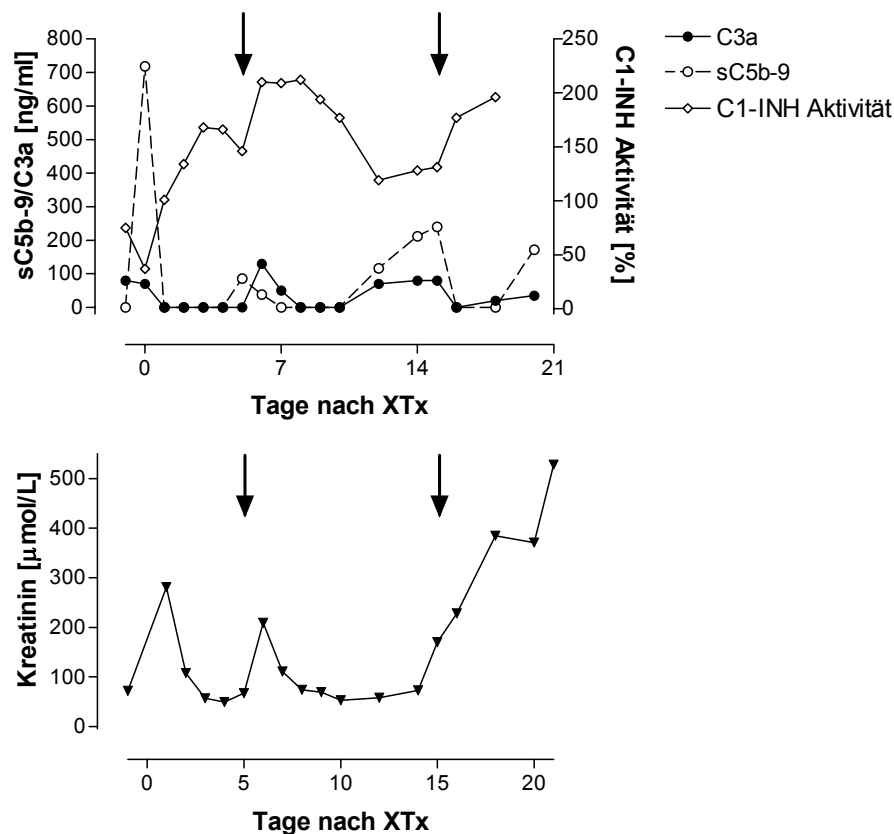


Abbildung 22: Bei diesem Tier aus Gruppe IIb konnte die erste AVR an Tag 5 erfolgreich behandelt werden. Ab Tag 15 stiegen die Retentionswerte an und das Tier verstarb an Tag 21 (therapierefraktäre AVR).

3.8. Immunhistologie

Sowohl hyperakut abgestossene Organe als auch solche Organe, die keiner HAR unterlagen zeigten nach Reperfusion immunhistochemisch endotheliale und glomeruläre Ablagerungen von IgM und IgG. Die Menge an C3 Ablagerungen war ebenfalls in beiden Gruppen etwa gleich, wohingegen C5b-9 Ablagerungen bei HAR stärker auftraten. Die immunhistochemischen Färbungen der transgenen Schweinenieren zeigten im zeitlichen Verlauf einer AVR trotz stets vorhandener h-DAF Expression eine zunehmende Ablagerung von Antikörpern und Komplementkomponenten (insbesondere C5b-9) des Empfängers auf dem porcinen Endothel. Bei Hinzunahme von C1-INH zur Abstossungstherapie waren diese Ablagerungen zum grossen Teil reversibel (Abbildung 23; Dissertation cand. med. J. Schmidtko).

Immunhistologie im sequentiellen Verlauf

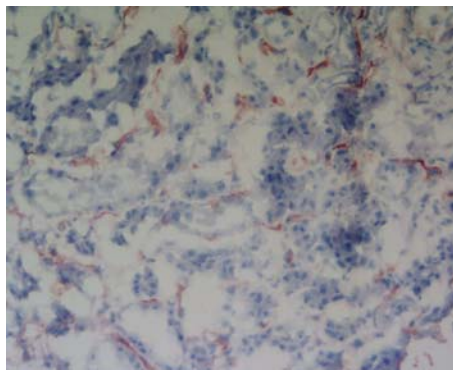
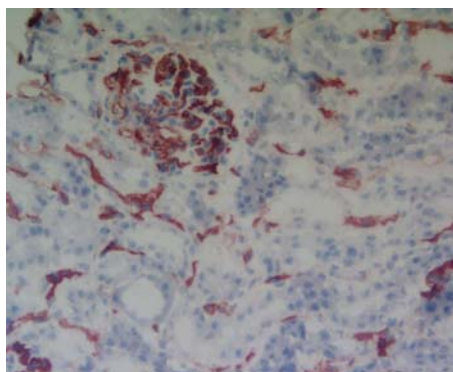
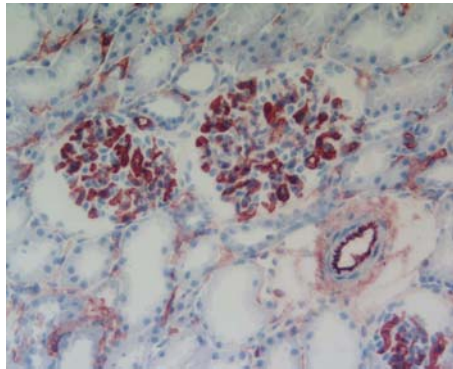


Abbildung 23: Nach Reperfusion (Oben) ist eine C3a Ablagerung in den Glomeruli erkennbar. Diese nimmt bei manifester AVR an Tag 5 deutlich zu mit zusätzlicher tubulärer Ablagerung (Mitte). Nach C1-INH Therapie (Biopsie an Tag 12, Unten) sind die C3a Ablagerungen nur noch gering ausgeprägt.

3.9. Kontinuierliche Gabe von C1-INH zur AVR-Prophylaxe

Nachdem C1-INH bei der Abstossungstherapie mit gutem Erfolg eingesetzt wurde, sollte der Effekt einer kontinuierlichen, täglichen Gabe des C1-INH bei 3 Tieren überprüft werden (Gruppe Ib, nicht transgen, n=3). Im Idealfall sollte das Auftreten einer AVR verhindert werden. Die erste intravenöse Applikation erfolgte intraoperativ 1 Stunde vor Reperfusion. Die funktionelle C1-INH Aktivität sollte zwischen 150 und 200 % zu liegen kommen, da beginnende Abstossungen in der Vergangenheit stets bei einer Aktivität unter 150 % auftraten (Gruppe IIb).

Unter der kontinuierlichen C1-INH Gabe wurde keine HAR und keine AVR beobachtet. Die funktionelle C1-INH Aktivität konnte zwischen 150 und 200 % eingestellt werden und zeigte auch im interindividuellen Vergleich eine geringe Schwankungsbreite. Die Kreatininwerte fielen postoperativ unterschiedlich schnell ab und blieben anschliessend konstant auf niedrigem Niveau. Selbst eine Niere mit intraoperativ schlechter Initialfunktion aufgrund technischer Probleme bei Reperfusion und daraufhin postoperativ hohen Kreatininwerten im Empfängerserum zeigte nach wenigen Tagen normale Werte.

Jedoch verstarben letztlich alle 3 Tiere an einem fulminanten septischen Geschehen. In der Blutkultur konnten Bakterien (*E. coli*, *E. faecalis*, *Streptokokkus ssp.* und *S. aureus*) nachgewiesen werden. Die Nierenfunktion blieb dabei stets intakt: die jeweils zuletzt gemessenen Kreatininwerte lagen bei 96, 96 und 112 $\mu\text{mol/L}$.

Im folgenden sind die klinischen Verläufe dieser 3 Tiere dargestellt:

Klinischer Verlauf unter kontinuierlicher C1-INH Therapie

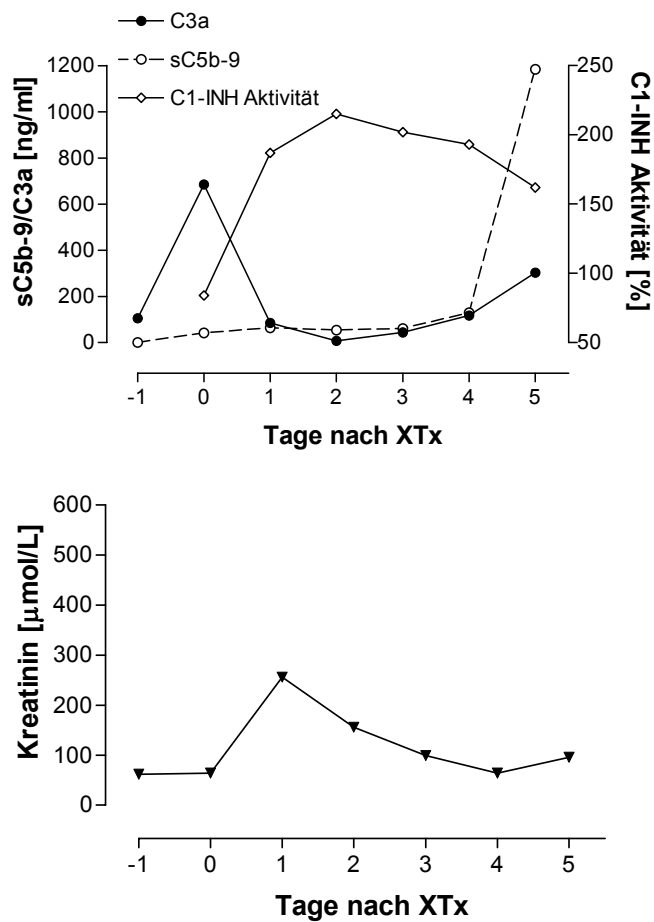


Abbildung 24: Tier #28/192 zeigte initial einen stabilen klinischen Verlauf, verstarb jedoch an Tag 5 an einem fulminanten septischen Geschehen.

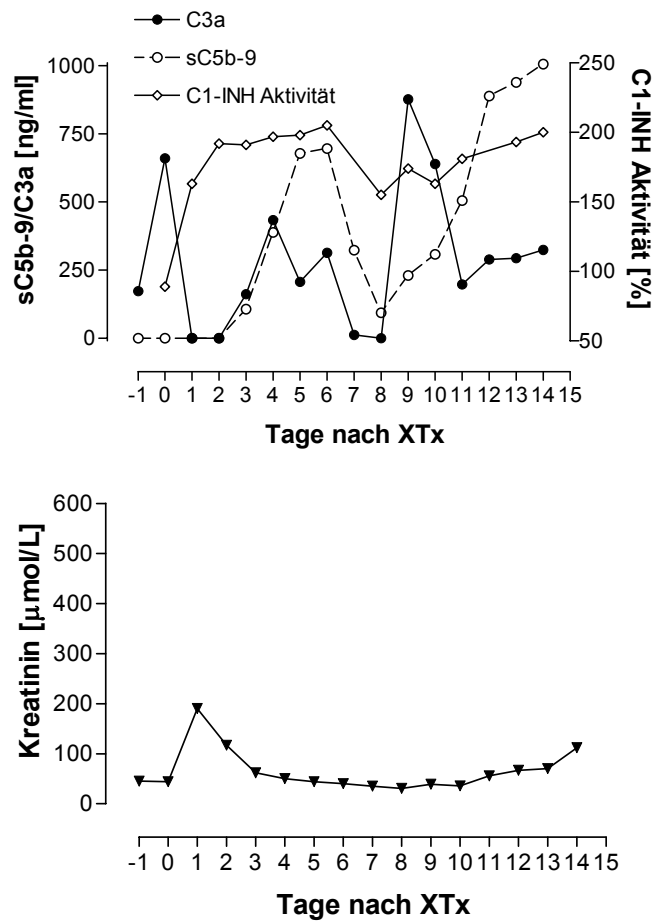


Abbildung 25: Tier #29/057 zeigte einen stabilen klinischen Verlauf. Das Tier verstarb an Tag 15 an einer fulminanten bakteriellen Sepsis.

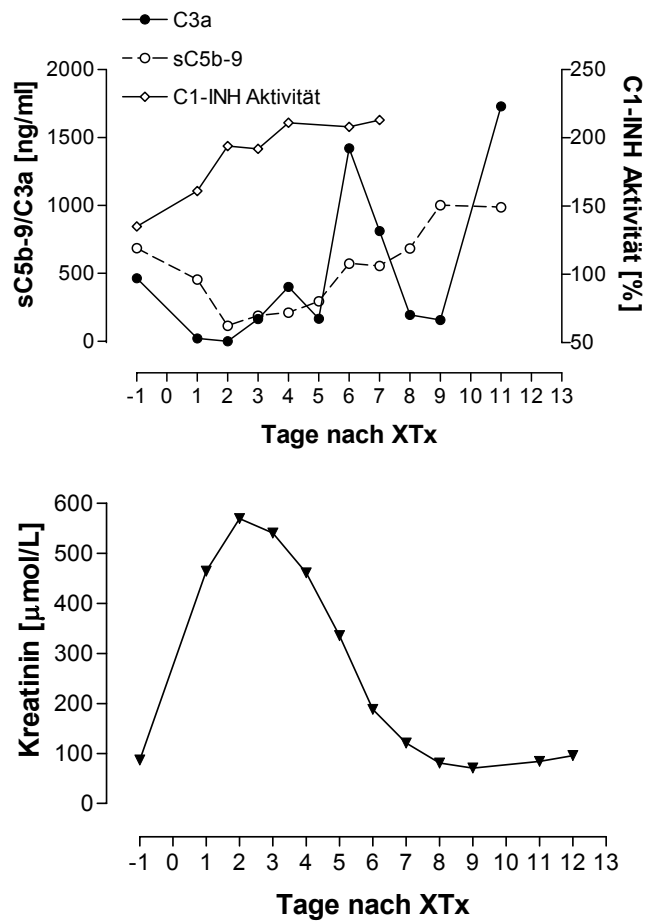


Abbildung 26: Bei Tier #30/057B wurden Anfangs sehr hohe Kreatininwerte gemessen, die Transplantatniere nahm dann jedoch ihre Funktion auf (Das Transplantat war intraoperativ im Rahmen der Reperfusion bereits makroskopisch geschädigt worden). Das Tier verstarb an Tag 13 an einer fulminanten bakteriellen Sepsis.

4. Diskussion

Zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Analyse von posthyperakuten Rejektionsmechanismen nach diskordanter Transplantation porciner Nieren in Javaner-Affen. Ein besonderer Schwerpunkt wurde hierbei auf die Pathophysiologie der akut vaskulären Abstossung (AVR) nach diskordanter Xenotransplantation gelegt, über die im Primatenmodell zum Zeitpunkt der Initiierung dieser Arbeit nur sehr fragmentarische Informationen vorlagen. Dieses war u.a. dadurch bedingt, dass bisher nur eine Arbeitsgruppe, D. White in Cambridge, im Primatenmodell stabile Xenotransplantat-Funktionen über mehrere Tage erreicht hatte, da primäre Voraussetzung für die Untersuchung der AVR bzw. nachgeschalteter Abstossungsmechanismen gegen das Xenotransplantat die Überwindung der hyperakuten Abstossungsreaktion ist.

4.1. Hyperakute Abstossung (HAR)

In den letzten Jahren wurden verschiedene Massnahmen entwickelt, um die regelhaft nach diskordanter Xenotransplantation auftretende HAR zu inhibieren. Diese Abstossungsreaktion ist Folge der Bindung von vorbestehenden Empfänger-Antikörpern gegen das xenogene Endothel. Eine Möglichkeit besteht darin, die Bindung dieser natürlichen Antikörper (XNA) des Empfängers an das xenogene Endothel, insbesondere an die α -1,3-Gal-Epitope, zu unterbinden ^{135 136}. Es ist ausserdem möglich, die XNA des prospektiven Organempfängers zu neutralisieren oder aus seinem Blut herauszufiltern (z.B. durch Plasmapherese) ¹³⁷. Auf der anderen Seite wird versucht, die Antigenexpression im Donororgan zu minimieren. Dies kann sowohl gentechnisch, als auch durch Selektion niedrig exprimierender Stämme geschehen.

Eine genauere Analyse der XNA hat die Entwicklung spezifischer Therapeutika ermöglicht, welche die Antigen-Antikörper-Reaktion verhindern sollen. Anti-humane Immunglobuline ^{138 139}, gereinigte Gal- α -1,3-Gal-Fragmente ¹⁴⁰ oder Peptidfragmente ¹⁴¹ wurden verwendet, um die XNA aus dem Empfängerblutkreislauf möglichst vollständig zu eliminieren bzw. zu inaktivieren ^{142 143}. So ist beispielsweise das α -1,3-Gal Analogon GAS 914 in der Lage, das Auftreten der HAR (und auch AVR; siehe unten) nach h-DAF transgener Nierentransplantation positiv zu beeinflussen ¹⁴⁴. Die einzelnen Versuche die HAR zu verhindern sind jedoch mit z.T. starken

unerwünschten Begleitreaktionen verbunden. Bei Verwendung von synthetischen Oligosacchariden beispielsweise kann es zum Auftreten schädlicher Immunkomplexe kommen ¹⁴⁵.

Die von uns eingesetzte Basisimmunsuppression bei Verwendung nicht-transgener Spenderorgane bestehend aus CyP, CyA und Steroiden war erwartungsgemäss allein ebenfalls nicht ausreichend, eine HAR zuverlässig in allen Fällen zu verhindern. Die immunsuppressive Therapie inhibierte auch nicht die Synthese neuer anti-Gal- α 1,3-Gal-Antikörper. Lediglich im Schwein-auf-Pavian-Xenotransplantationsmodell scheint es unter sehr hohen Cyclophosphamid-Dosen möglich zu sein, die XNA-Synthese dauerhaft zu supprimieren ¹⁴⁶. Nicht-Knochenmarksablative Bestrahlung in Kombination mit einer medikamentösen Immunsuppression und/oder Splenektomie inhibiert ebenfalls die XNA-Synthese ^{147 148}. Eine weitere elegante Möglichkeit zur Lösung wäre dagegen die Induktion einer B-Zell-spezifischen Toleranz gegen Gal- α 1,3-Gal. Toleranzentwicklung ist auch durch Induktion eines Chimärismus denkbar ¹⁴⁹.

Mit der Unterdrückung der Komplementaktivierung besteht ebenfalls eine sehr effiziente Möglichkeit der Verhinderung einer HAR. Schon länger ist bekannt, dass es bei manifester HAR zu einem Anstieg der Komplementfaktoren im Empfängerblut kommt ^{13 43 61}. Die Komplementaktivierungskaskade mündet letztlich über die Ausbildung des membranen Angriffskomplex (MAC) auf der porcinen Endotheloberfläche in der vollständigen Zerstörung des Organs. Im wesentlichen wurden zwei Möglichkeiten besprochen, diese Komplementaktivierung zu unterdrücken: Zum einen können systemisch applizierte, lösliche Komplementinhibitoren im Empfänger appliziert werden, zum anderen lassen sich mit gentechnischer Hilfe zusätzliche z.B. humane komplement-regulierende Faktoren (RCA) in das Xenotransplantat einbringen.

Erste Ergebnisse mit löslichen Komplementregulatoren und mit Antikörpern gegen Komplementfaktoren waren vielversprechend ^{75 87 150 151 152 153 154 155 156 157 158}. Proteaseinhibitoren wurden ebenfalls zur Komplementinhibition verwendet. Ein schon lange bekanntes Schlangengift, der Cobra Venom Factor (CVF), ist ein äusserst potenter Inhibitor sowohl des klassischen, als auch des alternativen Aktivierungsweges ^{159 160}. Das Gift wirkt allerdings selber immunogen und führt primär zur Komplementaktivierung, wobei die Komplementfaktoren C3a und C5a freigesetzt werden und zu Endothelschäden führen ^{161 162}. Ausserdem wird durch die Inhibierung

des alternativen Weges die Infektanfälligkeit unnötigerweise erhöht. Insbesondere CVF verlängert zwar das Transplantatüberleben, ist jedoch mit hoher Toxizität und gehäuften systemischen Entzündungen assoziiert. Des weiteren verhindert die Substanz nicht die Leukozyten- und Thrombozytenakkumulation am porcinen Endothel 163 164.

Die andere Möglichkeit ist die Komplementinhibition durch Einsatz transgener Schweine, welche menschliche Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA) auf den Endothelzellen exprimieren 165. Hier sind hauptsächlich zwei Vertreter zu nennen, die in diesem Umfeld zum Einsatz gekommen sind. Dies ist zum einen der Decay Accelerating Factor (DAF bzw. CD55) und zum anderen das Protectin (CD59).

DAF ist ein auf Chromosom 1q32 kodiertes, 70kDA schweres Glykoprotein, was neben der über GPI verankerten in 10 % auch in löslicher Form vorkommt 166 167. Es zeigt eine Wirkung sowohl auf den alternativen, als auch auf den klassischen Weg der Komplementaktivierung. Im Einzelnen wird die Bindung von C3b an B gehemmt, die Aufspaltung von C3bBb Komplexen wird gefördert, wobei C3b freigesetzt wird. Die Ausbildung der Komplexe C4b2b und C3bBb wird behindert und die Dissoziation von C4b2b und C3bBb wird gefördert. Der Ansatzpunkt in der Aktivierungskaskade im Bereich der C3-Konvertase erfolgt bei DAF beispielsweise wesentlich früher als der des CD59, welcher erst am terminalen Komplementkomplex (MAC) angreift 168 169. Die Bildung der stark proinflammatorisch wirksamen Komplementspaltprodukte C3a, C4a und C5a wird von CD59 also nicht gehemmt. Bestimmte Selbstverstärkungsmechanismen der frühen Komplementkaskade werden ebenfalls nicht verhindert. In unserem Modell haben wir uns daher für den Einsatz h-DAF transgener Spenderorgane entschieden.

Die h-DAF (CD55) Expression auf porcinem Endothel verhindert in >90% der Fälle das Auftreten einer HAR (Review of the most important pig-to-primate xenotransplantation studies conducted at Imutran, E Cozzi, CM Vial and DJG White). Somit sind h-CD55 transgene Spenderorgane in der Lage, die Überlebenszeiten zu verlängern. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen jedoch, dass es trotz h-DAF Expression zu einer immunhistochemisch und plasmatisch nachweisbaren Aktivierung von Komplement auch während posthyperakuten Abstossungsreaktionen wie der AVR kommt. Die h-CD55 Expressionsdichte im postoperativen Verlauf ist hierbei nicht signifikant vermindert (Daten nicht gezeigt).

Komplementkaskade und Interventionsmöglichkeiten

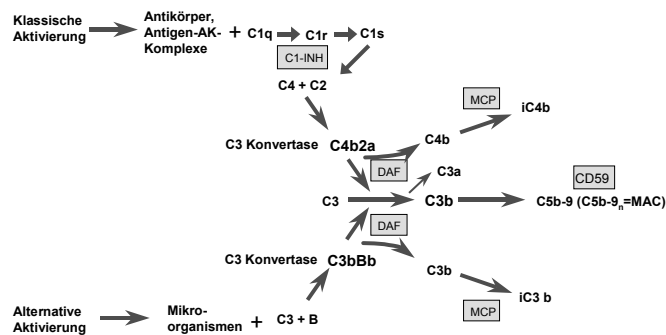


Abbildung 27: Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der klassischen und alternativen Komplementaktivierung und Angriffspunkte der RCA DAF, CD59 und MCP sowie des C1-INH.

Ein zusätzlicher Schutz vor Abstossungen könnte neben dem Einbringen von humanen Komplement-Regulierenden-Proteinen (RCA) wie DAF oder CD59 in die Spendertiere durch eine Verringerung der Gal- α -1,3-Gal-Expression erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der schützende Effekt von CD55 und CD59 durch knock-out von α -1,3-GT oder Expression von α -1,2-FT, welches die Expression von Gal- α 1,3-Gal-Resten unterdrückt, deutlich erhöht werden konnte 170 171 172.

Die Sequenzierung der kodierenden Bereiche auf cDNA Ebene für das Enzym Galactosyltransferase (GT), welches für die Synthese von Gal- α 1,3-Gal verantwortlich ist, ist bereits vollendet 173 174 175. Bis heute ist es mittels knock out Technologie jedoch lediglich in Mäusen gelungen, das α -1,3-GT Gen auszuschalten 74, da für das Schwein bisher keine geeignete embryonale Stammzelle zur Verfügung steht. Allerdings ist es möglich, humane H-Transferase (α -1,2-Fucosyltransferase) in transgenen Schweinen zu exprimieren. Dieses Enzym fügt ebenfalls Saccharidreste an Oligosaccharidketten an und konkurriert mit der α -1,3-GT 176 177 178. H-Transferase exprimierende Mäuse und Schweine synthetisieren ausreichende Mengen an H-

Antigen, wogegen der Mensch keine Antikörper bildet. Die Zahl der Gal- α -1,3-Gal-Antigene ist hierbei deutlich verringert.

In neuerer Zeit wurde berichtet, dass es unter Verwendung von Kerntransfertechnologien gelungen ist, Gal- α -1,3-Gal knock out Schweine - bislang allerdings lediglich heterozygot - zu erzeugen. Sollte es mittels konventioneller Züchtungsmethoden möglich sein, homozygote und überlebensfähige Tiere zu züchten, so würde dies einen wesentlichen Fortschritt darstellen 170 179 180.

4.2. Akut vaskuläre Abstossung (AVR)

Die Erzeugung von Spenderschweinen, welche für RCAs wie h-DAF transgen sind, hat zur Überwindung der HAR nach diskordanter Xenotransplantation geführt und somit einen enormen Schub in dieser Forschungsrichtung erbracht 3 163 181. Die nächste wichtige immunologische Hürde stellt momentan die akut vaskuläre Abstossung (AVR) dar, die im wesentlichen von J. Platt beschrieben wurde 90 und von F. Bach auch als verzögerte Xenograft Abstossung (DXR) bezeichnet wurde 91. Histopathologisches Kennzeichen der AVR sind Endothelzellschaden, Schwellung, Ischämie und diffuse Thrombose. Manchmal wird ein Infiltrat aus Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gesehen 91. Mehrere Untersuchungen unterstützen die These, dass das Wiederauftreten von durch das Xenograft induzierten XNA die AVR bzw. DXR verursacht 15 60 62. Die Komplementaktivierung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle 52 89 92 93.

Diverse bereits etablierte immunsuppressive Schemata in der präklinischen Xenotransplantation waren in unseren Experimenten alleine nicht in der Lage, eine manifeste AVR erfolgreich zu therapieren, geschweige denn ihr Auftreten zu verhindern. Zunächst haben wir versucht, eine AVR mittels Steroiden und CyP-Bolus Gaben zu therapieren. Besonders von CyP als Immunsuppressivum mit B-Zell Präferenz wurde eine deutliche Wirkung erhofft. Die Nebenwirkungen dieses hochtoxischen Medikamentes sind jedoch erheblich. Insbesondere die dabei auftretende hämolytische Anämie war in dem von uns verwendeten Modell in Kombination mit den häufigen Blutentnahmen sehr problematisch.

In unserer Arbeitsgruppe gelang es mit Hilfe transgener Spenderorgane in 8 Fällen (Gruppe IIa und IIb je 4) eine stabile initiale Transplantatfunktion über den postoperativ

4. Tag hinaus zu erreichen. Bei jedem dieser Tiere wurde mindestens eine AVR mit beeinträchtigter Transplantatfunktion diagnostiziert und therapiert.

Die Analyse der Komplementspiegel dieser Tier ergab, dass während manifester AVR stets ein Anstieg der systemischen Komplementspaltprodukte C3a und sC5b-9 im Plasma festgestellt werden konnte. Dieser Anstieg war mindestens 2 Tage vor der klinischen Diagnosestellung zu erkennen und trat trotz der nach wie vor nachweisbaren Expression des Komplementregulators h-DAF auf. Möglicherweise ist die Expressionsdichte nicht suffizient genug, um die starke Komplementaktivierung zu supprimieren. Denkbar wäre auch eine partielle Inkompatibilität zwischen h-DAF und Cynomolgus-Komplementfaktoren, so dass die C3-Konvertase unzureichend blockiert wurde. Dieses erschien jedoch auf der Basis der initialen Befunde der Arbeitsgruppe um D.J.G. White unwahrscheinlich ¹⁸¹.

Da eine Komplementaktivierung nahezu bei jedem Gewebeschaden auftritt, könnte vermutet werden, dass der von uns beobachtete Anstieg der Komplementfaktoren im Plasma der Tiere lediglich indirekte Folge der Transplantatfunktionsverschlechterung war und aufgrund einer gesteigerten Synthese oder einer verminderten Ausscheidungsfunktion auftrat. Jedoch liess sich weder eine Komplementaktivierung bei Tieren mit Urämie nach initialem Transplantatversagen noch bei Tieren mit Urämie nach technischen Fehlern (Ureterstenose etc.) beobachten.

Parallel zum systemischen Anstieg der Komplementspaltprodukte konnte immunhistologisch im Transplantat eine deutliche Ablagerung von C3a und C5b-9 in Kombination mit Immunglobulinen des Empfängers nachgewiesen werden (Abbildung 23). Bei den Antikörpern handelte es sich hauptsächlich um den IgM Isotyp. Wie bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen der Niere war die glomeruläre Basalmembran Hauptangriffziel des Empfänger-Immunsystems.

Der Nachweis von terminalen Komplementkomplexen im Empfängerplasma und im Transplantat in Verbindung mit einem zunehmenden Titer von Empfänger-Antikörpern gegen porcines Antigen deutete auf eine Beteiligung von induzierten anti-porcinen Antikörpern an der Pathogenese der AVR (Dissertation cand. med. R. Kunz). Eine grosse Bedeutung von induzierten Antikörpern für die Pathogenese von posthyperakuten Rejektionsmechanismen wurde auch bereits in verschiedenen Kleintiermodellen mehrfach beschrieben ^{182 183 184 185 186 187}.

Bei der Frage nach der Spezifität der induzierten Antikörper fanden verschiedene Untersuchungen neben unseren eigenen ¹⁸⁸ das Gal- α -1,3-Gal-Antigen als den Hauptangriffspunkt ^{182 189 190 191 192}. Entsprechend wird derzeit weltweit an der Generierung von Gal- α -1,3-Gal knock-out Schweinen gearbeitet, welche eine deutlich geringere Antigenität der Spenderorgane für Gal- α -1,3-Gal-negative Empfänger mit sich bringen ^{193 194}. Dieses Ziel scheint momentan eher über Kerntransfertechnologien als über die klassische knock out Technik unter Einsatz embryonaler Stammzellen erreichbar zu sein ^{195 196}.

Bislang basierte die Diagnose einer Xenograft-Abstossung im Primatenmodell auf klinischen Parametern der Nierenfunktion wie Kreatinin- bzw. Harnstoff. Diese Parameter steigen jedoch erst vergleichsweise spät an. Sonographie und Transplantatbiopsie sind *in vivo* nur eingeschränkt durchführbar. Bei Diagnosestellung muss noch am selben Tag mit der Therapie der Abstossung begonnen werden, da sonst die zur Zeit verfügbaren Abstossungstherapie-Protokolle (CyP, Steroide) meist nicht mehr greifen. Gegenwärtig existieren keine zuverlässigen Methoden, um eine beginnende AVR vor Ansteigen der klinischen Parameter zu diagnostizieren. Ein Titeranstieg an anti-porcinen Antikörpern im Empfängerserum bei Beginn einer Abstossung ist nur selten messbar gewesen und hat daher nur einen eingeschränkten diagnostischen Wert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein beginnender immunologisch bedingter Transplantatschaden bereits vor einem Anstieg der klinischen Parameter Kreatinin und Harnstoff durch Messung der Komplementspaltprodukte C3a und sC5b-9 im Plasma des Empfängers diagnostiziert werden könnte.

Auch bei Verwendung von h-DAF transgenen Spendernieren wurde überraschenderweise ein systemischer Anstieg der Komplementspiegel während AVR festgestellt. Dies kann 2 Gründe haben: Die Expressionsdichte von h-DAF auf dem porcinen Endothel ist zu gering, um eine massive Komplementaktivierung nach Bindung von anti-porcinen Antikörpern zu verhindern. Die zweite Möglichkeit wäre, dass die Aktivierung über den alternativen Weg der Komplementaktivierung erfolgte. Bei letzterer Möglichkeit wäre die beobachtete Ablagerung von anti-porcinen Antikörpern im Transplantat lediglich ein Epiphänomen, was eher unwahrscheinlich zu sein scheint. Vielmehr lässt die Tatsache, dass eine vermehrte Antikörperablagerung im Transplantat während AVR sichtbar ist, darauf schließen, dass eine systemische Komplementaktivierung nach Bindung an diese Antikörper auftritt ^{127 182 186 187 197}.

Die durchflusszytometrische Analyse der systemischen anti-porcinen Antikörper zeigte jedoch nur selten einen Titeranstieg bei beginnender AVR. Wir sehen den Grund hierfür darin, dass die synthetisierten Antikörper meist sofort vollständig im Xenotransplantat gebunden werden (antibody trapping). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass sowohl bei einem anderen in unserer Arbeitsgruppe etablierten sogenannten „non-life-supporting-model“¹²⁵, als auch in einem Modell einer heterotopen Herztransplantation¹⁸⁴ ein systemischer Antikörpertiteranstieg unmittelbar nach chirurgischer Entfernung der Transplantate zu beobachten war.

Wir¹²⁷ und andere Arbeitsgruppen¹⁹⁸ haben gezeigt, dass die AVR im Primaten auch trotz Verwendung von h-DAF-transgenen Spenderorganen mit einem deutlichen Anstieg der Komplementfaktoren assoziiert war. Die Menge an zirkulierenden Komplementfaktoren im Verlauf einer klinisch manifesten AVR wurde von uns dokumentiert. Es wurde daraufhin nach zusätzlichen Möglichkeiten gesucht, diese Komplementaktivierung während einer ablaufenden AVR suffizient zu unterbinden. Konkret haben wir nach einem systemisch applizierbaren Stoff gesucht, der spezifisch die Komplementaktivierung unterdrückt und möglichst geringe Nebenwirkungen haben sollte. Frühere Studien haben bereits zeigen können, dass die Aktivierung des klassischen Weges der Komplementaktivierung nach Bindung xenoreaktiver Antikörper wichtiger für das Entstehen einer AVR ist als die Aktivierung des alternativen Aktivierungsweges^{61 199 200}.

Der C1-Inhibitor (C1-INH) ist der einzig bekannte physiologische Inhibitor des ersten Schrittes der klassischen Komplementaktivierung. Es handelt sich um einen multifunktionalen Serinprotease-Inhibitor, der nicht nur die C1 Aktivierung reguliert, sondern auch Proteasen der Kininfreisetzung und der Gerinnungskaskade (Kallikrein, Faktor XIIa, Faktor XIa)¹³⁴. Ein weiterer Vorteil von C1-INH scheint zu sein, dass der alternative Weg intakt bleibt und für die Infektabwehr weiterhin zur Verfügung steht^{201 202}.

Neben C1-INH^{201 202 203} ist sCR-1^{78 154 159} und auch CVF²⁰⁴ in der Lage, eine auftretende HAR nach diskordanter Xenotransplantation zu unterbinden. Aber weder durch Gabe von sCR-1 noch von CVF kann eine posthyperakute Abstossungsreaktion wie die AVR therapiert, geschweige denn verhindert werden. Darüber hinaus werden von beiden Agenzien sowohl der alternative als auch der klassische Komplementweg

blockiert^{159 160}, was die Infektanfälligkeit unnötigerweise erhöht. Insbesondere CVF verlängert zwar das Transplantatüberleben, ist jedoch mit hoher Toxizität und gehäuften systemischen Entzündungen assoziiert. In der verwendeten Dosierung zeigte C1-INH in der frühen postoperativen Phase sogar einen stärkeren Effekt auf die Suppression des Komplementsystems als der membranständige Komplementinhibitor h-DAF (Abbildung 13 und 14).

Die Applikation des löslichen C1-INH zusammen mit einer (allein so nicht wirksamen) Kombinationstherapie aus hochdosierten Steroiden und Cyclophosphamid führte in 6 von 7 Fällen zur erfolgreichen Behandlung einer manifesten AVR²⁰⁵. Sowohl klinisch als auch laborchemisch waren diese Abstossungen reversibel. Die Nieren nahmen die Urinproduktion wieder auf, Kreatinin- und Harnstoffwerte sowie die Komplementspaltprodukte C3a und sC5b-9 sanken wieder ab. Somit steht erstmals eine wirksame Therapie der AVR zur Verfügung²⁰⁶.

Nach wie vor schwierig ist die rechtzeitige Diagnosestellung bei Auftreten einer manifesten AVR. Wird nicht rechtzeitig reagiert, so ist die AVR auch mit zusätzlicher Applikation von C1-INH nicht mehr reversibel. Wir haben daher weiter nach Möglichkeiten gesucht, den Ausbruch einer AVR zu verhindern. Es war naheliegend, ein Protokoll einzuführen, welches eine kontinuierliche C1-INH Administration zusammen mit einer Basisimmunsuppression vorsieht, und das Auftreten einer AVR nach Transplantation nicht-transgener Schweinenieren verhindern soll. Die Überlegung dabei war, eine Komplementaktivierung in der postoperativen Phase dauerhaft zu unterbinden. Tatsächlich kam es bei keinem der 3 so behandelten Tiere zum Auftreten einer AVR. Jedoch verstarben letztlich alle aufgrund fulminanter septischer Infektionen im Sinne einer massiven Über-Immunsuppression.

In dem hier verwendeten Tiermodell mit RCA-transgenen Spenderorganen kam es ohne Applikation von C1-INH trotz starker Immunsuppression regelmässig zum Auftreten mindestens einer AVR. Lässt man einmal solche Tiere mit technischem Versagen oder solche mit primären infektiologischen Komplikationen ausser Betracht, so scheint die Manifestation mindestens einer AVR im postoperativen Verlauf unvermeidlich²⁰⁵ (E. Cozzi im persönlichen Gespräch). Auch in solchen Tieren, welche nicht-transgene Spenderorgane zusammen mit der Basisimmunsuppression erhalten haben, wird zwangsläufig eine AVR beobachtet, wenn das Auftreten einer HAR zuvor durch Plasmapherese oder Perfusion des Spenderorgans mit Empfängerblut

verhindert wurde. Das Ausbleiben einer AVR in allen 3 Tieren der Gruppe Ib ist daher wahrscheinlich ein Effekt der zusätzlichen C1-INH Gabe ²⁰⁶.

Die von uns transplantierten Tiere zeigten - wie auch in anderen Arbeitsgruppen - keinen Anhalt für schwerwiegende metabolische Veränderungen im Empfängerorganismus über die Zeit ^{131 207}. Die Serum-Elektrolytwerte wurden durch die porcine Niere weitestgehend im Normbereich des Empfängertieres gehalten. Lediglich die Phosphatspiegel fielen mit der Zeit ab.

Hinweise auf eine Inkompatibilität des porcinen Erythropoetins mit dem Empfängerorganismus ²⁰⁸ konnten wir in unseren Analysen nicht bestätigen. Postoperativ wurde zwar ein rascher Abfall der Hämoglobinkonzentration beobachtet. Zusammen mit dem Ausbleiben eines signifikanten Anstieges nach exogener EPO-Gabe lässt dies eine spezies-spezifische Inkompatibilität des porcinen Erythropoetins als Auslöser der Anämie als eher unwahrscheinlich erscheinen. Das Zurückkehren der Hämoglobinkonzentration auf die Ausgangswerte nach Entfernung des Transplantates und Absetzen von CyP (im sog. „non-life-supporting-model“; Daten nicht gezeigt) spricht auch gegen die Induktion von anti-Erythropoetin-Antikörpern als Ursache der Anämie. Vielmehr scheint jedoch in unserem Modell in erster Linie eine durch CyP vermittelte Hämolyse (und Knochenmark-Suppression) für die bei den transplantierten Javaner-Affen auftretende Anämie verantwortlich zu sein. Die häufigen Blutentnahmen scheinen ebenfalls eine wichtige Ursache für die Anämie zu sein.

Unsere Daten zeigen neue therapeutische Ansatzpunkte bei manifester AVR in h-DAF-transgenen Nieren-Xenotransplantaten auf. Quantitativ ist die zuletzt von uns verwendete Immunsuppression sicherlich ausreichend, jedoch wäre eine spezifischere Medikation in der Xenotransplantation wünschenswert, um die erheblichen Nebenwirkungen zu reduzieren.

5. Zusammenfassung

Seit der Entwicklung porciner Spenderorgane mit transgener Expression humaner komplementregulierender Proteine wie beispielsweise h-DAF sind die Überlebenszeiten in den präklinischen Modellen der diskordanten Xenotransplantation deutlich gestiegen. Die hyperakute Abstossungsreaktion (HAR), hervorgerufen durch präformierte xenoreaktive natürliche Antikörper mit nachfolgender Komplementaktivierung, kann heute zuverlässig verhindert werden, so dass erstmals die ihr nachfolgenden Abstossungsreaktionen charakterisiert werden können. Derzeit stellt die nach 4 bis 7 Tagen nach Transplantation regelhaft auftretende akut vaskuläre Abstossungsreaktion (AVR) die wesentliche Hürde auf dem Weg zu einem Langzeitüberleben nach diskordanter Xenotransplantation dar. Geeignete Therapieschemata zur Behandlung der AVR existierten zum Zeitpunkt des Beginns der vorgestellten Untersuchungen nicht.

Im Rahmen der hier referierten Experimente wurden 11 nicht-transgene und 12 h-DAF transgene porcine Nieren in 23 Cynomolgus Affen im sogenannten „life-supporting-model“ transplantiert. Zur Prävention von Abstossungsreaktionen wurden die Empfängertiere mit einer Dreifachkombination bestehend aus Cyclosporin A (CyA), Cyclophosphamid (CyP) und Steroiden immunsupprimiert. Präoperativ sowie im postoperativen Verlauf wurden regelmässig Blutentnahmen durchgeführt, um das Blutbild, Kreatinin, Harnstoff, Elektrolyte, CyA-Spiegel und Komplementspiegel bestimmen zu können. Der 24-Stunden-Urin wurde zur Bilanzierung ebenfalls gesammelt und analysiert.

Zentraler Gegenstand der vorliegenden Dissertation war die Bestimmung der Plasma-Konzentrationen der Komplementspaltprodukte C3a und sC5b-9, welche retrospektiv mittels ELISA gemessen wurden, sowie die Ermittlung der funktionellen C1-Inhibitor Aktivität mit Hilfe eines spezifischen Substratassays.

Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass in allen Fällen die AVR nach diskordanter Xenotransplantation sowohl mit systemischer als auch mit transplantatbezogener (trotz h-DAF Expression) Komplementaktivierung verbunden ist. Die Expression des humanen Komplementregulators in der porcinen Niere schützte nicht vor Auftreten einer AVR. Mit einer Abstossungstherapie bestehend aus CyP und hochdosierten Steroiden alleine reagierte keine von insgesamt 6 Episoden einer AVR nach Transplantation

transgener bzw. nicht-transgener Nieren. Eine zusätzliche Gabe eines löslichen Komplementinhibitors zur Therapie bzw. Prophylaxe einer AVR erschien daher sinnvoll. Es wurde sodann - nach entsprechenden pharmakokinetischen Voruntersuchungen - C1-Inhibitor (C1-INH) zusätzlich zu der oben genannten Standardtherapie der AVR verabreicht. Die zusätzliche Applikation von C1-INH zusammen mit der Kombinationstherapie aus CyP und Steroiden führte in 6 von 7 Fällen zur erfolgreichen Behandlung einer manifesten AVR. Sowohl klinisch als auch laborchemisch waren diese Abstossungsreaktionen reversibel. Die Transplantatnieren nahmen die Urinproduktion wieder auf, die Retentionsparameter sowie die Plasmaspiegel der Komplementspaltprodukte C3a und sC5b-9 sanken ab.

Eine daraufhin durchgeführte dauerhafte Komplementinhibition durch C1-INH nach Transplantation nicht-transgener Spenderorgane zeigte, dass bei initialer Transplantatfunktion in allen drei Fällen keine AVR auftrat. Unter der verwendeten Dosierung kam es jedoch zu einer deutlich gesteigerten Infektionsrate.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen erstmals, dass nach diskordanter Xenotransplantation im Primatenmodell die Aktivierung des Komplementsystems nicht nur bei HAR sondern auch bei AVR eine zentrale Rolle spielt. Komplementregulator transgene porcine Spenderorgane sind zwar gegen HAR, nicht aber gegen AVR geschützt, so dass für ein Langzeitüberleben porciner Xenotransplantate zusätzliche Interventionsstrategien, beispielsweise mittels kurzzeitigem Einsatz löslicher Komplementregulatoren, entwickelt werden müssen.

6. Verzeichnisse

6.1. Literatur

1. Lin H, Kauffman H, McBride M, et al. Center-specific graft and patient survival rates: 1997 United network for Organ Sharig (UNOS) report. *JAMA* 1998; 280:1153-60.
2. Ewans R, Orians C, Ascher N. The potential supply of organ donors. An assessment of the efficacy of organ procurement efforts in the United States. *JAMA* 1992; 267:239-46.
3. Hancock WW. Beyond hyperacute rejection: strategies for development of pig to primate xenotransplantation. *Kidney Int Suppl* 1997; 58:S36-40.
4. Jaboulay M. Greffe du reins au pli du coude par soudures arterielles et veineuses. *Lyon Med.* 1906; 107:575.
5. Starzl TE, Fung J, Tzakis A, et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341:65-71.
6. Minuth W, Sittinger M, Kloth S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Res* 1998; 291:1-11.
7. Weiss R. Xenotransplantation. *BMJ* 1998; 317:931-4.
8. Butler D. Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. *Nature* 1998; 391:320-4.
9. Hüsing B, Engels E-M, Frick T, Menrad K, Reiß T. Xenotransplantation. *Schweizerischer Wissenschaftsrat* 1998; TA 30/1998.
10. Fishman JA. Pneumocystis carinii and parasitic infections in transplantation. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9:1005-44.
11. Fishman JA. Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney Int Suppl* 1997; 58:S41-5.
12. Platt JL, Bach FH. The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* 1991; 52:937-47.
13. Lawson JH, Platt JL. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation* 1996; 62:303-10.
14. Hoopes CW, Platt JF. Molecular strategies for clinical xenotransplantation in cardiothoracic surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 8:156-74.

15. Parker W, Saadi S, Lin SS, Holzknrecht ZE, Bustos M, Platt JL. Transplantation of discordant xenografts: a challenge revisited. *Immunol Today* 1996; 17:373-8.
16. Cooper D, Kemp E, Platt J, White D. *Xenotransplantation: The Transplantation of Organs and Tissues Between Species*. Vol. 2. Heidelberg, Berlin, Germany: Springer, 1997.
17. Platt J, Logan J. Transgenic animals: generation and use. In: Houdebine L, ed. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publisher Gmbh, 1997:455-60.
18. Auchincloss H, Jr., Sachs DH. Xenogeneic transplantation. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:433-70.
19. Bach FH, Fishman JA, Daniels N, et al. Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk. *Nat Med* 1998; 4:141-4.
20. Lambrigts D, Sachs D, Cooper D. Discordant organ xenotransplantation in primates. World experience and current status. *Transplantation* 1998; 66:547-61.
21. Starzl TE, Rao AS, Murase N, Fung J, Demetris AJ. Will xenotransplantation ever be feasible? *J Am Coll Surg* 1998; 186:383-7.
22. Hammer C. Xenotransplantation: facts and fiction. *Ann Chir Gynaecol* 1997; 86:195-201.
23. Hammer C, Linke R, Wagner F, Diefenbeck M. Organs from animals for man. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116:5-21.
24. Hammer C. Physiological obstacles after xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 862:19-27.
25. Gritsch HA, Glaser RM, Emery DW, et al. The importance of nonimmune factors in reconstitution by discordant xenogeneic hematopoietic cells. *Transplantation* 1994; 57:906-17.
26. Lawson JH, Daniels LJ, Platt JL. The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation. *Transplant Proc* 1997; 29:884-5.
27. LeTissier P, Stove J, Takeuchi Y, Patience C, Weiss R. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 1997; 389:681-2.
28. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 1997; 3:282-6.
29. Weiss R. Retroviral zoonoses. *Nat Med* 1998; 4:391-2.
30. Patience C, Patton G, Takeuchi Y, et al. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 1998; 352:699-701.

31. Heneine W, Tibell A, Switzer W, et al. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 1998; 352:695-9.
32. Paradis K, Langford G, Long Z, et al. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 1999; 285:1236-41.
33. Loss M, Arends H, Winkler M, et al. Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism. *Transpl Int* 2001; 14:31-7.
34. Martin U, Steinhoff G, Kiessig V, et al. Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from transplanted porcine endothelial cells to baboons *in vivo*. *Transpl Int* 1998; 11:247-51.
35. Stoye J. No clear answer on safety of pigs as tissue donor source. *Lancet* 1998; 352:666-7.
36. Weiss R. Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature* 1998; 391:327-8.
37. Tacke SJ, Bodusch K, Berg A, Denner J. Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2001; 8:125-35.
38. Galili U, Clark M, Shohet S, Buehler J, Macher B. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal-alpha-1-3-Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:1369-73.
39. Oriol R, Ye Y, Koren E, Cooper DK. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation* 1993; 56:1433-42.
40. Lin SS, Kooyman DL, Daniels LJ, et al. The role of natural anti-Gal alpha 1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of pig-to-baboon cardiac xenotransplants. *Transpl Immunol* 1997; 5:212-8.
41. Miyagawa S, Hirose H, Shirakura R, et al. The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* 1988; 46:825-30.
42. Platt J, Vercellotti G, Lindman B, Oegema T, Bach F, Dalmaso A. Release of heparan sulfat from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J Exp Med* 1990; 171:1363-8.

43. Dalmaso A, Vercellotti G, Fischel R, Bolman R, Bach F, Platt J. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am J Pathol* 1992; 140:1157-66.
44. Fisicaro N, Aminian A, Hinchliffe SJ, et al. The pig analogue of CD59 protects transgenic mouse hearts from injury by human complement. *Transplantation* 2000; 70:963-8.
45. Calne R. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc* 1970; 2:550-6.
46. Kemp E. Xenotransplantation. *J Intern Med* 1996; 239:287-97.
47. Colman R, Habal M, Hollenberg N, Birtch A, Busch G. Hyperacute renal allograft rejection in the primate. Therapeutic limitations of antiplatelet agents alone and combined with heparin. *Am J Pathol* 1976; 82:25-42.
48. Rose AG, Cooper DK, Human PA, Reichenspurner H, Reichart B. Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts. *J Heart Lung Transplant* 1991; 10:223-34.
49. Al-Mohanna F, Collison K, Parhar R, et al. Activation of naive xenogeneic but not allogeneic endothelial cells by human naive neutrophils: a potential occult barrier to xenotransplantation. *Am J Pathol* 1997; 151:111-20.
50. Dalmaso AP. The complement system in xenotransplantation. *Immunopharmacology* 1992; 24:149-60.
51. White DJ, Cozzi E, Langford G, et al. The control of hyperacute rejection by genetic engineering of the donor species. *Eye* 1995; 9:185-9.
52. Platt JL, Vercellotti GM, Dalmaso AP, et al. Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol Today* 1990; 11:450-6; discussion 456-7.
53. Hammer C. Preformed natural antibodies (PNAB) and possibilities of modulation of hyperacute xenogeneic rejection (HXAR). *Transplant Proc* 1989; 21:522-3.
54. Parker W, Bruno D, Platt JL. Xenoreactive natural antibodies in the world of natural antibodies: typical or unique? *Transpl Immunol* 1995; 3:181-91.
55. Platt J, Turman M, Noreen H, Fischel R, Bolman R, Bach F. An ELISA assay for xenoreactive natural antibodies. *Transplantation* 1990; 49:1000-1.
56. Cooper DK. Xenoantigens and xenoantibodies. *Xenotransplantation* 1998; 5:6-17.

57. Kaplon RJ, Michler RE, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Platt JL. Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts. *Transplantation* 1995; 59:1-6.
58. Michler RE, DP OH, Xu H, Shah AS, Itescu S. Newborn baboon immunity: lessons in cross-species transplantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S582-4.
59. Michler RE, Xu H, DP OH, et al. Newborn discordant cardiac xenotransplantation in primates: a model of natural antibody depletion. *Transplant Proc* 1996; 28:651-2.
60. Perper R, Najarian J. Experimental renal heterotransplantation. III. Passive transfer of transplantation immunity. *Transplantation* 1967; 5:514-33.
61. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 1991; 52:214-20.
62. Leventhal JR, John R, Fryer JP, et al. Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoabsorption. Results of *in vitro* and *in vivo* studies. *Transplantation* 1995; 59:294-300.
63. Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, et al. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation* 1997; 64:1255-61.
64. Parker W, Bruno D, Holzkecht ZE, Platt JL. Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J Immunol* 1994; 153:3791-803.
65. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, 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* 1993; 90:11391-5.
66. Neethling F, Koren E, YE Y, et al. Protection of pig kidney (PK15) cells from the cytotoxic effect of anti-pig antibodies by alpha-galactosyl oligosaccharides. *Transplantation* 1994; 57:959-63.
67. Lin S, Parker W, Holzkecht Z, Platt J. Quantitative evaluation of porcine endothelial cell antigens recognized by human natural antibodies: an analysis by Western blotting. *Xenotransplantation* 1996; 3:120-7.
68. Galili U, Rachmilewitz E, Peleg A, Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med* 1984; 160:1519-31.

69. Parker W, Lundberg-Swanson K, Holzknacht Z, et al. Isohemagglutinins and xenoreactive antibodies: members of a distinct family of natural antibodies. *Hum Immunol* 1996; 45:94-104.
70. Good AH, Cooper DK, Malcolm AJ, et al. Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc* 1992; 24:559-62.
71. Collins B, Chari R, Magee J, et al. Mechanisms of injury in porcine liver perfused with blood of patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994; 58:1162-71.
72. Collins BH, Cotterell AH, McCurry KR, et al. Cardiac xenografts between primate species provide evidence for the importance of the alpha-galactosyl determinant in hyperacute rejection. *J Immunol* 1995; 154:5500-10.
73. Sablinski T, Latiene D, Gianello P, et al. Xenotransplantation of pig kidneys to nonhuman primates: I. Development of the model. *Xenotransplantation* 1995; 2:264-70.
74. Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, et al. The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation* 1996; 61:13-9.
75. Baldwin W, Pruitt S, Brauer R, Daha M, Sanfilippo F. Complement in organ transplantation. Contribution to inflammation, injury and rejection. *Transplantation* 1995; 59:797-808.
76. Busch G, Martins A, Hollenberg N, Wilson R, Colman R. A primate model of hyperacute renal allograft rejection. *Am J Pathol* 1975; 79:31-56.
77. Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, et al. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 1993; 55:857-65; discussion 865-6.
78. Pruitt SK, Kirk AD, Bollinger RR, et al. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts. *Transplantation* 1994; 57:363-70.
79. Magee JC, Collins BH, Harland RC, et al. Immunoglobulin prevents complement-mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation. *J Clin Invest* 1995; 96:2404-12.

80. Brauer RB, Baldwin WMD, Daha MR, Pruitt SK, Sanfilippo F. Use of C6-deficient rats to evaluate the mechanism of hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts. *J Immunol* 1993; 151:7240-8.
81. Dalmaso A, Platt J. Prevention of complement-mediated activation of xenogeneic endothelial cells in an in vitro model of xenograft hyperacute rejection by C1 inhibitor. *Transplantation* 1993; 56:1171-6.
82. Heckl-Ostreicher B, Wosnik A, Kirschfink M. Protection of porcine endothelial cells from complement-mediated cytotoxicity by the human complement regulators CD59, C1 inhibitor, and soluble complement receptor type 1. Analysis in a pig-to-human in vitro model relevant to hyperacute xenograft rejection. *Transplantation* 1996; 62:1693-6.
83. Johnston PS, Wang MW, Lim SM, Wright LJ, White DJ. Discordant xenograft rejection in an antibody-free model. *Transplantation* 1992; 54:573-6.
84. Atkinson J, Oglesby T, White D, Adams E, Liszewski M. Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin Exp Immunol* 1991; 86:27-30.
85. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH. Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 1991; 52:530-3.
86. Zhou XJ, Niesen N, Pawlowski I, et al. Prolongation of survival of discordant kidney xenografts by C6 deficiency. *Transplantation* 1990; 50:896-8.
87. Kroshus TJ, Rollins SA, Dalmaso AP, et al. Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation* 1995; 60:1194-202.
88. Diamond LE, McCurry KR, Martin MJ, et al. Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transplantation* 1996; 61:1241-9.
89. Saadi S, Platt J. Transient perturbation of endothelial integrity by natural antibodies and complement. *J Exp Med* 1995; 181:21-31.
90. Platt J, Lin S, McGregor C. Acute vascular rejection. *Xenotransplantation* 1998; 5:169-75.
91. Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC. Delayed xenograft rejection. *Immunol Today* 1996; 17:379-84.

92. Saadi S, Holzkecht R, Patte C, Stern D, Platt J. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med* 1995; 182:1807-14.
93. Siegel JB, Grey ST, Lesnikoski BA, et al. Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin. *Transplantation* 1997; 64:888-96.
94. Bach FH, Turman MA, Vercellotti GM, Platt JL, Dalmaso AP. Accommodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant Proc* 1991; 23:205-7.
95. Platt JL. A perspective on xenograft rejection and accommodation. *Immunol Rev* 1994; 141:127-49.
96. Winkler H, Ferran C, Bach F. Accommodation of xenografts: a concept revisited. *Xenotransplantation* 1995; 2:53-6.
97. Andres G, Yamaguchi N, Brett J, Caldwell P, Godman G, Stern D. Cellular mechanisms of adaptation of grafts to antibody. *Transpl Immunol* 1996; 4:1-17.
98. Hancock WW. Delayed xenograft rejection. *World J Surg* 1997; 21:917-23.
99. Chopek M, Simmons R, Platt J. ABO-incompatible kidney transplantation: initial immunopathologic evaluation. *Transplant Proc* 1987; 19:4553-7.
100. Alexandre G, Squifflet J, DeBruyere M, et al. Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant Proc* 1987; 19:4538-42.
101. Yu P, Holzkecht Z, Bruno D, Parker W, Platt J. Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies: a role for IgG anti-Gal a1-3Gal antibodies. *J Immunol* 1996; 157:5163-8.
102. Bach F, Ferran C, Hechenleitner P, et al. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat Med* 1997; 3:196-204.
103. Dalmaso A, He T, Benson B. Inhibition of complement-mediated porcine endothelial cell cytotoxicity by human IgM natural antibody. Human IgM xenoreactive natural antibodies can induce resistance of porcine endothelial cells to complement-mediated injury. *Xenotransplantation* 1996; 3:54-62.
104. Busso N, Huet S, Nicodeme E, Hiernaux J, Hyafil F. Refractory period phenomenon in the induction of tissue factor expression on the endothelial cells. *Blood* 1991; 78:2027-35.
105. Seebach J, Waneck G. Natural killer cells in Xenotransplantation. *Xenotransplantation* 1997; 4:201-11.

106. Goodman DJ, Von Albertini M, Willson A, Millan MT, Bach FH. Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells. *Transplantation* 1996; 61:763-71.
107. Inverardi L, Clissi B, Stolzer AL, Bender JR, Sandrin MS, Pardi R. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation* 1997; 63:1318-30.
108. Rollins S, Kennedy S, Chodera A, Elliot E, Zavoico G, Matis L. Evidence that activation of human T cells by porcine endothelium involves direct recognition of porcine SLA and costimulation by porcine ligands for LFA-1 and CD2. *Transplantation* 1994; 57:1709-16.
109. Murray A, Khodadoust M, Pober J, Bothwell A. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* 1994; 1:57-63.
110. Moses R, Winn H, Auchincloss H. Evidence that multiple defects in cell-surface molecule interactions across species differences are responsible for diminished xenogeneic T cell response. *Transplantation* 1992; 53:203-9.
111. Alter B, Bach F. Cellular basis of the proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens. *J Exp Med* 1990; 171:333-8.
112. Herrlinger KR EV, Muller-Ruchholtz W, Ulrichs K. Human T-cell activation is mediated predominantly by direct recognition of porcine SLA and involves accessory molecule interaction of ICAM1/LFA 1 and CD2/LFA3. *Transplant Proc* 1996; 28(2):650.
113. Herrlinger K EV, Westphal E, Hamelmann W, Thiede A, Ulrichs K. Cellular immune reactivity in xenogenic "human-anti-pig" transplant combination. *Zentralbl Chir* 1998; 123(7):803-8.
114. Ihrcke N, Wrenshall L, Lindman B, Platt J. Role of heparan sulfate in immune system- blood vessel interactions. *Immunol Today* 1993; 14:500-5.
115. Dorling A, Riesbeck K, Lechler R. The T-cell response to xenograft: molecular interactions and graft-specific immunosuppression. *Xeno* 1996; 4:68-76.
116. Alexandre G, Gianello P, Latinne D, et al. Plasmapheresis and splenectomy in experimental renal xenotransplantation. In: Hardy M, ed. *Xenograft 25*. Excerpta Medica. New York, USA: Elsevier Science Publishers, 1989:259-66.

117. Fryer JP, Leventhal JR, Dalmaso AP, et al. Beyond hyperacute rejection. Accelerated rejection in a discordant xenograft model by adoptive transfer of specific cell subsets. *Transplantation* 1995; 59:171-6.
118. Williams N. Paving the way for British xenotransplants. *Science* 1998; 281:767.
119. Currie R. UK moves ahead on the xenotransplantation issue. *Nat Med* 1998; 9:988.
120. Wadman M. FDA turns down moratorium demand on xenotransplants. *Nature* 1998; 391:423.
121. Lanza RP, Cooper DK. Xenotransplantation of cells and tissues: application to a range of diseases, from diabetes to Alzheimer's. *Mol Med Today* 1998; 4:39-45.
122. Platt J. New directions for organ transplantation. *Nature* 1998; 392:11-7.
123. Platt J. Current status of xenotransplantation: research and technology. *Transplant Proc* 1998; 30:1630-3.
124. Hancock WW. The past, present, and future of renal xenotransplantation. *Kidney Int* 1997; 51:932-44.
125. Loss M, Kunz R, Przemec M, et al. Influence of cold ischemia time, pretransplant anti-porcine antibodies, and donor/recipient size matching on hyperacute graft rejection after discordant porcine to cynomolgus kidney transplantation. *Transplantation* 2000; 69:1155-9.
126. Sablinski T, Gianello PR, Bailin M, et al. Pig to monkey bone marrow and kidney xenotransplantation. *Surgery* 1997; 121:381-91.
127. Loss M, Vangerow B, Schmidtko J. Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model. *Xenotransplantation* 2000; 7:186.
128. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem. *Drugs* 1991; 42:781-95.
129. Waterworth PD, Cozzi E, Tolan MJ, et al. Pig-to-primate cardiac xenotransplantation and cyclophosphamide therapy. *Transplant Proc* 1997; 29:899-900.
130. Zaidi A, Schmoeckel M, Bhatti F, et al. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation* 1998; 65:1584-90.

131. Cozzi E, Bhatti F, Schmoeckel M, et al. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* 2000; 70:15-21.
132. McManus RP, DP OH, Komorowski R, Scott JP. Immunosuppressant combinations in primate cardiac xenografts. A review. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 696:281-4.
133. Roslin MS, Tranbaugh RE, Panza A, et al. One-year monkey heart xenograft survival in cyclosporine-treated baboons. Suppression of the xenoantibody response with total-lymphoid irradiation. *Transplantation* 1992; 54:949-55.
134. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase Inhibitor: An Anti-Inflammatory Agent and Its Potential Use in the Treatment of Diseases Other Than Hereditary Angioedema. *Pharmacological Reviews* 2000; 52:91-112.
135. Rother R, Squinto S. The alpha-galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell* 1996; 86:185-8.
136. Oriol R, Cooper DKC. Major Carbohydrate Xenotransplantation Antigens. In: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG, eds. *Xenotransplantation*. Berlin: Springer, 1997:24-32.
137. Kroshus TJ, Dalmaso AP, Leventhal JR, John R, Matas AJ, Bolman RM, 3rd. Antibody removal by column immunoabsorption prevents tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenograft hyperacute rejection. *J Surg Res* 1995; 59:43-50.
138. Leventhal JR, Sakiyalak P, Witson J, et al. The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in nonhuman primates. *Transplantation* 1994; 57:974-8.
139. Kroshus TJ, Bolman RM, 3rd, Dalmaso AP. Selective IgM depletion prolongs organ survival in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation* 1996; 62:5-12.
140. Taniguchi S, Neethling FA, Korchagina EY, et al. In vivo immunoabsorption of antipig antibodies in baboons using a specific Gal(alpha)1-3Gal column. *Transplantation* 1996; 62:1379-84.
141. Kooyman D, McClellan S, Parker W, et al. Identification and characterization of a galactosyl peptide mimetic. Implications for use in removing xenoreactive anti-alpha-Gal antibodies. *Transplantation* 1996; 61:851-5.

142. Lucchiari N, Azimzadeh A, Wolf P, Regnault V, Cinqualbre J. In vivo and in vitro optimization of depletion of IgM and IgG xenoantibodies by immunoadsorption using cell membrane proteins. *Artif Organs* 1997; 21:278-86.
143. Xu Y, Lorf T, Sablinski T, et al. Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by a Gal-alpha-1,3-Gal-beta-1,4-beta-gamma-Glc-X immunoaffinity column. *Transplantation* 1998; 65:172-9.
144. Ghanekar A, Luo Y, Yang H, et al. The alpha-Gal analog GAS914 ameliorates delayed rejection of hDAF transgenic pig-to-baboon renal xenografts. *Transplant Proc* 2001; 33:3853-4.
145. Simon PM, Neethling FA, Taniguchi S, et al. Intravenous infusion of Gal-alpha-1,3-Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine heart xenografts. *Transplantation* 1998; 65:346-53.
146. Morschheuser T, Steinhoff G, Indzhia L, et al. Successful down-regulation of natural and xenoreactive antibodies in pig-to-baboon xenotransplantation by high-dose cyclophosphamide. *Transplant Proc* 1997; 29:970-2.
147. Sykes M, Zhao Y, Yang YG. Tolerance induction for xenotransplantation. *World J Surg* 1997; 21:932-8.
148. Xu H, Gundry SR, Hancock WW, et al. Prolonged discordant xenograft survival and delayed xenograft rejection in a pig-to-baboon orthotopic cardiac xenograft model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:1342-9.
149. Cooper D. Xenoantigens and xenoantibodies. *Xenotransplantation* 1998; 5:6-17.
150. Ryan US. Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nat Med* 1995; 1:967-8.
151. Levin J, Marsh H, Rudolph A. sCR1, a novel complement inhibitor: Development and potential implications for threatening hyperacute rejection of transplanted organs. In: R L, A M, eds. *Principles of Drug Development in Transplantation and Autoimmunity*. Austin, Texas, USA: R.G. Landes Company, 1996:695-702.
152. Sanfilippo F. Exogenous complement inhibition in xenotransplantation. *Xeno* 1996; 4:46-9.
153. Marsh H, Ryan U. Therapeutic effect of soluble complement receptor type 1 in Xenotransplantation. In: Cooper D, Kemp E, Platt J, White D, eds. *Xenotransplantation: The Transplantation of Organs and tissues Between Species*. Vol. 2. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1997:437-55.

154. Pruitt SK, Bollinger RR, Collins BH, et al. Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation* 1997; 63:900-2.
155. Rollins SA, Matis LA, Springhorn JP, Setter E, Wolff DW. Monoclonal antibodies directed against human C5 and C8 block complement-mediated damage of xenogeneic cells and organs. *Transplantation* 1995; 60:1284-92.
156. Fryer J, Buckingham F, Leventhal J, et al. Prolongment of discordant xenograft survival by preventing classical pathway activation with C1q inhibitory peptides [Abstract 197]. Paper presented at the Fourth International Congress for Xenotransplantation, Nantes, France 1997.
157. Fryer J, Yoder M, Kindra J, et al. Inhibition of complement activation by diaromatic (Trp-Tyr) conjugates [Abstract 198]. Paper presented at the Fourth International Congress for Xenotransplantation, Nantes, France 1997.
158. Salerno C, Dalmaso A, Kroshus T, et al. A soluble chimeric complement inhibitor of C3- and C5-convertases prolongs xenograft survival in pig-to-primate cardiac transplantation [Abstract 48]. Paper presented at the Fourth International Congress for Xenotransplantation, Nantes, France 1997.
159. Davis EA, Pruitt SK, Greene PS, et al. Inhibition of complement, evoked antibody, and cellular response prevents rejection of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation* 1996; 62:1018-23.
160. Murohara T, Guo JP, Delyani JA, Lefer AM. Cardioprotective effects of selective inhibition of the two complement activation pathways in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1995; 17:499-507.
161. Till G, Johnson K, Kunkel R, Ward P. Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygenmetabolites. *J Clin Invest* 1982; 69:1126-35.
162. Schmid E, Warner R, Crouch L, et al. Neutrophil chemotactic activity and C5a following systemic activation of complement in rats. *Inflammation* 1997; 21:325-33.
163. Lambrigts D, Sachs DH, Cooper DK. Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation* 1998; 66:547-61.
164. Diefenbeck M, Linke R, Seehofer D, Terajima H, Thiery J, Hammer C. Intravital microscopic investigation of xenogeneic microcirculation and impact of

- complement depletion by cobra venom factor. *Xenotransplantation* 1998; 5:262-73.
165. McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, et al. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* 1995; 1:423-7.
166. Sun. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Immunology* 1999; 96:628-33.
167. Wang. Functional differences among multiple isoforms of guinea pig decay-accelerating factor. *Immunology* 1998; 160:3014-22.
168. Byrne GW, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SM, Platt JL, Logan JS. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 1997; 63:149-55.
169. McCurry KR, Kooyman DL, Diamond LE, Byrne GW, Logan JS, Platt JL. Transgenic expression of human complement regulatory proteins in mice results in diminished complement deposition during organ xenoperfusion. *Transplantation* 1995; 59:1177-82.
170. Koike C, Katayama A, Kadomatsu K, et al. Reduction of alpha-Gal epitopes in transgenic pig by introduction of human alpha-1,2-fucosyltransferase. *Transplant Proc* 1997; 29:894.
171. Cowan PJ, Chen CG, Shinkel TA, et al. Knock out of alpha-1,3-galactosyltransferase or expression of alpha-1,2- fucosyltransferase further protects CD55- and CD59-expressing mouse hearts in an ex vivo model of xenograft rejection. *Transplantation* 1998; 65:1599-604.
172. Cowan P, Somerville C, Shinkel T, et al. High-level endothelial expression of human CD59 prolongs heart function in an ex vivo model of xenograft rejection. *Transplantation* 1998; 65:862-31.
173. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IF. Human naturally occurring antibodies to pig xenografts. *Transplant Proc* 1994; 26:1392.
174. Sandrin MS, McKenzie IF. Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunol Rev* 1994; 141:169-90.
175. Strahan KM, Gu F, Andersson L, Gustafsson K. Pig alpha 1, 3galactosyltransferase: sequence of a full-length cDNA clone, chromosomal

- localisation of the corresponding gene, and inhibition of expression in cultured pig endothelial cells. *Transplant Proc* 1995; 27:245-6.
176. Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, et al. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity [see comments]. *Nat Med* 1995; 1:1261-7.
177. Sharma A, Okabe J, Birch P, et al. Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:7190-5.
178. Koike C, Kannagi R, Takuma Y, et al. Introduction of alpha(1,2) fucosyltransferase and its effect on alphaGal epitopes in transgenic pig. *Xenotransplantation* 1996; 3:81-6.
179. Sandrin MS, Loveland BE, McKenzie IF. Genetic engineering for xenotransplantation. *J Card Surg* 2001; 16:448-57.
180. McKenzie IF, Li YQ, Patton K, Sandrin MS. Fucosyl transferase (H) transgenic heart transplants to Gal^{-/-} mice. *Transplantation* 2000; 70:1205-9.
181. Cozzi E, White DJ. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1995; 1:964-6.
182. Platt JL, Lin SS, McGregor CG. Acute vascular rejection. *Xenotransplantation* 1998; 5:169-75.
183. Xu H, Gundry SR, Hancock WW, et al. Prolonged discordant xenograft survival and delayed xenograft rejection in a pig-to-baboon orthotopic cardiac xenograft model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:1342-9.
184. McCurry KR, Parker W, Cotterell AH, et al. Humoral responses to pig-to-baboon cardiac transplantation: implications for the pathogenesis and treatment of acute vascular rejection and for accommodation. *Hum Immunol* 1997; 58:91-105.
185. Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, et al. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J Clin Invest* 1998; 101:1745-56.
186. Miyatake T, Sato K, Takigami K, et al. Complement-fixing elicited antibodies are a major component in the pathogenesis of xenograft rejection. *J Immunol* 1998; 160:4114-23.
187. Sato K, Takigami K, Miyatake T. Suppression of delayed xenograft rejection by specific depletion of elicited antibodies of the IgM isotype. *Transplantation* 1999; 68:844.

188. Kunz R, Loss M, Schwinzer R, et al. Analysis of antiporcine antibodies in cynomolgus recipients of porcine kidneys on cyclophosphamide-based immunosuppression. *Transplant Proc* 2000; 32:866.
189. Parker W, Lin S, Yu P, et al. Naturally occurring anti-alpha-galactosyl antibodies: relationship to xenoreactive anti-alpha-galactosyl antibodies. *Glycobiology* 1999; 9:865-873.
190. Galili U, Wang L, LaTemple D, Radic M. The natural anti-Gal antibody. *Subcell Biochem* 1999; 32:79-106.
191. Galili U. Significance of anti-Gal IgG in chronic xenograft rejection. *Transplant Proc* 1999; 31:904-911.
192. Maruyama S, Cantu E, Galili U, et al. Alpha-galactosyl epitopes on glycoproteins of porcine renal extracellular matrix. *Kidney Int* 2000; 57:655-663.
193. Vanhove B, Charreau B, Cassard A, Pourcel C, Souillou JP. Intracellular expression in pig cells of anti- alpha1,3galactosyltransferase single-chain FV antibodies reduces Gal alpha1,3Gal expression and inhibits cytotoxicity mediated by anti-Gal xenoantibodies. *Transplantation* 1998; 66:1477-85.
194. Miyagawa S, Tanemura M, Koyota S, et al. Masking and reduction of the Galactose-alpha1,3-Galactose (alpha-Gal) epitope, the major xenoantigen in swine, by the glycosyltransferase gene transfection. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264:611-4.
195. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295:1089-92.
196. Dai Y, Vaught TD, Boone J, et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002; 20:251-5.
197. Chen R, Kadner A, Mitchell R, Adams D. Mechanisms of delayed rejection in transgenic pig-to-primate cardiac xenotransplantation. *J Surg Res* 2000; 90:119.
198. Masroor S, Cozzi E, Soin B, et al. Absence of hyperacute rejection and preservation of function in hDAF transgenic pig kidneys exposed to prolonged cold ischemia. *Transplant Proc* 2000; 32:965-6.
199. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Fischel RJ, Bolman RM, Bach FH, Platt JL. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am J Pathol* 1992; 140:1157-66.

200. Platt JL, Saadi S. The role of complement in transplantation. *Molecular Immunology* 1999; 36:965-971.
201. Fiane AE, Videm V, Johansen HT, Mellbye OJ, Nielsen EW, Mollnes TE. C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model. *Immunopharmacology* 1999; 42:231-43.
202. Dalmaso AP, Platt JL. Prevention of complement-mediated activation of xenogeneic endothelial cells in an in vitro model of xenograft hyperacute rejection by C1 inhibitor. *Transplantation* 1993; 56:1171-6.
203. Heckl Ostreicher B, Wosnik A, Kirschfink M. Protection of porcine endothelial cells from complement-mediated cytotoxicity by the human complement regulators CD59, C1 inhibitor, and soluble complement receptor type 1. Analysis in a pig-to-human in vitro model relevant to hyperacute xenograft rejection. *Transplantation* 1996; 62:1693-6.
204. Candinas D, Lesnikoski BA, Robson SC, et al. Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. *Transplantation* 1996; 62:336-42.
205. Vangerow B, Hecker JM, Lorenz R, et al. C1-INH for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of hDAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation* 2001; 8:266-72.
206. Hecker JM, Lorenz R, Appiah R, et al. C1-Inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection following pig to cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation* 2002; 73:675-7.
207. Cozzi E, Masroor S, Soin B, Vial C, White D. Progress in xenotransplantation. *Clin Nephrol* 2000; 53:13-18.
208. Zaidi A, Bhatti F, Schmoeckel M, et al. Kidneys from HDAF transgenic pigs are physiologically compatible with primates. *Transplant Proc* 1998; 30:2465-6.

6.2. Abkürzungen

AVR	Acut Vascular Rejection
C	Complement
C1-INH	C1-Esterase Inhibitor (Berinert [®] HS)
CD46	Membrane Cofactor Protein (MCP)
CD55	Decay Accelarating Factor (DAF)
CD59	Protectin
CVF	Cobra Venom Factor
CyA	Cyclosporin A (Optoral [®])
CyP	Cyclophosphamid (Endoxan [®])
DAF	Decay Accelarating Factor (CD55)
DXR	Delayed Xenograft Rejection
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GT	Galactosyltransferase
HAR	Hyperacute Rejection
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheiten
KG	Körpergewicht
MAC	Membrane Attack Complex
MMF	Mycophenolat-Mofetil (Cellcept [®])
n-tg	nicht-transgen
p.o.	per oral
RCA	Regulators of Complement Activation
sC5b-9	löslicher terminaler Komplement-Komplex
sCR-1	soluble complement receptor typ 1
TCC	Terminal Complement Complex
tg	transgen
Tx	Transplantation
Xg	Xenograft
XNA	Xenoreaktive Natürliche Antikörper
XTx	Xenotransplantation

6.3. Abbildungen & Tabellen

Warteliste und Nierentransplantationen.....	1
Abstossungsreaktionen nach Xenotransplantation.....	6
Porcine Niere in situ nach Reperfusion	16
MRT einer porcinen Niere in situ	17
Versuchsgruppen im Überblick.....	19
Prinzip des ELISA zur Messung der Plasma Komplementspiegel.....	22
Gruppenübersicht	24
Überlebenszeiten der Tiere in Gruppe Ia.....	25
Überlebenszeiten der Tiere in Gruppe Ib.....	26
Überlebenszeiten der Tiere in Gruppe IIa.....	27
Überlebenszeiten der Tiere in Gruppe IIb.....	28
Die transplantierten Tiere im Einzelnen	29
Postoperative C3a Komplementspiegel.....	31
Postoperative sC5b-9 Komplementspiegel.....	32
Postoperative Kreatininspiegel	33
Komplementspiegel während AVR unter Standardtherapie	35
C1-INH Pharmakokinetik	36
Komplement- und Kreatininspiegel während AVR.....	38
AVR-Therapie und Erfolgsrate.....	39
Nierenfunktionsparameter im postoperativen Verlauf.....	41
Klinischer Verlauf bei Tier 26/057 (Gruppe IIb).....	42
Klinischer Verlauf bei Tier 27/023 (Gruppe IIb).....	43
Immunhistologie im sequentiellen Verlauf	44
Klinischer Verlauf unter kontinuierlicher C1-INH Therapie	46
Komplementkaskade und Interventionsmöglichkeiten	52

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Michael Winkler danke ich für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung während der Durchführung meiner Arbeit und dafür, dass er stets Zeit für mich und meine Fragen hatte.

Herrn Dr. med. Martin Loss möchte ich für seine freundschaftliche Unterstützung und konstruktiven Diskussionen während der gesamten Arbeitsphase danken.

Danken möchte ich auch meinen Kommilitonen Robert Kunz, Arman Jalali, Jan Schmidtko und Ralf Lorenz für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Professor Dr. med. Jürgen Klempnauer danke ich für die Bereitstellung der Mittel und die Möglichkeit, meine Arbeit in der Klinik für Viszeral- Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover durchführen zu können.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jens Martin Hecker
Geburtsdatum	04. Januar 1976
Geburtsort	Leverkusen
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulische Ausbildung

1982 - 1985	Gebr.-Grimm-Schule, Städt. Grundschule Leverkusen
1986 - 1995	Landrat-Lucas-Schule, Städt. Gymnasium Leverkusen
1995	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1995 - 1996	Remigius-Krankenhaus-Opladen, Leverkusen Interdisziplinäre Ambulanz & Notaufnahme
-------------	--

Studium der Humanmedizin

1996 - 1998	Martin-Luther-Universität Halle
1998	Ärztliche Vorprüfung
1998 - 2002	Medizinische Hochschule Hannover
1999	1. Staatsexamen
1999	United States Medical Licensure Examination (Step 1)
2001	2. Staatsexamen
2002	3. Staatsexamen

Publikationen

Originalarbeiten

1. Jens M **Hecker**, Ralf Lorenz, Richard Appiah, Burkhard Vangerow, Martin Loss, Robert Kunz, Jan Schmidtko, Michael Mengel, Jürgen Klempnauer, Siegfried Piepenbrock, Gerhard Dickneite, Helge Neidhardt, Horst Rückoldt and Michael Winkler. C1-Inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection following pig to cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation* 2002; 73(5):688-94
2. Burkhard Vangerow, Jens **Hecker**, Ralf Lorenz, Martin Loss, Michael Przemeck, Richard Appiah, Jan Schmidtko, Arman Jalali, Horst Rueckoldt, Michael Winkler. C1-Inh for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation* 2001; 8(4):266-72
3. M. Loss, B. Vangerow, J. Schmidtko, R. Kunz, J. **Hecker**, C. Schröder, H. Rückholt, F.J. Kaup, B. Soin, E. Cozzi, H. Piepenbrock, J. Klempnauer, D.J.G. White, M. Winkler. Acute vascular rejection (AVR) of h-DAF transgenic porcine kidneys in immunosuppressed cynomolgus monkeys is associated with systemic and intragraft complement activation. *Transplant Proceedings* 2001; 33(1-2):715
4. **Hecker**, J.M., Lorenz, R., Appiah, R., Loss, M., Przemeck, M., Schmidtko, J., Jalali, A., Vangerow, B., Rueckoldt, H., Klempnauer, J., Winkler M. C1-Inhibitor (C1-INH) for treatment of acute vascular xenograft rejection (AVR) in cynomolgus recipients of porcine kidneys. *American Journal of Transplantation* 2001; 1:S153.
5. Loss, M., **Hecker**, J.M., Vangerow, B., Schmidtko, J., Lorenz, R., Kunz, R., Jalali, A., Piepenbrock, S., Klempnauer, J., Winkler, M. Pathophysiologie und Therapieansätze der akut vaskulären Abstoßungsreaktion (AVR) nach Transplantation h-CD55 transgener Schweinenieren in Cynomolgusaffen. *Transplantationsmedizin* 2002 (im Druck)

6. Niemann H, Verhoeyen E, Wonigeit K, Lorenz R, **Hecker** J, Schwinzer R, Hauser H, Kues WA, Halter R, Lemme E, Herrmann D, Winkler M, Wirth D, Paul D. CMV early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation* 2001; 72:1898-1906.
7. **Hecker** JM, Loss M, Klempnauer J, Winkler M. C1-Inhibitor for therapy and prophylaxis of acute vascular rejection of porcine kidneys in cynomolgus monkeys. *Transplant Proceedings* 2002 (im Druck)
8. Loss M, Appiah R, Lorenz R, **Hecker** JM, Klempnauer J, Winkler M. Koagulopathien nach diskordanter Xenotransplantation unmodifizierter und transgener porciner Nieren in Cynomolgus-Affen. *Transplantationsmedizin* 2001; S206.
9. Lorenz R, Appiah R, **Hecker** JM, Loss M, Kunz R, Schuettler W, Niemann H, Wiebe K, Kniesch K, Klempnauer J, Winkler M. Expression of human CD59 in transgenic porcine kidneys prevents Hyperacute rejection in a discordant xenogenic ex vivo hemoperfusion model. *Transplantationsmedizin* 2002; 14 (im Druck).
10. Loss, M., Lorenz, R., Appiah, R., **Hecker**, J.M., Klempnauer, J., Winkler, M. Disorders of coagulation unrelated to xenograft rejection following pig-to-cynomolgus kidney xenotransplantation. *Transplant Proc* 2001; 33(7-8):3867-8.
11. Loss, M., **Hecker**, J.M., Vangerow, B., Schmidtko, J., Lorenz, R., Kunz, R., Piepenbrock, H., Klempnauer, J., Winkler, M. Komplementaktivierung bei akut vaskulärer Abstoßung (AVR) nach Transplantation CD55 transgener Schweinenieren in Cynomolgusaffen. *Transplantationsmedizin* 2000: S110.
12. Schmidtko, J., Kilic, E., Loss, M., Kunz, R., **Hecker**, J.M., Lorenz, R., Deiwick, A., Helmchen, U., White, D.J.G., Klempnauer, J., Winkler, M. H-CD55 Expression auf porcinem Endothelium verhindert eine hyperakute, nicht aber eine akut vaskuläre Xenotransplantat-Abstoßung. *Transplantationsmedizin* 2000: S164.

13. Lorenz, R.R., Winkler, M., Przemeck, M., Loss, M., Wiebe, K., **Hecker**, J.M., Paul, D., Kniesch, K., Niemann, H. Generation and functional characterization of transgenic pigs expressing the human complement regulatory protein CD59. *Xenotransplantation* 2001; 8(Suppl 1): 53-54.
14. Appiah, R., Przemeck, M., Loss, M., Lorenz, R., **Hecker**, J.M., Winkler, M., Rueckoldt, H., Klemptner, J., Piepenbrock, S. Disorders of coagulation following pig-to-cynomolgus kidney xenotransplantation with modified and unmodified organs. *Xenotransplantation* 2001; 8(Suppl 1): 62-63.
15. J.Schmidtko, E.Kilic, R.Lorenz, J.**Hecker**, R.Appiah, R.Kunz, J.Klemptner, U.Helmchen, M.Winkler. Pig to primate renal xenotransplantation - predominant glomerular injury in long term functioning h-CD55 transgenic kidneys. *American Journal of Transplantation* 2001; 1:S349.
16. A.Jalali, M.Loss, R.Lorenz, R.Kunz, J.Schmidtko, J.**Hecker**, S.Piepenbrock, J.Klemptner, M.Winkler. Anaemia as a restrictive factor for long term survival in discordant kidney xenotransplantation from pigs to cynomolgus monkeys and its causes. *American Journal of Transplantation* 2001; 1:S241.

Vorträge

1. **Hecker** JM, Lorenz R, Appiah R, Loss M, Przemec M, Schmidtko J, Jalali A, Vangerow B, Rueckoldt H, Klempnauer J, Winkler M. C1-Inhibitor (C1-INH) for treatment of acute vascular xenograft rejection (AVR) in cynomolgus recipients of porcine kidneys. „Transplant 2001” Joint Meeting der American Society of Transplantation, Chicago
2. **Hecker** JM, Loss M, Vangerow B, Schmidtko J, Lorenz R, Kunz R, Jalali A, Piepenbrock H, Klempnauer J, Winkler M. Pathophysiologie und Therapieansätze der akut vaskulären Abstossungsreaktion (AVR) nach Transplantation CD55 transgener Schweinenieren in Cynomolgusaffen. 4. Symposium Xenotransplantation, Schloss Rauschholzhausen, 7.-8.10.2000
3. Loss M, **Hecker** JM, Vangerow B, Schmidtko J, Lorenz R, Kunz R, Piepenbrock S, Klempnauer J, Winkler M. Komplementaktivierung bei akut vaskulärer Abstossung (AVR) nach Transplantation CD55 transgener Schweinenieren in Cynomolgusaffen. 9. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Regensburg, 2000.
4. J. Schmidtko, E. Kilic, M. Loss, R. Kunz, J.M. **Hecker**, R. Lorenz, A. Deiwick, U. Helmchen, D.J.G. White, J. Klempnauer, M. Winkler. Porcine h-CD55-transgene Nierentransplantate: zuverlässige Hemmung der hyperakuten, nicht jedoch der akut vaskulären Xenotransplantat-Abstossung. 4. Symposium Xenotransplantation, Schloss Rauschholzhausen, 7.-8.10.2000
5. M. Loss, B. Vangerow, J. Schmidtko, R. Kunz, J. **Hecker**, C. Schröder, H. Rückholt, F.J. Kaup, B. Soin, E. Cozzi, H. Piepenbrock, J. Klempnauer, D.J.G. White, M. Winkler. Acute vascular rejection (AVR) of h-DAF transgenic porcine kidneys in immunosuppressed cynomolgus monkeys is associated with systemic and intragraft complement activation. XVIII. International Congress of The Transplantation Society, Rom, 2000

6. J. Schmidtko, E. Kilic, M. Loss, R. Kunz, J. **Hecker**, R. Lorenz, A. Deiwick, U. Helmchen, J. Klempnauer, M. Winkler. H-CD55 expression on porcine renal endothelia is sufficient to abrogate hyperacute but acute vascular xenograft rejection. International Symposium on Renal Transplantation, Frankfurt/Main, 2.-3.06.2000
7. Loss, M., Lorenz, R., Appiah, R., **Hecker**, J.M., Klempnauer, J., Winkler, M. Disorders of coagulation unrelated to xenograft rejection following pig-to-cynomolgus kidney transplantation. „2001 a transplant odyssee“, Istanbul, 22. 8. – 26. 8. 2001
8. Martin, U., Winkler, M.E., Burian, R., Loss, M., Appiah, R., **Hecker**, J., Denner, M., Winkler M. Untersuchungen potentieller PERV-Transmission in einem humanisierten Schwein-auf-Javaneraffen-Nierentransplantationsmodell. 5. Symposium für innovativen Organersatz, Rauischholzhausen, 2001
9. J.Schmidtko, E.Kilic, M.Loss, R.Kunz, J.M.**Hecker**, R.Lorenz, A.Deiwick, U.Helmchen, D.J.G.White, J.Klempnauer, M.Winkler. H-CD 55 Expression auf porcinem renalen Endothel verhindert eine hyperakute, nicht aber eine akut vaskuläre Xenotransplantat-Abstossung. 9. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Regensburg, 2000.
10. J.Schmidtko, E.Kilic, R.Lorenz, J.**Hecker**, R.Appiah, R.Kunz, J.Klempnauer, U.Helmchen, M.Winkler. Pig to primate renal xenotransplantation - predominant glomerular injury in long term functioning h-CD55 transgenic kidneys. „Transplant 2001“ Joint Meeting der American Society of Transplantation, Chicago
11. A.Jalali, M.Loss, R.Lorenz, R.Kunz, J.Schmidtko, J.**Hecker**, S.Piepenbrock, J.Klempnauer, M.Winkler. Anaemia as a restrictive factor for long term survival in discordant kidney xenotransplantation from pigs to cynomolgus monkeys and its causes. „Transplant 2001“ Joint Meeting der American Society of Transplantation, Chicago

-
12. Lorenz R, Winkler M, Przemeck M, Loss M, Wiebe K, **Hecker** JM, Paul D, Kniesch K, Niemann H. Generation and functional characterization of transgenic pigs expressing the human complement regulatory protein CD59. „6. Congress of the International Xenotransplantation Association”, Chicago, 2001.

 13. Appiah R, Przemeck M, Loss M, Lorenz R, **Hecker** JM, Winkler M, Rueckholdt H, Klempnauer J, Piepenbrock S. Disorders of coagulation following pig-to-cynomolgus kidney transplantation with modified and unmodified organs. „6. Congress of the International Xenotransplantation Association”, Chicago, 2001.

Poster

1. J.M. **Hecker**, M. Loss, J. Klempnauer und M. Winkler. C1-Inhibitor zur Therapie und Prophylaxe der akut vaskulären Abstossungsreaktion von porcinen Nieren im Cynomolgus Affen. 10. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Heidelberg, 2001.
2. Schmidtko, J., Kilic, E., Loss, M., Kunz, R., **Hecker**, J.M., Lorenz, R., Deiwick, A., Helmchen, U., White, D.J.G., Klempnauer, J., Winkler, M. H-CD55 Expression auf porcinen Endothelium verhindert eine hyperakute, nicht aber eine akut vaskuläre Xenotransplantat-Abstossung. 9. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Regensburg, 2000.
3. Lorenz, R., Niemann, H., Schüttler, W., Loss, M., **Hecker**, J.M., Schmidtko, J., Mengel, M., Kues, W., Wonigeit, K., Klempnauer, J., Winkler M. Funktionelle Analysen der Expression von hCD59 in transgenen porcinen Nieren im Xenoperfusionsmodell. 118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, 2001.
4. Jalali, A., Loss, M., Lorenz, R., **Hecker**, J.M., Appiah, R., Piepenbrock, S., Klempnauer, J., Winkler M. Cyclophosphamide induced anaemia as a restrictive factor for long term survival in discordant kidney xenotransplantation from pigs to cynomolgus monkeys. „Transplant 2001” Joint Meeting der American Society of Transplantation, Chicago
5. Schmidtko, J., Loss, M., Kilic, E., Lorenz, R.L., **Hecker**, J.M., Appiah, R., Kunz, R., Klempnauer, J., Helmchen, U., Winkler, M. Pig-to-primate renal xenotransplantation - predominant glomerular injury in long term functioning h-CD55 transgenic kidneys. „Transplant 2001” Joint Meeting der American Society of Transplantation, Chicago

6. Lorenz, R.R., Winkler, M., Przemeck, M., Loss, M., Wiebe, K., **Hecker**, J.M., Paul, D., Kniesch, K., Niemann, H. Generation and functional characterization of transgenic pigs expressing the human complement regulatory protein CD59. „6. Congress of the International Xenotransplantation Association”, Chicago, 2001.
7. Appiah, R., Przemeck, M., Loss, M., Lorenz, R., **Hecker**, J.M., Winkler, M., Rueckoldt, H., Klempnauer, J., Piepenbrock, S. Disorders of coagulation following pig-to-cynomolgus kidney xenotransplantation with modified and unmodified organs. „6. Congress of the International Xenotransplantation Association”, Chicago, 2001.
8. Loss, M., Appiah, R., Lorenz, R., **Hecker**, J.M., Klempnauer, J., Winkler, M. Koagulopathien nach diskordanter Xenotransplantation unmodifizierter und transgener porciner Nieren in Cynomolgus-Affen. 10. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Heidelberg, 2001.
9. J.M.**Hecker**, R.Kunz, J.Schmidtko, A.Jalali, R.Lorenz, M.Loss, J.Klempnauer, M.Winkler. Genetisch veränderte Schweinenieren in der Transplantationsmedizin. Symposium „Das Schwein in unserer Umwelt“ des Schweinezüchterverbandes Hildesheim, Hildesheim, 2000.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Die Bedeutung des Komplementsystems bei hyperakuter und akut vaskulärer Abstossungsreaktion nach diskordanter Nieren-Xenotransplantation im Primatenmodell: Implikationen für Therapie und Prophylaxe“ in der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie im Zentrum Chirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Michael Winkler ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in den im Abschnitt „Publikationen“ aufgelisteten Publikationsorganen veröffentlicht.

Hannover, den 03.02.2003

Jens M. Hecker