

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie

Professor Dr. med. B. Nashan

Charakterisierung xenoreaktiver Antikörper bei klinischer Anwendung eines xenogenen, bioartifiziellen Leberunterstützungssystems bei Patienten mit akutem Leberversagen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Björn Zante
aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.10.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. L. Fischer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. S. Kluge

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jan Schulte am Esch

Bisherige Publikationen der Ergebnisse dieser Arbeit:

Originalartikel:

Schulte am Esch J II, Hamann D, Soltau M, **Zante B**, Jungbluth M, Sputek A, Nierhaus A, Hillert C, Broering DC, Rogiers X (2002) Human antibody deposition, complement activation and DNA-fragmentation are observed for porcine hepatocytes in a clinically applied bioartificial liver assist system. Transplantation proceedings 34(6):2321

Vorträge:

Schulte am Esch J II, Leberunterstützungssysteme mit biologischer Komponente – Warum Zellen vom Schwein? 4. Minisymposium Xenotransplantation, Berlin, Mai 2001

Schulte am Esch J II, Hamann D, Soltau M, **Zante B**, Rogiers X. AB-binding, complement activation and DNA-fragmentation on porcine hepatocytes in a clinically applied liver assist device. 5th Workshop on Xenotransplantation, Spitzingsee, März 2003

Publizierte Abstracts

Schulte am Esch J II, Hamann D, Soltau M, **Zante B**, Jungbluth M, Sputek A, Nierhaus A, Hillert C, Broering DC, Rogiers X (2001) Human antibody deposition and complement activation on porcine hepatocytes in a clinically applied bioartificial liver assist system. Xenotransplantation suppl. VI congress of the international xenotransplantation Association. Chicago

Schulte am Esch J II, Hamann D, Soltau M, **Zante B**, Jungbluth M, Sputek A, Nierhaus A, Hillert C, Fischer L, Rogiers X, (2001) Ablagerung humaner Antikörper und Komplementaktivierung auf Schweinehepatozyten in einem klinisch angewendeten bioartifiziellen Leberunterstützungssystem. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transplantation, Heidelberg, 2001

Verwendete Tabellen:

Tabelle 1: Patientenkollektiv.....	27
Tabelle 2: Geräte, Immunhistologie.....	35
Tabelle 3: Chemikalien, Immunhistologie.....	36
Tabelle 4: Geräte, Zell-ELISA.....	39
Tabelle 5: Chemikalien, Zell-ELISA.....	40
Tabelle 6: Geräte, Durchflußzytometrie.....	42
Tabelle 7: Chemikalien, Durchflußzytometrie.....	43
Tabelle 8: Nachweis von IgM auf Schweinehepatozyten nach Behandlung.....	46
Tabelle 9: Nachweis von IgG auf Schweinehepatozyten nach Behandlung.....	48
Tabelle 10: Nachweis von IgG ₁ auf Schweinehepatozyten nach Behandlung.....	50
Tabelle 11: Nachweis von IgG ₂ auf Schweinehepatozyten nach Behandlung.....	52
Tabelle 12: Nachweis von IgG ₃ auf Schweinehepatozyten nach Behandlung.....	54
Tabelle 13: Nachweis von IgG ₄ auf Schweinehepatozyten nach Behandlung.....	56

Verwendete Abbildungen:

Abbildung 1: evolutionäre Entwicklung des Gal α 1-3Gal Epitops bei Primaten (MYA, million years ago). Quelle: Galili et al. 1988b)	8
Abbildung 2: HepatAssist™-System.....	25
Abbildung 3: HepatAssist™-Leberunterstützungssystem	26
Abbildung 4: negativer immunhistologischer IgM-Nachweis auf nativen Schweinehepatozyten vor Behandlung, Patient #45	45
Abbildung 5: schwach positiver immunhistologischer Nachweis von IgM auf Schweinehepatozyten, Patient #45, 5. Behandlung	47
Abbildung 6: positiver immunhistologischer Nachweis von IgG auf Schweinehepatozyten, Patient #149, 1. Behandlung	49
Abbildung 7: stark positive immunhistologische Anfärbung von IgG auf Schweinehepatozyten, Patient #93, 1. Behandlung	49
Abbildung 8: kein immunhistologischer Nachweis von IgG ₁ auf den Schweinehepatozyten nach der Behandlung, exemplarisch Patient #45, 5. Behandlung	51
Abbildung 9: schwach positiver IgG ₂ -Antikörper Nachweis auf Schweinehepatozyten, exemplarisch Patient #45, 5. Behandlung	53
Abbildung 10: kein Nachweis von IgG ₃ -Antikörpern auf Schweinehepatozyten nach der Behandlung, exemplarisch Patient #45, 4. Behandlung	55
Abbildung 11: positiver IgG ₄ -Antikörpernachweis auf Schweinehepatozyten nach Behandlung, exemplarisch Patient#45, 7. Behandlung.....	57
Abbildung 12: IgM-Titervergleich zwischen den Patienten vor der 1. Behandlung	58
Abbildung 13: IgG-Titervergleich zwischen den Patienten vor der 1. Behandlung	58
Abbildung 14: IgG ₂ -Titervergleich zwischen den Patienten vor der 1. Behandlung	59
Abbildung 15: IgG ₄ -Titervergleich zwischen den Patienten vor der 1. Behandlung	60
Abbildung 16: Zell-ELISA, IgM Titerverlauf während der Behandlungen.....	61
Abbildung 17: Zell-ELISA, IgG Titerverlauf während der Behandlungen.....	61
Abbildung 18: Durchflußzytometrie, IgM-Titerverlauf während der Behandlungen	62

Abbildung 19: Durchflußzytometrie IgG-Titerverlauf	
während der Behandlungen	63
Abbildung 20: Durchflußzytometrie, IgG ₁ -Titerverlauf	
während der Behandlungen	63
Abbildung 21: Durchflußzytometrie, IgG ₂ -Titerverlauf	
während der Behandlungen	64
Abbildung 22: Durchflußzytometrie, IgG ₃ -Titerverlauf	
während der Behandlungen	65
Abbildung 23: IgG ₄ -Titerverlauf während der Behandlungen	66
Abbildung 24: IgM-Titerverlauf über die Gesamtbehandlungsdauer	67
Abbildung 25: IgG-Titerverlauf über die Gesamtbehandlungsdauer.....	68
Abbildung 26: IgG ₂ -Titerverlauf über die Gesamtbehandlungsdauer	69
Abbildung 27: IgG ₄ -Titerverlauf über die Gesamtbehandlungsdauer	70

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	5
1.1 Xenotransplantation	5
1.1.1 Immunpathologie der discordanten (hyperakuten) xenoreaktiven Abstoßung	6
1.1.2 α -Gal Epitop	7
1.1.3 Xenoreaktive Antikörper	9
1.1.4 Xenoreaktive IgM-Antikörper	10
1.1.5 Xenoreaktive IgG-Antikörper	10
1.1.6 Wirkmechanismus des Komplementsystems bei der xenoreaktiven Abstoßung	11
1.1.7 Aktivierung der Inflammation- und Gerinnungskaskade während der hyperakuten xenoreaktiven Abstoßung	12
1.1.8 Zellulär vermittelte Abstoßungsreaktion	12
1.2 Das akute Leberversagen	13
1.2.1 Ätiologie des akuten Leberversagens.....	13
1.2.2 Klinische und biochemische Marker des akuten Leberversagens	14
1.2.3 Prognose des akuten Leberversagens	16
1.3 Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme	16
1.3.1 Historie der bioartifiziellen Leberunterstützung.....	17
1.3.2 Das HepatAssist™-System, erste klinische Erfahrungen	18
1.4 Arbeitshypothese	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Studienbeschreibung	20
2.1.1 Design der multizentrischen Studie	20
2.1.2 Die Schweinehepatozyten	23
2.2 Das HepatAssist™ Leberunterstützungssystem	23
2.2.1 Ablauf der Behandlung mit dem HepatAssist™ -System	25
2.2.2 Antikoagulation	27
2.3 Patienten.....	27
2.3.1 Behandlungsgruppe	28
2.3.2 Kontrollgruppe der Studie	30
2.4 Gewinnung der Serumproben der Behandlungsgruppe.....	30

2.5 Gewinnung der Serumproben der Referenzgruppe	30
2.6 Gewinnung der Schweinehepatozyten.....	31
2.6.1 Verwendung im indirekten Zell-ELISA und in der Durchflußzytometrie	31
2.6.2 Präparation der, vor der Behandlung gewonnenen, Schweinehepatozyten	31
2.6.3 Präparation der, nach der Behandlung gewonnenen, Schweinehepatozyten	31
2.7 Immunhistologische Aufarbeitung der Schweinehepatozyten	32
2.7.1 Fixierung, Einbettung, Schnitttechnik	32
2.8 Nachweis xenoreaktiver Antikörper auf den Schweinehepatozyten.....	33
2.8.1 Vorbereitung der Paraffin-Schnitte	33
2.8.2 Durchführung der Färbung	33
2.8.3 Geräte, Chemikalien zur Immunhistologie.....	35
2.8.4 Sichtung der Schnitte	36
2.8.5 Auswertung der immunhistochemischen Schnitte	36
2.9 Nachweis von xenoreaktiven Antikörpern im Patientenserum mittels Zell- ELISA37	
2.9.1 Geräte, Chemikalien für Zell-ELISA.....	39
2.10 Nachweis von xenoreaktiven Antikörpern im Patientenserum mittels durchflußzytometrischer Messung	40
2.10.1 Geräte, Chemikalien für die Durchflußzytometrie	42
2.11 Statistik	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Immunhistologische Ergebnisse	45
3.1.1 Nachweis von Antikörpern auf den Schweinehepatozyten vor Behandlung	45
3.1.2 Nachweis von IgM-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung	46
3.1.3 Nachweis von IgG-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung	48
3.1.4 Nachweis von IgG ₁ -Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung	50

3.1.5 Nachweis von IgG ₂ -Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung	52
3.1.6 Nachweis von IgG ₃ -Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung	54
3.1.7 Nachweis von IgG ₄ -Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung	56
3.2 Ausgangswerte der Patienten für xenoreaktive Antikörper	57
3.2.3 Ausgangswerte der Patienten für IgM-Antikörper	57
3.2.4 Ausgangswerte der Patienten für IgG	58
3.2.5 Ausgangswerte der Patienten für IgG ₂	59
3.2.6 Ausgangswerte der Patienten für IgG ₄	59
3.3 Ergebnisse des Zell-ELISA	60
3.3.1 IgM-Verlauf während der Behandlungen	60
3.3.2 IgG-Verlauf während der Behandlungen	61
3.4 Ergebnisse der Durchflußzytometrie	62
3.4.1 IgM-Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung	62
3.4.2 IgG-Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung	62
3.4.3 IgG ₁ -Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung	63
3.4.4 IgG ₂ -Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung	64
3.4.5 IgG ₃ -Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung	65
3.4.6 IgG ₄ -Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung	65
3.5 Vergleich der Serumquotienten über die Behandlung	66
3.5.1 Verlauf für IgM	66
3.5.2 Verlauf für IgG	67
3.5.3 Verlauf für IgG ₂	68
3.5.4 Verlauf für IgG ₄	70
4 Diskussion	71
4.1 Immunhistochemischer Nachweis von IgM	72
4.2 Immunhistochemischer Nachweis von IgG ₁	72
4.3 Immunhistochemischer Nachweis von IgG ₂	73
4.4 Immunhistochemischer Nachweis von IgG ₃	74
4.5 Immunhistochemischer Nachweis von IgG ₄	74
4.6 Zell-ELISA/Durchflußzytometrie zur Xenoantikörpercharakterisierung	74

4.7 Peripheres IgM.....	75
4.8 Peripheres IgG.....	76
4.9 Peripheres IgG ₁	76
4.10 Peripheres IgG ₂	77
4.11 Peripheres IgG ₃	77
4.12 Peripheres IgG ₄	78
4.13 Kinetik der Antikörperreaktionen.....	78
4.14 Vergleich der initialen Serumquotienten	79
4.15 Ergebnisse im Kontext der Komplementaktivierung.....	79
4.16 Ergebnisse im Kontext der hyperakuten Abstoßungsreaktion.....	80
4.17 Ausblick	82
5 Zusammenfassung	83
6 Abkürzungsverzeichnis.....	85
7 Literaturverzeichnis.....	87
8 Danksagung	97
9 Lebenslauf.....	98
10 Eidesstattliche Versicherung.....	99

1. Einleitung

Die Mortalität bei Patienten mit Leberversagen liegt mit alleiniger intensivmedizinischer Therapie bei bis zu 90% (Ostapowicz und Lee 2000, Dodson et al. 1994). Die Lebertransplantation (LTX) ist zurzeit die einzige Möglichkeit, die Mortalität zu senken, als auch die Langzeitüberlebensrate zu verbessern. Als übliches chirurgisches Verfahren bei einer Lebererkrankung im Endstadium gilt die orthotope Lebertransplantation, bei der die native Leber durch ein Spenderorgan eines Verstorbenen ersetzt wird. Hierbei beträgt die 5 Jahres-Überlebensrate bis zu 80% (Starzl et al. 1989a, Hoofnagel et al. 1995, Dodson et al. 1994, Starzl et al. 1989b).

Das Angebot an Spenderorganen ist jedoch nicht ausreichend. Die Hälfte der Patienten, die eine neue Leber benötigen, stirbt bevor ihnen ein Spenderorgan zugeteilt werden kann (Chen et al. 1996a). In Deutschland beträgt die Wartezeit auf eine LTX etwa zwölf bis vierzehn Monate, dabei können jedoch jährlich 500 Patienten, die ein Organ benötigen aufgrund des Organmangels nicht transplantiert werden. Es wird angenommen, dass der Bedarf an Spenderorganen weiter wachsen wird. Selektion und Indikationsstellung für eine Lebertransplantation sind aufgrund der Diskrepanz zwischen Organangebot und Bedarf strikter zu handhaben.

1.1 Xenotransplantation

Aufgrund des generell herrschenden Mangels an allogenen Spenderorganen, wird die Verwendung von tierischen Organen überlegt (sog. Xenotransplantation). Bei der richtigen Auswahl der Tierspezies müssen einige Überlegungen angestellt werden. Die Primaten, den Menschen evolutionär am dichtesten gelegen, sind aus immunologischer Sicht interessant für die Xenotransplantation. Ihre geringe Nachkommenschaft, lange Aufzuchtzeiten, schwierige Haltung und nicht zuletzt artenschutzrechtliche Gründe, gestalten die Verfügbarkeit von Organen schwierig. Auch die potentielle Gefahr der Übertragung von Krankheiten von Primate zu Mensch stellt ein Problem dar (Gao et al. 1999). Schweine als Organspender zu verwenden, könnte eine passende Alternative zu sein. Sie wachsen in relativ kurzer Zeit zu der Größe heran, die sie

für die Organtransplantation geeignet macht. Darüber hinaus ist Ihre Anzucht, auch in größeren Zahlen, leicht zu bewerkstelligen. Die lange Zeit, in denen Schweine als Nutztiere domestiziert und in den Alltag der Menschen aufgenommen wurden, lässt ethische Bedenken in den Hintergrund rücken. Auch die Tatsache, dass Schweine in der heutigen Medizin schon einen Platz eingenommen haben spricht für die Wahl von Schweinen als Organspender. Insulin und Herzklappen vom Schwein finden seit langer Zeit Verwendung in der Medizin. Allgemein muss man sich bei der Xenotransplantation zuerst damit auseinandersetzen, wie weit Spender und Empfänger von Organen phylogenetisch von einander entfernt sind. In diesem Zusammenhang wurden von Calne die Begriffe Concordant und Discordant für die jeweiligen Verhältnisse zwischen Empfänger- und Spenderspezies geprägt (Calne 1970). Bei concordanten Verhältnissen liegt der phylogenetische Ursprung von Empfänger- und Spenderspezies dicht zusammen, so dass sich hier keine präformierten bzw. natürlichen Antikörper gegenüber dem Spendergewebe finden lassen. Daraus ergibt sich eine Abstoßungsreaktion, die der einer allogenen Abstoßung entspricht. Diese Situation entspricht dem Verhältnis zwischen Pavian und Mensch. Eine discordante Situation findet man bei Schweinen und Menschen, hier läuft die Immunreaktion sehr viel schneller und intensiver ab als bei einer concordanten Situation, so dass sich für die discordante Abstoßung auch der Begriff der hyperakuten Abstoßungsreaktion etabliert hat.

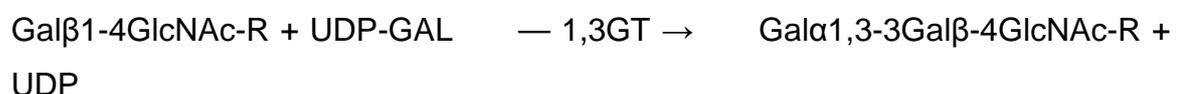
1.1.1 Immunpathologie der discordanten (hyperakuten) xenoreaktiven Abstoßung

Die hyperakute xenoreaktive Abstoßungsreaktion ist in erster Linie eine humorale Immunreaktion, in der die Antikörper, die Aktivierung von Komplementsystem, Inflammation- und Gerinnungskaskade eine Rolle spielen. Die antikörpervermittelte hyperakute Abstoßungsreaktion erfolgt innerhalb von kürzester Zeit durch die Bindung präformierten Antikörper und die entsprechenden Antigenstrukturen (Epitope) und die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg (Makowka und Cramer 1994). Parallel kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg. Die Aktivierung von Inflammations- und Gerinnungskaskade wird durch eine

Vielzahl von nicht-spezifischen humoralen Faktoren ausgelöst. In Ihrer Gesamtheit verläuft die hyperakute xenoreaktive Abstoßungsreaktion eines Organs innerhalb von Minuten bis Stunden nach Reperfusion ab. Dabei kommt es zur Anlagerung von xenoreaktiven Antikörpern, Aktivierung des Komplementsystems, zur Zellyse, damit zur Ödembildung und interstitiellen Blutung, sowie zur Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Thrombosierung des transplantierten Organs und konsekutivem Transplantatverlust.

1.1.2 α -Gal Epitop

Das Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R Epitop (α -Gal-Epitop) ist eines der häufigsten Glykoproteinstrukturen bei Säugetieren. Als eine der Ersten beschrieben Eto et al. (1968) das α -Gal Epitop auf Erythrozyten vom Kaninchen. Bei der Untersuchung von anderen Spezies zeigte sich, dass das α -Gal Epitop bei Fischen, Reptilien, Amphibien und Vögeln nicht nachzuweisen ist, bei Tieren wie Känguru, Maus, Ratte, Fledermaus, Kuh, Pferd, Katze, Hund, Delphin und nicht zuletzt dem Schwein jedoch sehr wohl Struktur der Zelloberfläche ist (Galili et al. 1987, Galili et al. 1988b). Auf Zellen von Lemuren und Affen der neuen Welt (z.B. Affen aus Südamerika) wiederum wird das α -Gal exprimiert. Bei Affenspezies der alten Welt (Affen aus Asien und Afrika), sowie bei den so genannten Menschenaffen (Schimpansen, Gorillas und Orang-Utans) konnte das α -Gal Epitop nicht nachgewiesen werden. Die Synthetisierung des α -Gal Epitops erfolgt durch die α 1,3-Galactosyltransferase (α 1,3-GT), die bei den entsprechenden Spezies im Golgi-Apparat vorkommt. Dabei wird N-acetyllactosamin-R mit UDP-Gal (Uridindiphosphat-Gal) durch Hilfe der α 1,3-GT wie folgt glykosyliert:



Der Nachweis des Enzyms 1,3-GT gelang zunächst im Kaninchen (Basu und Basu 1973, Betteridge und Watkins 1983). Wie zu erwarten gelang im Verlauf auch der Nachweis in Säugetieren und den Affen der neuen Welt, jedoch nicht in den Affenspezies der alten Welt (Galili et al. 1988b, Thall et al. 1991). Später konnte gezeigt werden, dass durch ein Pseudogen die Anlage für die 1,3GT beim

Menschen und den Affen der alten Welt vorhanden ist, durch das Fehlen der mRNA eine Transkription jedoch nicht stattfinden kann (Joziase et al. 1989). Dies lässt darauf schließen, dass die Inaktivierung des 1,3GT-Gens unter anderem durch eine Mutation in den Regulator-Domänen zustande gekommen ist. Des Weiteren konnte eine strukturelle Mutation im Pseudogen der 1,3GT festgestellt werden, die ein Stopp-Codon aktiviert (Larsen et al. 1989). So ist das Fehlen von der 1,3-GT als Resultat aus Mutationen im Bereich der Regulator- als auch Strukturgene zu erklären. Eine detaillierte Analyse der Sequenz des Pseudogens beim Menschen und den Primaten lässt vermuten, dass das 1,3-GT-Gen in den Affen der Alten Welt inaktiv wurde, nach dem diese sich von den übrigen Affen vor ca. 20 Millionen Jahren evolutionär abgespalten haben (Galili und Swanson 1991).

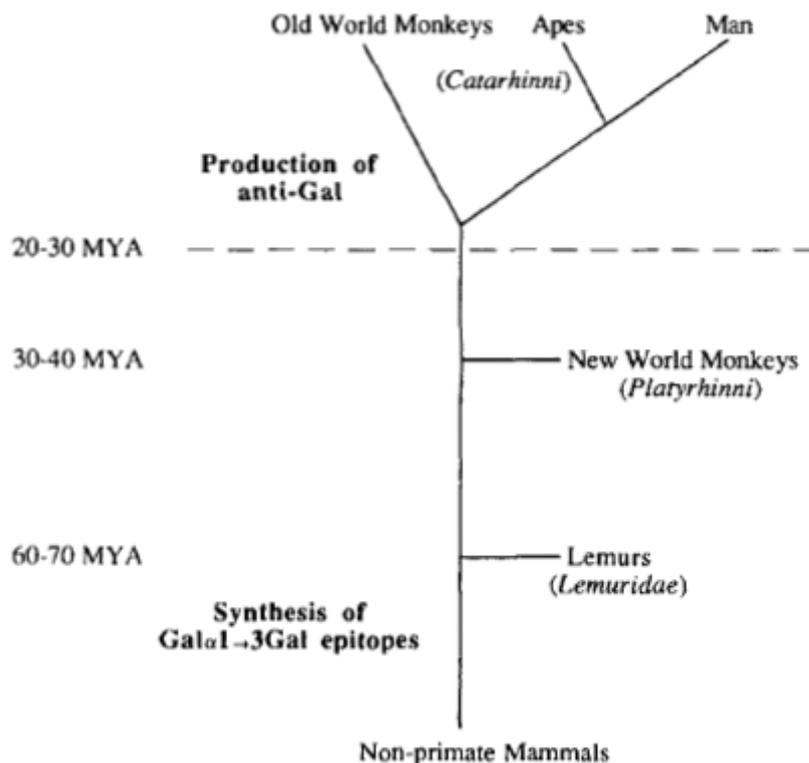


Abbildung 1: evolutionäre Entwicklung des Gal α 1-3Gal Epitops bei Primaten (MYA, million years ago). Quelle: Galili et al. 1988b)

1.1.3 Xenoreaktive Antikörper

Die xenoreaktiven Antikörper lassen sich entsprechend ihrer Bindung gegen verschiedene Epitopstrukturen einteilen. Dabei nimmt die Gruppe der anti- α Gal-Antikörper mit ca. 70-80% der Gesamtmenge der xenoreaktiven Antikörper den Hauptteil ein (Parker et al. 1994). Etwa 1% der B-Lymphozyten haben die Fähigkeit anti- α Gal-Antikörper zu bilden. Der restliche Teil der xenoreaktiven Antikörper, sog. Non- α Gal-Antikörper binden an entsprechend anderen Epitopen. Dabei gehören die anti- α Gal-Antikörper den präformierten oder auch natürlichen Antikörpern an. Die präformierten, oder auch als natürliche Antikörper bezeichneten, sind autoreaktive Antikörper, die durch B-Lymphozytenklone produziert werden. Ihre Bildung erfolgt unter anderem durch klinisch inapparenten Infektionen als auch durch Immunreaktionen gegen die physiologische Darmflora (Keller 1994). Das α Gal-Epitop kommt in seiner Struktur im Lipopolysaccharid (LPS) –System von gram-negativen Bakterien vor, von denen einige in der normalen Darmflora zu finden sind (Bjorndal et al. 1971, Curvall et al. 1973, Jansson et al. 1981). Es ist somit anzunehmen, dass die Produktion von anti- α Gal-Antikörper in der frühen Ontogenese und später durch die kontinuierliche immunologische Stimulation solcher Bakterien erfolgt (Galili et al. 1988a).

Im Serum von humanen Neonaten lassen sich deutlich niedrigere Titer diese präformierten xenoreaktiven Antikörpern der Klassen IgG und IgM nachweisen als bei Erwachsenen (Xu et al. 1995a). Ähnliche Ergebnisse konnten im Tierexperiment nachgewiesen werden (Xu et al. 1995b). In Übereinstimmung damit zeigt sich im nicht-Primaten-Model, aufgrund von niedriger Titer von xenoreaktiven Antikörpern, eine verzögerte hyperakute Abstoßung, die annehmen lässt, dass in Neonaten xenoreaktive Antikörper nur sehr begrenzt vorhanden sind (Kemp et al. 1987).

1.1.4 Xenoreaktive IgM-Antikörper

Generell erscheinen IgM-Antikörper (Immunglobulin M) in der Phylogenese, als auch in der Ontogenese als erster Antikörper. Zudem sind IgM-Antikörper die, bei einer Primärreaktion zuerst auftretende Antikörper. Infolge der zahlreichen Bindungsstellen, aufgrund der Pentamerstruktur, ist die Funktion der Opsonisation, Agglutination und Komplement-Aktivierung wesentlich wirksamer als bei IgG-Antikörpern (Immunglobulin G)(Keller et al. 1994). Die allgemeine Bedeutung von IgM-Antikörpern wird dadurch hervorgehoben, das sowohl die Isohämaglutinine (Anti-A, Anti-B), als auch zahlreiche der natürlichen Antikörper und Endotoxin-bindende Antikörper mehrheitlich dieser Gruppe angehören. Als anti- α Gal Antikörper kommt IgM in unterschiedlichen Anteilen von 1% bis 8% der gesamten IgM-Population vor (McMorrow et al. 1997, Parker et al. 1994). Dabei sind bis zu 94% der xenoreaktiven IgM-Antikörper α Gal-spezifisch (McMorrow et al. 1997, Cotterell et al. 1995). Darüber hinaus zeigt sich immunhistologisch eine Ko-Lokalisation von IgM und dem Membran-Angriffs-Komplex (MAC) des Komplementsystems (Platt et al. 1991). So dass die IgM-Population als Aktivator für die Komplementaktivierung zu vermuten ist.

1.1.5 Xenoreaktive IgG-Antikörper

Die IgG-Immunglobulin-Antikörper (IgG) lassen sich aufgrund der schweren (γ)Ketten in 4 strukturell verschiedene Subklassen unterscheiden (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄). Die Subgruppen von IgG-Antikörpern unterscheiden sich zum einen durch ihre physikalischen Eigenschaften wie elektrophoretischer Wanderung, Molekulargewicht als auch durch ihr biologisches Verhalten. So weisen die Subgruppen unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die Fixation von Komplementfaktoren (Opsonisation und Bakteriolyse) und Zellbindung mit Monozyten und neutrophilen, eosinophilen Granulozyten auf. Als einziges Immunglobulin ist IgG in der Lage, die Plazenta zu passieren, um dem Neugeborenen in den ersten Lebenswochen einen Schutz gegenüber Infektionskrankheiten zu gewähren. Dabei liegen jedoch in menschlichen Neonaten deutlich geringere Antikörper-Titer von xenoreaktiven IgG-Antikörpern als in Erwachsenen (Xu et al. 1995a). Etwa 1%-2,4% der Gesamt IgG-Population bindet gegen das α -Gal-Epitop (McMorrow et al. 1997, Galili et al. 1984, Galili et

al. 1985). Dabei gehören bis zu 79% der xenoreaktiven IgG-Antikörper der anti- α -Gal-Gruppe an (McMorrow et al. 1997). Entsprechend ihres unterschiedlichen biologischen Verhaltens zeigen die IgG-Subklassen auch in ihrer Funktion als xenoreaktive Antikörper ein unterschiedliches Bindungsverhalten.

Die Subklasse IgG₁ spielt für die hyperakute xenoreaktive Abstoßung gegen Schweineendothelzellen keine Rolle (Ross et al. 1993). IgG₁ konnte jedoch in zeitlicher Latenz bei Präsentation von xenogenem Gewebe nachgewiesen werden (Lindeborg et al. 2001, Zahorsky-Reeves et al. 2006).

Die IgG₂ Subklasse zeichnet sich als prädominante xenoreaktiv bindende Antikörpergruppe aus (Zahorsky-Reeves et al. 2006, Ross et al. 1993, Baquerizo et al. 1999).

Die Subklassen IgG₃ und IgG₄ spielen bei der hyperakuten xenoreaktiven Abstoßungsreaktion gegen Schweineendothelzellen keine Rolle (Ross et al. 1993).

1.1.6 Wirkmechanismus des Komplementsystems bei der xenoreaktiven Abstoßung

Das Komplementsystem als Bestandteil des humoralen Abwehrsystems des menschlichen Organismus teilt sich auf in einen klassischen und einen alternativen Aktivierungsweg. Ähnlich dem Gerinnungssystem liegen die einzelnen Faktoren des Komplementsystems als inaktive Proenzyme vor, die sich in einer bestimmten Reihenfolge, überwiegend enzymatisch gegenseitig aktivieren. Seine zahlreichen Einzelkomponenten werden vor allem in Hepatozyten, den Epithel-Zellen des Magen-Darm- und Genitaltraktes, den Makrophagen als auch Fibroblasten synthetisiert. Der klassische Weg der Komplementaktivierung erfolgt über die Bindung an einen Immunkomplex (Antigen-Antikörper-Komplex).

Bei der xenoreaktiven Abstoßung wird die komplementabhängige Zellyse durch IgG₂ vermittelt (Ross et al. 1993). Die Komplementaktivierung über den klassischen Weg kann durch IgM induziert werden (Makowka und Cramer 1994). Zudem ist es aber auch möglich, dass ohne das Vorhandensein von xenoreaktiven Antikörpern eine Komplementaktivierung über den alternativen Weg zustande kommen kann (Forty et al. 1992, Johnston et al. 1991).

1.1.7 Aktivierung der Inflammation- und Gerinnungskaskade während der hyperakuten xenoreaktiven Abstoßung

Die Aktivierung der Inflammation/Gerinnungskaskaden ist ein Teil der nicht spezifischen Reaktionen auf eine discordante Transplantation. Dabei kommt es innerhalb des transplantierten Organs zur disseminierten intravasalen Gerinnung und dem konsekutiven Verschluss von Gefäßen durch Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate. Letztendlich kommt es dabei zu einer Organischämie welche zu einem Verlust des transplantierten Organs führt (Makowka und Cramer 1994). Dabei kommt es durch die Bindung der xenoreaktiven Antikörper an das Endothelium zur Aktivierung der Thrombozyten durch den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF), und die Aktivierung des Arachnoidonsäurestoffwechsels. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Aspirin oder anderen Thrombozytenaggregationshemmern, sowie PAF-Rezeptorantagonisten zu einem verlängerten Transplantatüberleben führt (Adachi et al. 1987, Shons und Najarian 1974, Makowka et al. 1990). Darüber hinaus kommt es nicht nur im transplantierten Organ zur oben genannten Reaktion, sondern auch zu einer entsprechenden Reaktion im Gesamtorganismus des Empfängers im Sinne einer systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS) und unter Umständen einem Multiorganversagen.

1.1.8 Zellulär vermittelte Abstoßungsreaktion

Die zellvermittelte Abstoßungsreaktion eines Xenotransplantats ist bis heute nicht gänzlich geklärt und untersucht. Es scheint jedoch, dass diese Abstoßungsreaktion um einiges intensiver abläuft, als bei einer Allotransplantation (Friedmann et al. 1999). Die zellulär vermittelte Abstoßungsreaktion spielt bei der hyperakuten xenoreaktiven Abstoßungsreaktion allerdings keine Rolle (Makowka und Cramer 1994).

1.2 Das akute Leberversagen

Das akute Leberversagen (ALV) definiert sich durch eine erstmalige, rasch auftretende hepatozelluläre Dysfunktion, klinisch kennzeichnend dafür, ist ein Ikterus, eine Koagulopathie, sowie die Ausbildung einer Enzephalopathie (Lidofsky 1995). Das akute Leberversagen kann in fulminantes und ein subfulminantes Leberversagen unterteilt werden. Hierbei erfolgt die Einteilung durch das zeitliche Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie(HE) nach einem Leberversagen. Beim fulminanten Leberversagen tritt die HE innerhalb von 8 Wochen nach Ikterus auf (Trey 1972). Beim subfulminanten Leberversagen liegt der Zeitraum zwischen 8 und 26 Wochen (Lee 1993). Es gibt eine weitere Einteilung des ALV, wonach dieses in drei Subklassen unterteilt wird: Hyperakutes, akutes, und subakutes Leberversagen.

Hierbei erfolgt die Einteilung nach der zeitlichen Latenz in der eine HE im Verhältnis zum vorbestehenden Ikterus auftritt. Beim hyperakuten Leberversagen tritt die HE bis 7 Tage nach dem Ikterus auf. Beim akuten Leberversagen sind dies 8 bis 28 Tage und beim subakuten Leberversagen entwickelt sich die HE innerhalb von 5 bis 26 Wochen nach dem Ikterus (Williams 1996).

1.2.1 Ätiologie des akuten Leberversagens

Als häufigste Ursache sind die hepatotropen Viren zu nennen, sie sind in etwa 50-80% der Fälle für ein ALV verantwortlich. Medikamente, wie Halothan, Paracetamol, Acetaminophen und Isoniazid verursachen 30-50%. Toxine, wie Phosphor, Amantoxin 5%, Ischämien, respektiv das Budd-Chiari-Syndrom, und Schock 5-10%, sowie verschiedene andere Ursachen (Morbus Wilson, Reye-Syndrom oder Schwangerschaftsfettleber) verursachen 5-10% der ALV. Dabei kann es bei der Häufigkeitsverteilung der Ätiologien Unterschiede geben, wenn Patientenkollektive mit ALV verschiedener Länder miteinander verglichen werden (Capocaccia und Angelico 1991, Manns 1990).

1.2.2 Klinische und biochemische Marker des akuten Leberversagens

Typischer Weise treten zunächst unspezifische Symptome, wie Unwohlsein und Übelkeit auf, schließlich bekommen die Erkrankten einen Ikterus und anschließend, oft plötzlich, eine hepatische Enzephalopathie. Die hepatische Enzephalopathie wird in vier Stadien eingeteilt. Stadium I, zeichnet sich durch eine Verlangsamung, Dysphorie, Schlafstörung und Foteor hepaticus aus. Stadium II wird durch Somnolenz, Asterixis und eine pathologische Schriftprobe gekennzeichnet. Stadium III ist erreicht wenn Stupor, Sprachstörungen und EEG-Veränderungen zu erkennen sind und Stadium IV ist durch ein tiefes Koma, fehlende Reaktion auf Schmerzreize und fehlenden Tremor charakterisiert. Der Grad der HE bestimmt die Prognose des akuten Leberversagens. In den höheren Stadien steigt die Mortalität an. Das Hirnödem tritt in 75-80% der Fälle auf, in denen auch eine HE Stadium IV vorhanden ist, und ist hier die Haupttodesursache (Williams 1991). Darüber hinaus, treten bei Patienten mit ALV schwere Gerinnungsstörung auf. Diese Gerinnungsstörungen sind komplex und umfassen sowohl einen Mangel an prokoagulatorischen als auch ein Defizit an Inhibitoren der Gerinnung und der Fibrinolyse (Pereira et al. 1996). Beim akuten Leberversagen findet man einen Mangel an Faktor II, V, VII, IX, X, Fibrinogen, Prothrombin, Protein S, Protein C und Antithrombin III. Zu dem kommt es zu einer quantitativen und qualitativen Störung der Thrombozyten. Bei mehr als zwei Drittel der Patienten können Thrombozytenzahlen unter 100000/ μ l gemessen werden (O'Grady et al. 1986). Bei Patienten mit einem akuten Leberversagen findet man eine hypotone, hyperdynamie Kreislaufsituation, die aus einem hohen Herz-Zeit-Volumen bei deutlich erniedrigten peripher vasuklären Widerständen resultiert.

Bei 30-75% der Patienten mit einem akuten Leberversagen kommt es zu einem Nierenversagen mit Oligo-Anurie (Mendoza et al 1997). Die Prognose des ALV wird durch ein zusätzliches Nierenversagen noch weiter verschlechtert; nur 30% der Patienten mit fulminanter Hepatitis A oder B überleben diese Befundkonstellation (Böker und Manns 1998). Die Nierenersatztherapie sollte hier noch vor Erreichen der sonst üblichen Dialysekriterien begonnen werden. Die hypotone Kreislaufsituation und die vermehrte Blutungsneigung kann jedoch die Durchführung einer Hämodialyse erschweren (Moore 1991). Beim Vorliegen

eines Hirnödems kann es bei hypotoner Kreislaufsituation durch einen verringerten zerebralen Perfusionsdruck zur weiteren Hirnschädigung kommen. Eine Hypoglykämie tritt häufig bei Patienten mit ALV auf. Diese resultiert aus dem Versagen der Glukoneogenese bei fortschreitender Verschlechterung der Leberfunktion. Dabei kommt es gleichzeitig zu einer verminderten hepatischen Insulinaufnahme und dadurch zu einer Hyperinsulinämie. Durch die Hypoglykämie kann sich die mentale Situation der Patienten verschlechtern, was mitunter als Verschlechterung der hepatischen Enzephalopathie missgedeutet wird (Lee 1996). Beim Vorliegen einer hochgradigen Enzephalopathie wird unter Umständen das klinische Bild einer Hypoglykämie maskiert.

Störungen des Säure-Basen-Haushaltes sind häufig bei Patienten mit ALV zu finden. Bei einem ALV welches auf Basis einer Paracetamolintoxikation beruht, entwickeln bis zu 30% der Patienten eine metabolische Azidose. Bei Patienten mit ALV anderer Genese tritt nur bei etwa 5% der Fälle eine Azidose auf, dabei verschlechtern sich die Prognosen erheblich. Es handelt sich dabei um eine Laktatazidose, bedingt durch die mangelnde Sauerstoffaufnahme in der Peripherie (Pandha 1992). Ursächlich hier für sind die Störung der Mikrozirkulation. Weitaus häufiger als die Azidose bei ALV ist die metabolische Alkalose. Durch das Versagen der Harnstoffsynthese in der Leber häufen sich die Vorstufen der Harnstoffbildung Ammonium und Bikarbonat an (Häussinger et al. 1986).

Patienten mit ALV sind in hohem Maß infektiös gefährdet. Während der Behandlung, der meist komatösen Patienten auf Intensivstation mit einer Reihe von Zugängen, kann es dabei zu katheterassoziierten Infektionen kommen. Bei Behandlung mit Steroiden, gleichzeitigem Nierenversagen und maschinelle Beatmung ist die Gefahr der Infektion besonders groß. Am häufigsten sind Infektionen der Atemwege (62%), gefolgt von positiven Urin- (48%) und Blutkulturbefunden (20%) zu nennen.

1.2.3 Prognose des akuten Leberversagens

Es liegen wenige Daten vor, um großen kontrollierten Studien zu erheben, da das ALV zu selten auftritt. Eine Studie vom King's College Hospital in London zeigte zwar eine Verbesserung der Überlebensraten bei Patienten mit ALV über die letzten 20 Jahre, durch besseres Verständnis des ALV und Entwicklung neuer Therapiestrategien (Hughes et al. 1991). Die Überlebensrate hängt jedoch vor allem von der Ätiologie des ALV ab. Durch Hepatitis A-Viren aufgelöstes ALV hat die niedrigste Mortalitätsrate von 50-60% (Gimson et al. 1983). Bei einer Infektion mit Hepatitis B Viren und folgendem ALV, je nach dem, ob es zu einer Koinfektion mit Hepatitis D kommt, liegt die Mortalitätsrate bei 65-80% (Saracco et al. 1988).

1.3 Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme

Der Versuch, die Leber in ihrer Funktion komplett artifiziell zu ersetzen, gelang bis jetzt nur unzureichend. Die Leber in seiner Funktion als Organ der Entgiftung, zu unterstützen oder zu ersetzen ist bisher im Routineeinsatz durch das Prometheus-System (Fresenius) oder das MARS-System (Molecular Adsorbent Recirculating System; Gambro) gelungen. Bei diesen Systemen wird die Syntheseleistung der Leber in keiner Weise berücksichtigt. Eine Vielzahl der Komplikationen des ALV resultieren jedoch aus der fehlenden Syntheseleistung der Leber, wie Koagulopathien bei unzureichender Produktion von Gerinnungsfaktoren in der Leber, mangelnder Albuminproduktion oder gravierende metabolische Störungen. Daher kann bei der Therapie des ALV die theoretischen Funktionseinheiten der Leber „Filter“ und „Synthese“ nicht getrennt, sondern nur im Zusammenhang gesehen werden. Dies auf ein Ersatzverfahren für die Leber zu übertragen, scheint die optimale Strategie in der Therapie der ALV zu sein. Jedoch ist die Synthesefunktion technisch nicht reproduzierbar, da es sich um einen biologischen Prozess handelt. Logischer Schritt ist daher das benötigte Bio-System künstlich zu implementieren, also Lebergewebe als biologische Einheit zu verwenden.

1.3.1 Historie der bioartifiziellen Leberunterstützung

Die ersten artifiziellen Leberunterstützungssysteme beruhten darauf, die Detoxifikation in den Vordergrund der Therapie des ALV zu stellen. Es zeigte sich jedoch, dass die Detoxifikation die Überlebensrate bei ALV nicht verbessert (Gimson et al. 1982, Matsubara et al. 1990, Silk et al. 1977). Auch der Plasmaaustausch als Therapievariante zeigte sich als nicht zukunftsfähig (Burnell et al. 1967).

Im Verlauf wurde jedoch neben der Detoxifikation auch die Syntheseleistung als Anforderung an eine artifizielle Leberunterstützung gestellt. Der nächste Schritt in der Entwicklung des artifiziellen Leberunterstützungssystems war die Verwendung von Lebergewebe, um die Synthesefunktion zu integrieren. Ansatzpunkt hierzu war die extracorporale Perfusion von humanen oder porcinen Lebervollorganen (Sen et al. 1966, Eiseman et al. 1965), Leberanteilen (Kimura et al. 1980, Kawamura et al. 1985) und isolierte Hepatozytenkulturen (Chen et al. 1996b, Rozga et al. 1993).

Bei der Verwendung von Vollorganen oder Leberanteilen stand die Schwierigkeit der adäquaten Perfusion und Lagerung im Vordergrund. Bei isolierten Hepatozyten wurde zunächst die strukturelle Anordnung der Hepatozyten vernachlässigt bzw. unbeachtet gelassen, da diese zum Teil noch nicht gänzlich verstanden wurde. Ein zunehmendes Verständnis, für die Funktion der Hepatozyten im Zellverband, die dreidimensionale Anlagerung an eine Matrix wie Kollagen oder Dextrose-Beads für die Hepatozytenfunktion, sowie neue Erkenntnisse bei der Kryopräservierung und Hepatozytenkultivierung, erbrachten die Fortschritte bei der Entwicklung bioartifizieller Leberunterstützungssysteme (Goulet et al. 1988).

Die so gewonnenen Erkenntnisse erleichterten die Handhabung und Lagerung von Hepatozytenkulturen, im Vergleich zur komplizierten Verwendung von Voll- oder Teilorganen, so dass zunehmend Hepatozytenkulturen bei der Entwicklung von bioartifizellen Leberunterstützungsverfahren genutzt wurden.

1.3.2 Das HepatAssist™-System, erste klinische Erfahrungen

Im Rahmen einer Phase I-Studie wurden 31 Patienten unterteilt in drei Subgruppen mit dem bioartifizellen Leberunterstützungssystem HepatAssist™ (Circe Biomedical Inc., Massachusetts, USA) behandelt. Die erste Subgruppe (n=18) enthielt Patienten mit einem fulminanten Leberversagen, ohne jedoch zuvor an einer chronischen Lebererkrankung gelitten zu haben. Gruppe II (n=3) bestand aus Patienten, die sich einer Lebertransplantation unterzogen haben, bei denen es jedoch zu einem primären Transplantatversagen kam. Die Patienten beider Gruppen waren Kandidaten und gelistet für eine Lebertransplantation (LTX). In Gruppe III (n=10) wurden Patienten subsumiert, die an einer chronischen Lebererkrankung litten, die akut exazerbierte und aufgrund von chronischem Alkoholabusus, Sepsis und Multiorganversagen nicht als Kandidaten für eine LTX in Fragen kamen. Nach protokollgerechter Behandlung der Patienten mit dem HepatAssist™ konnten in Gruppe I 16 Patienten erfolgreich zur Transplantation geführt werden. Ein Patient erholte sich unter der Therapie soweit, dass auf eine Transplantation verzichtet werden konnte. Ein Patient verstarb an einer sich parallel entwickelnden Pankreatitis. Alle Patienten in Gruppe II konnten erfolgreich bis zur LTX überbrückt werden. In Gruppe III konnten 2 Patienten durch die Behandlung soweit rekompensiert werden, um die Kriterien zur Listung für eine LTX zu erfüllen. Diese beiden Patienten konnten erfolgreich lebertransplantiert werden. Die acht weiteren Patienten der Gruppe III verstarben.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit dem bioartifizellen Leberunterstützungssystem (BAL) HepatAssist™ hämodynamisch und immunologisch gut vertragen wurde. Auch die neurologischen Untersuchungen zeigten einen verbesserten neurologischen Status unter der Therapie. Dabei konnte der intrakranielle Druck signifikant gesenkt werden. Unter der Berücksichtigung dieser Ergebnisse der Phase I-Studie (Watanabe et al. 1997) wurde eine randomisierte, kontrollierte, prospektive Studie der Phase II-III initiiert.

1.4 Arbeitshypothese

Grundlage dieser Arbeit ist eine Phase II/III-Studie, in deren Rahmen Patienten mit einem akuten Leberversagen mit Hilfe eines xenogenen bioartifiziellen Leberunterstützungsystems behandelt wurden.

Als biologische Komponente dieses Systems dienten Schweinehepatozyten. Diese biologische Komponente, unumgänglich für die leberspezifischen Ersatz/Unterstützungsfunktionen, bedingt durch ihren xenogenen Charakter eine starke immunologische Reaktion. Diese wird durch so genannte präformierte Antikörper ausgelöst. In wie weit sich diese immunologische Reaktion beim Patienten als auch bei den verwendeten Schweinehepatozyten nachweisen lässt, ist kaum untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, in welchem Maße es zu einer Interaktion des humoralen Immunsystems kommt. Es sollen die Fragen geklärt werden, welche xenoreaktiven Antikörper an die verwendeten Schweinehepatozyten binden und ob es zu einer Veränderung der Konzentration an xenoreaktiven Antikörpern während der Behandlung kommt. Hierbei werden immunhistochemische Verfahren zur Färbung der gebundenen xenoreaktiven Antikörper auf den verwendeten Schweinehepatozyten angewendet. Veränderungen der Antikörperkonzentration im Patientenserum, im Verlauf der Behandlung, werden mittels Zell-ELISA und durchflußzytometrischer Untersuchung aufgezeigt. Dabei konnten für alle angewendeten Techniken neuen Methoden etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Studienbeschreibung

Als Grundlage dieser Dissertation diente eine multizentrische Studie zur Untersuchung der klinischen Effektivität eines bioartifiziellen Leberunterstützungssystems gegenüber der standardisierten Intensivtherapie bei Patienten mit akutem Leberversagen.

Der Titel der Studie lautete „Eine multizentrische, randomisierte, kontrollierte Phase II/III-Studie an Parallelgruppen über das HepatAssist™-System zur Unterstützung der Leberfunktion im Vergleich zur intensivmedizinischen Standard-Therapie von Patienten mit akutem Leberversagen und hepatischer Enzephalopathie.“

Im Rahmen dieser Studie wurden am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, die mit dem HepatAssist™-System behandelten Patienten hinsichtlich der xenoreaktiven Immunreaktion, im speziellen der xenoreaktiven Antikörper, untersucht. Dies ist Gegenstand dieser Dissertation.

2.1.1 Design der multizentrischen Studie

Bei der primären Fragestellung der Studie wurde die Überlebensrate am 30. Tag nach Standard-Intensivmedizinischer Therapie (SIT) plus BAL-Behandlung auf einer operativen Intensivstation, mit der Standard-Intensivtherapie verglichen.

Als sekundäre Fragestellung sollte die Sicherheit einer täglichen Behandlung mit der BAL plus SIT für akuten Leberausfall mit der bei SIT verglichen werden. Des Weiteren sollten pharmakökonomische Aspekte von BAL plus SIT mit der alleinigen SIT verglichen werden.

Die maximale Dauer der Behandlung betrug zwei Wochen. Die vorzeitige Abbruch der intensivierten Datensammlung, vor Erreichen der Zeitspanne von 14 Tagen oder der 14. BAL-Behandlung erfolgte bei Tod, Lebertransplantation, anhaltender neurologischer Besserung, einem schwerwiegenden medizinischen Ereignis, welches als Kontraindikation für weitere BAL-Behandlungen anzusehen war. Eine Zeitspanne von über 72 Stunden zwischen zwei BAL-Behandlungen führte ebenfalls zu einem Abbruch.

Die Nachbehandlungsphase streckte sich vom 14. bis zum 29. Tag. Die Follow-Up-Periode erstreckte sich über zwölf Monate mit Kontrollterminen nach 1, 2, 3, 6, 9, 12 Monaten. Insgesamt waren in dieser Studie 10 Zentren in den USA und 9 Zentren in Europa beteiligt. Die Gesamtfallzahl betrug 171 Patienten.

In die Studie wurden Patienten eingeschlossen, bei denen die Primärdiagnose des akuten Leberversagens, aufgrund eines primär nicht funktionierenden Lebertransplantates oder einem fulminanten Leberversagen mit hepatischer Enzephalopathie (Stadium III- IV), gestellt wurde.

Ein primär nicht funktionierendes Lebertransplantat wurde durch folgende Parameter definiert:

- mehr als 48 Stunden und weniger als sieben Tage nach Transplantation und
- zur Retransplantation gelistet und
- dopplersonographisch nachgewiesener Blutfluß durch die Leber und
- Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) > 2500 IU/ml oder Prothrombinzeit (PT) > 16.5 sec. oder beides
- fehlende Verbesserung der Leberfunktion nach Transplantation innerhalb der letzten 48 Stunden

Das fulminante Leberversagen mit hepatischer Enzephalopathie (Stadium III- IV) definierte sich durch:

- Entwicklung eines Ikterus innerhalb der letzten 12 Wochen vor Einschluss in die Studie und;
- Vorhandensein einer hepatischen Enzephalopathie Stadium III-IV.

Die Patienten wurden hinsichtlich der Einschließbarkeit in die Studie überprüft. Die Ätiologie des Leberausfalls mit der Präsenz einer hepatischen Enzephalopathie konnte sowohl viral, paracetamolinduziert als auch anderer, bzw. unbekannter Genese sein.

Ausschlusskriterien für alle Patienten waren:

- Körpergewicht unter 40 kg.
- auf Behandlung nicht ansprechende Sepsis
- Nachweis von irreversiblen Hirnschädigungen
- schwere Hypoxämie aufgrund von intrapulmonalem rechts-links-Shunting
- Schwere, vorbestehende Nierenschädigung, welche unabhängig von der Lebererkrankung anzusehen ist
- schwere Herzerkrankung
- im Endstadium befindliche Tumorerkrankung
- unkontrollierbare Blutung
- AIDS (HIV-Positivität an sich kein Ausschlusskriterium)
- Hypersensitivität auf Schweineprodukte
- Patient wurde zuvor schon in dieser Studie eingeschlossen
- Schwangerschaft

Ausschlusskriterien, die bei primär nicht funktionierendem Lebertransplantat zum tragen kamen:

- ABO- inkompatibles Lebertransplantat
- Akute Abstoßung

Ausschlusskriterien die für das fulminante Leberversagen galten:

- Leberversagen aufgrund von chronischer Transplantatabstoßung, Hepatektomie oder transarterieller Embolisation
- vorbestehende chronische Lebererkrankung
- Enzephalopathie nicht-hepatischer Genese

2.1.2 Die Schweinehepatozyten

Die Schweinehepatozyten wurden von Schweinen aus kontrollierten Herden gewonnen. Die Aufzucht erfolgte unter hochreinen Bedingungen. Die Hepatozyten wurden mittels Kollagenase aus den Schweinelebern isoliert, ohne dabei die Zellen zu zerstören, oder Ihre Funktionalität zu beeinträchtigen (Morsiani et al. 1995). Anschließend erfolgte die eingehende Qualitäts- und Sicherheitskontrolle der Zellen (Mullon 1999). Zur Lagerung wurden die Schweinehepatozyten cryokonserviert. Dieses Verfahren erfolgte durch den Studiensponsor (Circe Biomedical Inc., Massachusetts, USA).

Die Präparation der Schweinehepatozyten erfolgte unmittelbar vor Behandlung in der transfusionmedizinischen Abteilung des UKE. Die cryokonservierten Zellen, in ihrem Reservoir, wurden zur Behandlung in einem sterilen Warmwasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen im COBE 2991 Zell Prozessor gewaschen und von der cyroprotektiven Lösung befreit. Die Zellen wurden gezählt und auf ihre Vitalität mittels Trypan-Blau überprüft. Anschließend erfolgte die Zugabe von Microcarrier (Dextrosebeats, Cytodex 3, Pharmacia Piscataway, New York, USA) um die metabolische Funktion durch eine Oberflächenvergrößerung zu verbessern. Als Trägermedium diente physiologische Kochsalzlösung. Die so präparierten Zellen wurden zum behandelten Patienten transportiert und dort in die BAL, in den Raum zwischen die Hohlfasern der Kartusche eingefüllt.

2.2 Das HepatAssist™ Leberunterstützungssystem

Das verwendete HepatAssist™ wurde von Circe Biomedical, Inc., in Kooperation mit der Forschungsgruppe um Demetriou vom Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles entwickelt.

Das HepatAssist™ Leberunterstützungssystem besteht aus einem Plasmapheresekreislauf, an den sich ein zweiter, der HepatAssist™-Kreislauf, anschließt. Das Plasmapheresegerät (Cobe Spectra™) ermöglicht es, das Plasma nach der Apherese direkt in den HepatAssist™-Kreislauf einzuspeisen oder es in ein Zwischenreservoir zu leiten. Nachdem das Plasma den HepatAssist™-Kreislauf durchlaufen hat, werden im Plasmapheresesystem

Plasma und zelluläre Bestandteile zusammengeführt und anschließend dem Patienten wieder infundiert. Dies erfolgt über einen Dialysekatheter in der V. femoralis.

Das Plasma im HepatAssist™-Kreislauf durchfließt in Reihenfolge 1. einen Aktivkohlefilter (Gambro Adsorba 300C), 2. einen Oxygenator (Terumo Capiiox® 308) um 3. nach der BAL, über einen Reservoirbeutel (4.) wieder zum Plasmapheresegerät zurückgeführt zu werden. Der HepatAssist™-Kreislauf ist im Verlauf mit Druck und Temperaturmesssystemen und einer Kreislaufpumpe ausgestattet.

Die BAL besteht aus einer Kartusche, die von Hohlfasern durchzogen wird. Durch diese Hohlfasern fließt das Patientenplasma. Um diese Hohlfasern herum befinden sich ca. 5×10^9 Schweinehepatozyten in homogener Mischung mit Dextrose-Gelkugel. Diese Hohlfasern haben eine Porengröße von 0.15 – 0.20 Micron und eine Gesamtoberfläche von $1,5 \text{ m}^2$. So wird es dem zirkulierenden Plasma ermöglicht mit den Schweinehepatozyten in Kontakt zu treten, ohne dass die Gefahr besteht, dass korpuskuläre Bestandteile die Hohlfasermembran passieren können. Gase (Sauerstoff und Kohlendioxid), Nährstoffe sowie hoch- und niedermolekulare Moleküle können jedoch ausgetauscht werden.

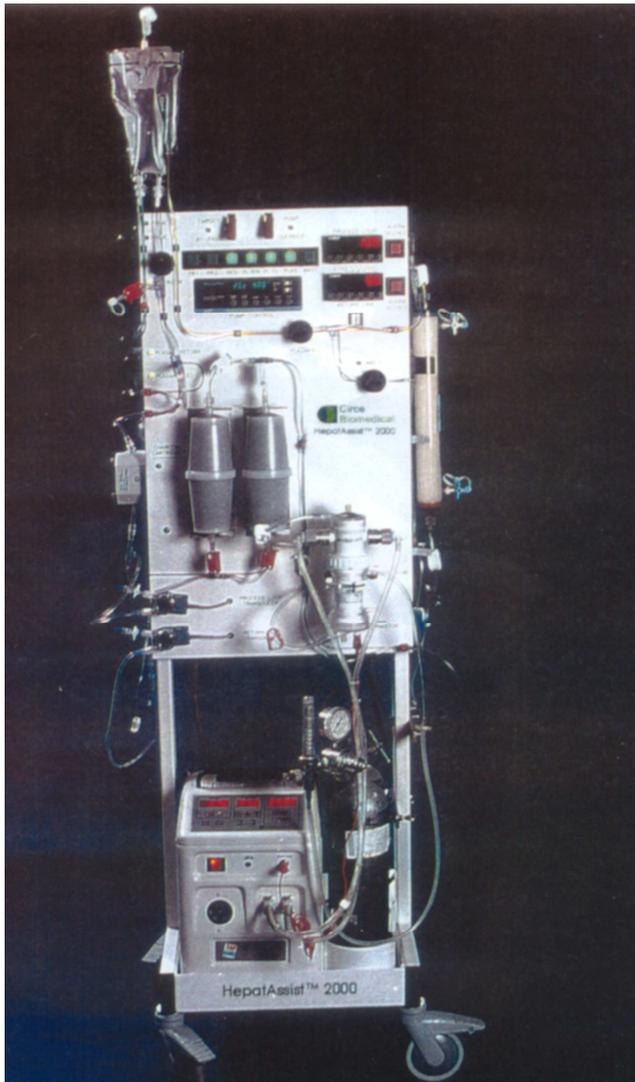


Abbildung 2: HepatAssist™-System (Quelle: Circe Biomedical, Investigator's Brochure, Version 5)

2.2.1 Ablauf der Behandlung mit dem HepatAssist™ -System

Eine Behandlung startet zunächst mit einer einstündigen Plasmapherese um Reservoirbeutel und das HepatAssist™-Kreislaufsystem mit Plasma zu befüllen. Anschließend erfolgt der sechsstündige kontinuierliche Plasmadurchlauf durch das HepatAssist™-Leberunterstützungssystem. Dabei wird dem Patienten mit einer Flußrate von 100 ml/min Blut entzogen, separiert und mit einer Flußrate von 30-50ml/min in das HepatAssist™-Kreislauf eingespeist. Innerhalb des HepatAssist™-Kreislaufsystems fließt das Plasma mit einer Geschwindigkeit von 400 ml/min. Das entspricht bei einer Behandlungsdauer von sechs Stunden, einem Gesamtplasmavolumen von 144 Litern, die durch BAL laufen und so

Kontakt zu den Schweinehepatozyten haben, dabei beträgt das Plasmavolumen in der BAL 155ml. Das entspricht einer Austauschrate von 2,58ml/Minute innerhalb der BAL. Das Plasmavolumen, das sich während der Behandlung in dem HepatAssist™-Kreislauf befindet, beträgt 710ml. Nachdem das Plasma die BAL durchlaufen hat, wird es in einem Plasmareservoir gesammelt. Von hier gelangt es zum entweder zurück zur Plasmaphereseeinheit oder wieder in den HepatAssist™-Kreislauf, um erneut durch die BAL zu fließen. In der Plasmaphereseeinheit wird dieses Plasma mit vorher separierten Blutzellen vermischt und dem Patienten wieder zugeführt. Die Rückführrate entspricht der Entzugsrate.

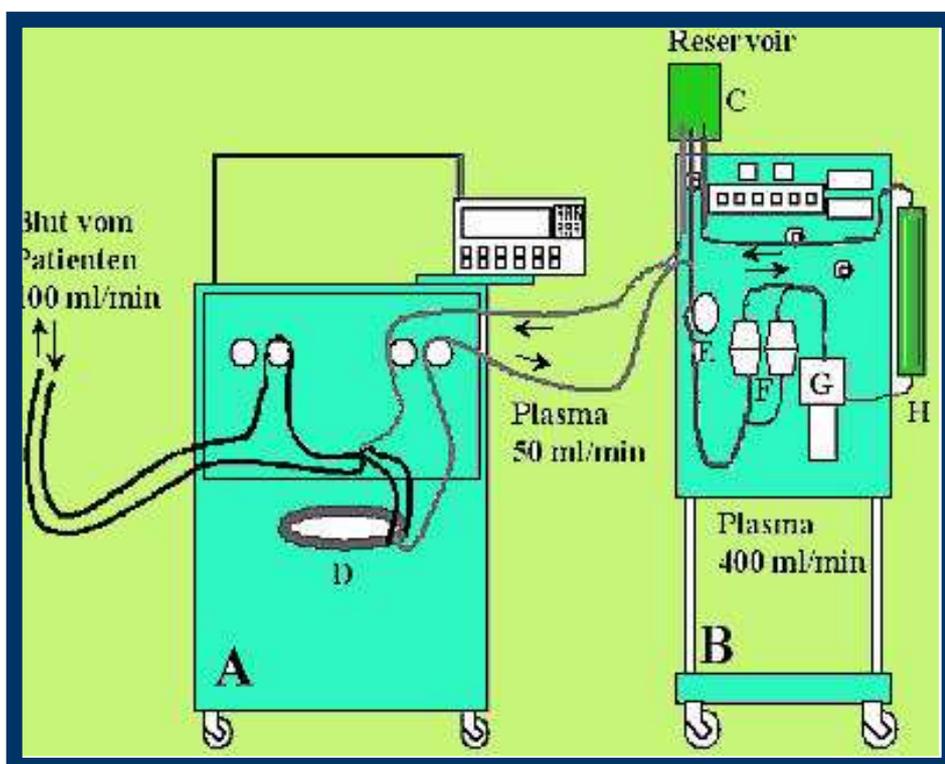


Abbildung 3: HepatAssist™-Leberunterstützungssystem, A: Plasmaphereseeinheit, B: HepatAssist™-Kreislaufsystem, C: Reservoirbeutel, D: Zentrifuge, E: Pumpe, F: Kohlefilter & Oxygenator, G: Wärmeaustauscher & Oxygenierer, H: BAL/ Kartusche

2.2.2 Antikoagulation

Es erfolgte eine Citrat-Antikoagulation in der Cobe Spectra Aphaese-Einheit mit einem Verhältnis von 20:1. Diese Art der Antikoagulation macht die Kontrolle des Blut-Kalziumspiegels nötig, da die Möglichkeit einer Hypokalzämie besteht, die durch Kalziumsubstitution behoben werden muss.

2.3 Patienten

Das positive Ethikvotum für die Durchführung die Studie wurde am 29. Juni 1998 von der Hamburger Ärztekammer als auch der Freiburger Ethikkommission erteilt. Die entsprechende Patientenaufklärung zum Studieneinschluß wurde ebenfalls durch die Ethikkommission positiv beurteilt. Entsprechend wurde der Patient, bzw. der richterlich eingesetzte Betreuer/in über mögliche Risiken und Gefahren der Behandlung aufgeklärt. Die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie erfolgte schriftlich durch Unterzeichnung der Patientenaufklärung.

Patient	Alter (Jahre)	Geschlecht	Körper- größe	Gewicht	Behandlungen	Diagnose
Behandlungsgruppe						
#33	51	Männlich	180	80	1	viral
#45	40	Weiblich	160	60	8	Fettleber
#93	20	Männlich	180	84	1	toxisch
#149	66	Weiblich	170	70	4	unklar
Kontrollgruppe						
#36	24	weiblich	155	90	konservativ	unklar
#51	44	weiblich	174	88	LTX	unklar
#55	27	weiblich	165	50	konservativ	viral
#77	35	weiblich	163	64	LTX	Abstoßung
#142	24	weiblich	165	70	LTX	unklar
#159	43	Männlich	170	65	konservativ	Intoxikation

Tabelle 1: Patientenkollektiv

2.3.1 Behandlungsgruppe

Im Rahmen der Studie wurden vier Patienten mit dem HepatAssist™ behandelt. Bei Patient #33 handelte es sich um einen 51 Jahre alten Mann. Dieser Patient wurde bereits 4 Jahre zuvor bei fulminanter Hepatitis B orthotop Lebertransplantiert, sowie einer erneuten Transplantation unterzogen, nachdem es 2 Tage postoperativ zur Ausbildung eines primären Transplantatversagens kam. Im Verlauf zeigte sich eine progrediente Verschlechterung der Leberfunktion mit weiterem Anstieg der Transaminasen und des Serum-Bilirubins, Ausbildung einer hepatischen Enzephalopathie sowie beginnendem hepatorenalem Syndrom. Es erfolgte die High-Urge-Listung zur erneuten Lebertransplantation. Auf der Intensivstation folgte ein kompletter Behandlungszyklus mit dem HepatAssist™, bevor der Patient zunächst erfolgreich orthotop transplantiert werden konnte. Im kurzpostoperativen Verlauf konnte jedoch weder sonographisch als auch angiographisch eine intrahepatische arterielle Perfusion nachgewiesen werden. Aufgrund des angiographischen Befundes wurde die Indikation zur erneuten Lebertransplantation gestellt, die einen Tag später erfolgte. Am ersten postoperativen Tag konnte der Patient erfolgreich extubiert werden. Der weitere postoperative Verlauf gestaltete sich komplikationslos.

Die Patientin #45 wurde mit Erbrechen, Übelkeit, seit einem Tag bestehendem Ikterus, steigendem Transaminasen sowie progredienter hepatischen Enzephalopathie eingeliefert. Als Ursache hierfür war ein Leberversagen bei Fettleberhepatitis diagnostiziert. Nach Einschluss in die Studie konnte die Patientin insgesamt achtmal mittels HepatAssist™-System behandelt werden. Unter der Behandlung kam es zu leichter Reduktion der hepatischen Enzephalopathie, zeitweise war die Patientin kontaktfähig. Die Transaminasen waren leicht rückläufig. Nach der achten Behandlung kam es bei gastrointestinalen Ulzera zu Blutungen, die transfusionsbedürftig waren. Daraufhin wurde eine neunte Behandlung mit dem HepatAssist™ ausgesetzt. Parallel dazu entwickelte die Patientin zusätzlich ein hepatorenales Syndrom. Bei verbesserter neurologischer Gesamtsituation wurde bis Tag elf von weiteren Behandlungen mittels HepatAssist™, gemäß Studienprotokoll, abgesehen. Im weiteren Verlauf

verschlechterte sich der Zustand der Patientin zusehends, so dass die Patientin 36 Tage nach Studieneinschluß im Multiorganversagen verstarb.

Der 20 Jahre alte Patient #93 wurde bei zwei Wochen bestehendem Ikterus und fortschreitender hepatischen Enzephalopathie, die bei Aufnahme Grad III-IV betrug, vorstellig. Der Grund für das fulminante Leberversagen war die Intoxikation mit Paracetamol und Carbamazepin, bei einer chronisch bestehenden Hepatitis B ohne Zeichen einer Zirrhose. Es wurde eine Behandlung mittels des HepatAssist™-System durchgeführt. Im behandlungsfreien Intervall kam es zum massiven Anstieg des intrakraniellen Druckes. Die neuroradiologische Untersuchung mittels CCT ergab die Diagnose eines subduralen Hämatoms als auch einer subarachnoidalen Blutung. Bei komplett derangierter Gerinnung wurde von einer chirurgischen Intervention abgesehen. Der Hirntod wurde am Tag nach der ersten Behandlung mit dem HepatAssist™ festgestellt.

Bei Patienten #149 handelt es sich um eine 66 Jahre alte Frau. Neunzehn Tage vor Start der Behandlung mit dem HepatAssist™ wurde die Patientin mit zunehmendem Schwächegefühl, Ikterus und Stuhlfärbung stationär aufgenommen. Hier entwickelte die Patientin im Verlauf eine fulminante Hepatitis unklarer Genese mit zunehmender Dekompensation, hepatischer Enzephalopathie und substitutionspflichtiger Gerinnungsstörung. Die Patientin wurde hochdringlich für eine Lebertransplantation gelistet. Während der Wartephase auf die Lebertransplantation konnte die Patientin erfolgreich vier vollständige Behandlungszyklen mit dem HepatAssist™-System erhalten. Einen Tag nach dem letzten Behandlungszyklus, erfolgte schließlich die problemlose orthotope Transplantation eines Vollorgans. Der weitere postoperative Verlauf gestaltete sich komplikationslos.

2.3.2 Kontrollgruppe der Studie

Die Patienten der Kontrollgruppe mit der Standard-Intensivtherapie behandelt. Im Rahmen dessen konnten zwei Patienten (#36, #55) soweit rekompensiert werden, dass keine LTX notwendig wurde. Drei Patienten wurde eine Leber transplantiert (#51, #77, #142), dabei entwickelte Patient #142 postoperativ ein Multiorganversagen und verstarb zehn Tage nach Studieneinschluss. Patient #159 erlitt aufgrund der Behandlung einer offenen Tuberkulose mittels Rifampicin und Isoniazid ein toxisches Leberversagen. Hierbei wurde von einer Transplantation abgesehen. Vier Tage nach Studieneinschluss verstarb der Patient im Multiorganversagen.

2.4 Gewinnung der Serumproben der Behandlungsgruppe

Den Patienten wurde fünfzehn Minuten vor dem Start der Behandlung, zur Mitte der Behandlungszyklus (nach drei Stunden) und am Ende der Behandlung (nach sechs Stunden) über einen liegenden intravasalen Zugang Blut abgenommen. Die entnommenen Proben wurden bei Raumtemperatur für dreißig Minuten ruhen gelassen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei 4° Celsius und 3000 Umdrehungen/Minute. Das so gewonnene Serum wurde in 1000µl Aliquote aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von -81° Celsius gelagert. Um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden wurden die Proben später in 60µl Aliquote weiter aufgeteilt.

2.5 Gewinnung der Serumproben der Referenzgruppe

Da für die Untersuchungen mittel Zell-ELISA und Durchflußzytometrie keine Referenzlösungen mit definierten Konzentration an xenoreaktiven Antikörpern zur Verfügung standen, die eine Berechnungen der Konzentrationen in den Serumproben der Behandlungsgruppe ermöglichten, erfolgte die Verwendung von Serumproben einer Referenzgruppe. Diese bestand aus gesunden Freiwilligen. Die Blutentnahme erfolgte nach gründlicher Hautdesinfektion mittels Einmalkanüle in eine Serummonovette. Nach einer Inkubationszeit von dreißig Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation bei 4° Celsius für 20

Minuten bei 3000 Umdrehungen/Minute. Der gewonnene Überstand wurde abpipettiert, gepoolt und bis zur weiteren Verwendung bei -81°Celsius gelagert. Vor Verwendung der Serumpools der Referenzgruppe in den Versuchen, erfolgte die Aufteilung in 60µl Aliquote.

2.6 Gewinnung der Schweinehepatozyten

2.6.1 Verwendung im indirekten Zell-ELISA und in der Durchflußzytometrie

Die cryokonservierten Schweinehepatozyten, der nicht verwendeten Chargen, wurden in ihrem sterilen Reservoir in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, und anschließend in 1500µl Aliquote aufgeteilt und bei -81°C eingefroren. Nach zwölf Stunden wurden die Aliquote in einem Flüssigstickstofftank bis zur Verwendung gelagert.

2.6.2 Präparation der, vor der Behandlung gewonnenen, Schweinehepatozyten

Nach dem Auffüllen der BAL-Kartusche mit den Schweinehepatozyten, wurde das Reservoir mit den restlichen Schweinehepatozyten für den sofortigen Transport ins Labor in Eiswasser gelagert. Die Schweinehepatozyten wurden in 50ml Röhrchen gefüllt und bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten bei 4°C, von ihrer Trägersuspension getrennt. Die Trägersuspension wurde als Überstand abgesaugt. Die verbliebenen Schweinehepatozyten wurden portionsweise aufgeteilt und mit 3,8 prozentiger Formalinlösung vierundzwanzig Stunden fixiert.

2.6.3 Präparation der, nach der Behandlung gewonnenen, Schweinehepatozyten

Nach Beendigung des Behandlungszyklus wurde die mit Schweinehepatozyten befüllte Kartusche aus der BAL entfernt. Das in der Kartusche verbliebene Patientenplasma wurde abgelassen. Die Kartusche wurde mittig eröffnet und die darin befindlichen Schweinehepatozyten inklusive der Dextrosebeats vorsichtig geborgen. Die Schweinehepatozyten wurden mit 3,8 prozentiger Formalinlösung für vierundzwanzig Stunden fixiert.

2.7 Immunhistologische Aufarbeitung der Schweinehepatozyten

2.7.1 Fixierung, Einbettung, Schnitttechnik

Nach dem die Schweinehepatozyten vierundzwanzig Stunden in Formalinlösung fixiert wurden, erfolgte das Abzentrifugieren bei 3500 U/min für 8 Minuten und Abpipettieren der Formalinlösung. Mit Hilfe des Autotechnikons wurde der Zellhaufen über Nacht entwässert und dann in Paraffin gebracht.

Dafür wurde dieser in die Tissue-Tek-Kassetten gelegt. Zunächst durchlief die Kassette eine aufsteigende Alkoholreihe: Für jeweils 24 Stunden wurden die Kassetten in 50%-, 70%- und zweimal in 96% Propanollösung gelagert. Es folgte für jeweils fünf Stunden das Bad in 100% Propanol. Daraufhin wurden die Kassetten bei 60° Celsius in zwei Paraffinbädern für je 24 Stunden im Brutschrank gelagert. Im Anschluss erfolgte ein weiteres Paraffinbad mit 20%igem Bienenwachsanteil. Die so gefertigten Paraffinblöcke wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°Celsius verwahrt.

Von den Paraffinblöcken wurde mit Hilfe des Schlittenmikrotoms 4µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Um das Schneiden zu erleichtern wurden die Paraffinblöcke vorher bei -18° Celsius über Nacht gelagert. Die gewonnenen Schnitte wurden mittels Pinsel in ein Wasserbad überbracht und von dort aus auf einen Objektträger gelegt. Etwaig entstandene Falten konnten durch eine kurze Lagerung in einem warmen Wasser geglättet werden. Nach anschließender Lagerung bei 60° Celsius über Nacht konnten die so gewonnenen Schnitte bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert werden.

Diese Prozedere wurde sowohl für die nativen Hepatozyten, als auch Hepatozyten verwendet, die an der Behandlung beteiligt waren.

2.8 Nachweis xenoreaktiver Antikörper auf den Schweinehepatozyten

2.8.1 Vorbereitung der Paraffin-Schnitte

Um die Schnitte vom Paraffin zu befreien, wurden sie zunächst für 2 x 5 Minuten in Rotihistol eingestellt. Danach erfolgte der Gang durch die absteigende Alkoholreihe (je 2 x 3 Minuten in 100prozentigem, 96prozentigem und 80prozentigem Alkohol) an. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in Aqua destilata gewässert.

2.8.2 Durchführung der Färbung

Zur Reduzierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte in ein Bad aus 180 ml Methanol und 20ml 30prozentigem Wasserstoffperoxid gelegt. Im Anschluss erfolgte das Spülen 2 x 2 Minuten unter fließend Wasser und 2 x 5 Minuten in Phosphatpufferlösung (PBS).

Die folgenden Schritte der Behandlung fanden in der „feuchten Kammer“ statt, um die Schnitte vor dem Austrocknen zu schützen.

Jeder Gewebeschnitt erhielt nachfolgend 100µl einer Lösung aus 0,08g Glycin und 10ml PBS. Diese Lösung wurde für dreißig Minuten auf den Schnitten belassen. Anschließend erfolgte die Überschichtung der Schnitte mit 100µl Normalserum der Ziege, in einer Verdünnung von 1:20 in PBS (zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf den Schweinehepatozyten). Nach zwanzig Minuten wurde die Lösung abgegossen. Anschließend erfolgte die Inkubation über dreißig Minuten mit 100µl in 5% Trockenmilch gelöst in PBS und zweimaliges Spülen für 5 Minuten in PBS.

Als Trägerlösung für die Primärantikörper wurde 5prozentige Trockenmilch/PBS-Lösung verwendet. Die Primärantikörper Maus Anti-Mensch IgM und Maus Anti-Mensch IgG wurde in einem Verhältnis von 1:50, die Antikörper gegen die Subtypen 1- 4 von IgG in einem Verhältnis von 1:30 verdünnt. Zur Negativkontrolle lief ein Schnitt mit MOPC (Mouse Plasmocytoma) in einer Verdünnung 1:50 mit. Nach Inkubation der Schnitte, mit jeweils 100µl der Primärantikörperlösung, über Nacht bei 4 °C, erfolgte ein dreimaliges Spülen mit PBS für je 5 Minuten.

Der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus horseradishperoxidase-gelabelt) wurde mit 5prozentiger Trockenmilch in PBS 1:500 verdünnt und die Schnitte mit jeweils 100µl dieser Lösung überschichtet. Es erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur über dreißig Minuten, anschließend das Spülen mit PBS für 3 x 5 Minuten.

Zur Anfärbung des Sekundärantikörpers diente eine Lösung aus DAB Chromogen-Lösung (3,3'-Diaminobenzidin) und Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,5) in einem Verhältnis von 1:50. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für fünf Minuten inkubiert, dann zweimal für je fünf Minuten mit PBS gespült. Anschließend erfolgte das Spülen der Schnitte mit Aqua dest. für vier Minuten, ein Bad in Mayers Hämalaun für drei Minuten, sowie für sieben Minuten ein Spülen unter fließendem Leitungswasser.

In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde die Schnitte dehydriert. Dabei wurden sie einmal in 80% Ethanol-, zweimal in 96% Ethanol- und zweimal in 100% Ethanol-Bädern, für jeweils drei Minuten, belassen. Danach schloss sich ein zweimalige baden in Rotihistol für je fünf Minuten an, bevor die Schnitte mit Entellan eingeschlossen wurden.

2.8.3 Geräte, Chemikalien zur Immunhistologie

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
Feuchte Kammer	UKE-Technik, Hamburg, Deutschland
Pipette (0,5-10µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette (100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette (10-100µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stopp-Uhr	UKE-Technik, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2: Geräte, Immunhistologie

Chemikalien:

Bezeichnung	Hersteller
Aqua destilata	UKE Apotheke, Hamburg, Deutschland
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Dako, Californien, USA
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Entellan	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	UKE Apotheke, Hamburg, Deutschland
Glycin	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Imidazol-HCL-Puffer	Dako, Californien, USA
Mayers Hämalaun	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Methanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
MOPC (Mouse Plasmocytoma)	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
PBS (Phosphate-Buffered-Saline)	Eigenherstellung 428ml KH ₂ PO ₄ + 1072 NA ₂ HPO ₄ + 90g NaCl + 16ml NAOH; PH 7,4
Primärantikörper IgG Maus-anti-Mensch; monoclonal	PharMingen International, Hamburg, Deutschland
Primärantikörper IgG ₁ Maus-anti-Mensch; monoclonal	PharMingen International, Hamburg, Deutschland

Primärantikörper IgG ₂ Maus-anti-Mensch; monoclonal	PharMingen International, Hamburg, Deutschland
Primärantikörper IgG ₃ Maus-anti-Mensch; monoclonal	PharMingen International, Hamburg, Deutschland
Primärantikörper IgG ₄ Maus-anti-Mensch; monoclonal	PharMingen International, Hamburg, Deutschland
Primärantikörper IgM Maus-anti-Mensch; monoclonal;	PharMingen International, Hamburg, Deutschland
Rotihistol	Carl Roth GmbH & CO. Karlsruhe, Deutschland
Sekundärantikörper HRP-gelabelt; Ziege-anti-Maus	Pierce, Rockford, USA
Trockenmilch	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ziegen-Normalserum	Dako, Glostrup, Dänemark

Tabelle 3: Chemikalien, Immunhistologie

2.8.4 Sichtung der Schnitte

Die Betrachtung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte unter einem Olympus CX41 Mikroskop. Zur fotografischen Asservierung wurde die Digitalkamera Olympus C-5050 Zoom, sowie der Adapter U-CMAD3 (Olympus; zwischen Kamera und Mikroskop) verwendet.

2.8.5 Auswertung der immunhistochemischen Schnitte

Zur Auswertung der Schnitte wurde jeder einzelne Schnitt komplett gesichtet. Die Intensität der Färbung wurde mittels folgender Begriffskonstellation festgehalten:

Negativ: keinerlei Anfärbung (-)

Schwach positiv: leichte Anfärbung der Hepatozyten zu erkennen (+)

Positiv: deutliche Anfärbung der Hepatozyten zu erkennen (++)

Stark positiv: starke Anfärbung der Hepatozyten zu erkennen (+++)

2.9 Nachweis von xenoreaktiven Antikörpern im Patientenserum mittels Zell-ELISA

Bei Raumtemperatur erfolgte das Auftauen von 3 Aliquots mit jeweils 1500 µl Hepatocyten-Suspension. Zum Auswaschen der cryoprotektiven Lösung wurde die Suspension in ein 50ml Falcon-Tube umgefüllt und dieses mit PBS (zusätzlich mit 2% bovinem Serumalbumin) auf 50ml aufgefüllt. Diese so erhaltene Zelllösung wurde durch sanftes Schwenken durchmischt und anschließend bei 800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Spül- und Zentrifugationsvorgang wurde dreimal wiederholt.

Anschließend erfolgte die Verdünnung der Lösung, so dass die Zellzahl 2×10^6 pro Milliliter betrug.

In jedes Well der Microtiterplatte wurde mittels Multipette 100 µl Zellsuspension appliziert. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren der Mikrotiterplatten bei 1300 rpm für 5 Minuten (Anmerkung: In den folgenden Arbeitsschritten erfolgte die Zentrifugation immer bei 1300 rpm für fünf Minuten). Der Überstand wurde abgesaugt.

Die Inkubation mit jeweils 200 µl 4prozentiger Paraformaldehydlösung erfolgte für 10 Minuten bei 4° C um die Zellen zu fixieren. Eine Zentrifugation und das Absaugen des Überstandes folgte. Zum Auswaschen der Paraformaldehydlösung diente ein dreimaliges Auswaschen mit 200 µl PBS, anschließendem Zentrifugieren bei 1300 rpm für 5 Minuten und Absaugen des Überstandes (im Folgenden wird dieser Waschschritt als Waschprozedur bezeichnet).

Um die unspezifischen Bindungen zu blocken, wurde eine Lösung aus zwei Prozent bovinem Serumalbumin (BSA) und fünf Prozent Trockenmilch in PBS verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4° C im Kühlschrank. Die Lösung wurde zentrifugiert und es schloss sich die Waschprozedur an.

Das Auftauen der verwendeten Serumproben der Behandlungsgruppe und Referenzgruppe erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend folgte die Inaktivierung des Komplementsystems durch die Lagerung der Serumproben, für dreißig Minuten, in einem 56° C heißen Wasserbad. 1,5ml Eppendorfhütchen dienten zum Ansetzen der jeweiligen Verdünnungen. Mit Hilfe von PBS/BSA-

Lösung erfolgte die Erstellung einer Serumverdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10240 mit einem Gesamtvolumen von 500µl pro Verdünnungsstufe.

Aus dieser Serum-Verdünnungsreihe konnte nun die Mircotiterplatte mit jeweils 100µl in Doppelbestimmung bestückt werden. Die Probe der gesunden Referenzgruppe wurde ebenfalls in selbiger Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung bearbeitet. Als Negativkontrolle lief eine Doppelbestimmung mit, in dessen Well kein Serum sondern 100µl PBS/BSA inkubierte. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde, bei Raumtemperatur. Die Mircotiterplatten wurden zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zum Auswaschen diente erneut die Waschprozedur. Der Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:500 in PBS/BSA-Lösung angesetzt. Die Wells wurden jeweils mit 100µl dieser Lösung befüllt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach erfolgte eine Zentrifugation und das Absaugen des Überstandes mit anschließender Waschprozedur.

Die Entwicklerlösung bestand aus:

- 40mg P-nitrophenylphosphat
- 0,42g Dienthanolamin (100 mmol/l)
- 0,05g Magnesiumchlorid (0,5 mmol/L)
- 0,04g Levamisole

Der Zusatz von Levamisole erwies sich als nötig, da die endogene alkalische Phosphatase der Schweinehepatozyten unter der Entwicklung inhibiert werden musste. Bis zur Verwendung wurde die Entwicklerlösung im Dunkeln gelagert. In die Wells wurden jeweils 200µl der Entwicklerlösung pipettiert. Die Entwicklung wurde für dreißig Minuten unter Lichtabschluß durchgeführt. Die Farbentwicklung konnte mittels ELISA-Reader und angeschlossenenem Computer mit dem Programm MirkoWin2000® mit einem Absorbtionsfilter von 405nm registriert werden. Die Doppelbestimmungen wurden gemittelt und der Leerwert subtrahiert. Die Auswertung der Extinktionen erfolgte mit dem Programm Excel'97 auf einem handelsüblichen Computer.

2.9.1 Geräte, Chemikalien für Zell-ELISA

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
ELISA Reader, Dynatech MR 5000	Dynatech Laboratories, Chantilly, NA, USA
Mikrowin 3.0; Auswertungsprogramm	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland
Mircotiterplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Pipette (0,5-10µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette (100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette (10-100µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stopp-Uhr	UKE-Technik, Hamburg, Deutschland
Unterdrucksaugpumpe	Servox Medizintechnik GmbH, Troisdorf, Deutschland
Vortexer, Certomat MV	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Waage, Sartorius Basic	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge, Minifuge T	Heraeus Instruments,
Neubauer Zählkammer	
Eppendorfhütchen, Safe-Lock 0,5ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Geräte, Zell-ELISA

Chemikalien:

Bezeichnung	Hersteller
P-nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Levamisole	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid (0,5 mmol/L)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dienthanolamin (100 mmol/l)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS Dulbeccos w/o CA-MG	Gibco TM, Grand Island, New York, USA
BSA, Bovine serum albumine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trockenmilch	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sekundärantikörper IgM AP-Mouse Anti-Human IgM	Zymed Laboratories, Inc.; San Francisco, USA
Sekundärantikörper IgG AP-Mouse Anti-Human IgG	Zymed Laboratories, Inc.; San Francisco, USA

Tabelle 5: Chemikalien, Zell-ELISA

2.10 Nachweis von xenoreaktiven Antikörpern im Patientenserum mittels durchflußzytometrischer Messung

Zu Beginn wurden drei Aliquote mit je 1500µl Zellsuspension aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspensionen in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Um die Zellen von der cryoprotektiven Lösung zu befreien, erfolgte das Waschen mit PBS durch auffüllen auf 50ml und anschließendem zentrifugieren bei 800rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde mittels Vakuumsauger entfernt. Diese Waschprozedur wurde drei Mal wiederholt.

Das daraus entstandene Zellpellet wurde mit einer 40ml PBS/2%-BSA/5%-Trockenmilch-Lösung inkubiert, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren. Dies geschah für eine Stunde bei 4° Celsius. Anschließend wurden die Zellen bei 800rpm 5 Minuten herunterzentrifugiert und der Überstand mittels Vakuumsauger abgesaugt, und mit 10ml PBS-Lösung resuspendiert.

Mit der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und das Endvolumen der Zellsuspension errechnet, um so 1 Millionen Zellen/ml zu erhalten. Die hierfür benötigte Menge an PBS-Lösung wurde in das Röhrchen gegeben.

Anschließend wurden für jede Serumprobe 100µl dieser Zellsuspension in ein 5ml Polystyrolröhrchen pipettiert. Nachdem das Serum für 30 Minuten bei 56° Celsius bei erhitzt wurde, um das Komplementsystem zu inaktivieren, konnte 100µl Probenserum auf die Zellen gegeben und für einen Stunde bei 4° C inkubiert werden. Danach wurden die Röhrchen zum Spülen mit 1000µl PBS aufgefüllt und bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Danach erfolgte das Absaugen des Überstandes mittels Vakuumsauger, und resuspendieren mit 1000µl PBS, herunterzentrifugieren der Zellen und erneutes Absaugen. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Das Zellpellet konnte nun mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper überschichtet werden.

Es folgte jeweils die Zugabe von 20µl Maus anti-human IgG-Antikörper (FITC-gelabelt) oder 20µl Maus anti-human IgM-Antikörper (PE-gelabelt).

Zum Nachweis der IgG-Subtypen erfolgte jeweils die Gabe von 50µl Sekundärantikörper-Lösung (Maus Anti-Human-AK, FITC-gelabelt) zum Zellpellet in folgendem Konzentrationsverhältnis: IgG₁ 1:64 und für IgG₂, IgG₃, IgG₄ 1:8. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 4° Celsius.

Nach der Inkubation folgte das Herauswaschen des nicht gebundenen Sekundärantikörper mit 1000µl PBS, das Abzentrifugieren bei 1500 rpm für 5 Minuten und das Absaugen des Überstandes mittels Vakuumsauger. Das entstandene Zellpellet wurde mit 200µl PBS aufgefüllt und mittels Vortexer in eine homogene Lösung gebracht.

Als Gegenkontrollen erfolgte eine zusätzliche Messung von reiner Zellsuspension und Zellsuspension mit den jeweiligen Sekundärantikörpern.

Die Messung der Proben wurde mit dem BD FacsCalibur Flow Cytometer durchgeführt, dabei erfolgte die Registrierung von jeweils 5000 fluoreszierende „gated Events“ die für die Auswertung verwendet wurden. Der Leerwert wurde von den jeweiligen Proben subtrahiert.

2.10.1 Geräte, Chemikalien für die Durchflußzytometrie

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
BD FacsCalibur Flow Cytometer	BD Biosciences
Vortexer, Certomat MV	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Unterdrucksaugpumpe	Servox Medizintechnik GmbH, Troisdorf, Deutschland
Zentrifuge, Minifuge T	Heraeus Instruments,
Neubauer Zählkammer	
Stopp-Uhr	UKE-Technik, Hamburg, Deutschland

Tabelle 6: Geräte, Durchflußzytometrie

Chemikalien:

Bezeichnung	Hersteller
BSA, Bovine serum albumine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PBS Dulbeccos w/o CA-MG	Gibco TM, Grand Island, New York, USA
Sekundärantikörper IgG Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- Conjugated Mouse Anti-Human Monoclonal Antibody	BD PharMingen
Sekundärantikörper IgG ₁ Monoclonal Mouse Anti-Human IgG ₁ , FITC conjugated	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sekundärantikörper IgG ₂ Monoclonal Mouse Anti-Human IgG ₂ , FITC conjugated	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sekundärantikörper IgG ₃ Monoclonal Mouse Anti-Human IgG ₃ , FITC conjugated	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sekundärantikörper IgG ₄ Monoclonal Mouse Anti-Human IgG ₄ , FITC conjugated	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sekundärantikörper IgM R-Phycoerythrin (R-PE)-Conjugated Mouse Anti-Human IgM Monoclonal Antibody	BD PharMingen
Trockenmilch	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 7: Chemikalien, Durchflußzytometrie

2.11 Statistik

Bei den Untersuchungen mittels Zell-ELISA und Durchflußzytometrie konnte keine Konzentrationsbestimmung der Antikörper in den Patientenproben erfolgen, da kein Vergleich mit einer Lösung definierter Konzentration an Antikörpern zu Verfügung stand, wie bei kommerziell erhältlichen ELISA oder Durchflußzytometrie-Kits. Somit erfolgte der Vergleich anhand einer Referenzlösung aus gepoolten Plasma von gesunden Probanden. In dieser Lösung war die Konzentration der xenoreaktiven Antikörper auch nicht bekannt. Da jedoch bei den Untersuchungen jeweils auch diese Poollösung mit untersucht wurde, konnte diese als Referenz gegenüber den Patientenproben genutzt werden. Somit konnte bei den Untersuchungen die Veränderung gegenüber der Referenzlösung aufgezeigt werden. Dabei wurde der Quotient aus den jeweiligen Ergebnissen der Patientenproben zu den entsprechenden Behandlungszeitpunkten und den Ergebnissen der Referenzgruppe ermittelt.

Diese Quotienten für den Zeitpunkt „Vor Behandlung“ wurden mittels t-test für abhängige Stichproben gegen über den Zeitpunkten „Mitte der Behandlung“ und „nach Behandlung“ verglichen. Dabei wurde ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Diese Serumquotienten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

Für die statistische Auswertung des Zell-ELISA und der durchflußzytometrischen Untersuchungen erfolgte die Zusammenfassung der Behandlungen ($n=14$) aller Patienten. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS 14.0.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistologische Ergebnisse

Die Schweinehepatozyten für die Behandlung, wurden bei Patient #45, #93 und #149 erfolgreich asserviert. Aus verfahrenstechnischen Gründen, gelang dies bei Patient #33 nicht, so dass eine immunhistologische Auswertung nicht erfolgen konnte.

3.1.1 Nachweis von Antikörpern auf den Schweinehepatozyten vor Behandlung

Die vor Behandlung asservierten Hepatozyten zeigten bei allen immunhistochemisch Anfärbungen keinen Nachweis der Anlagerung von Antikörpern.

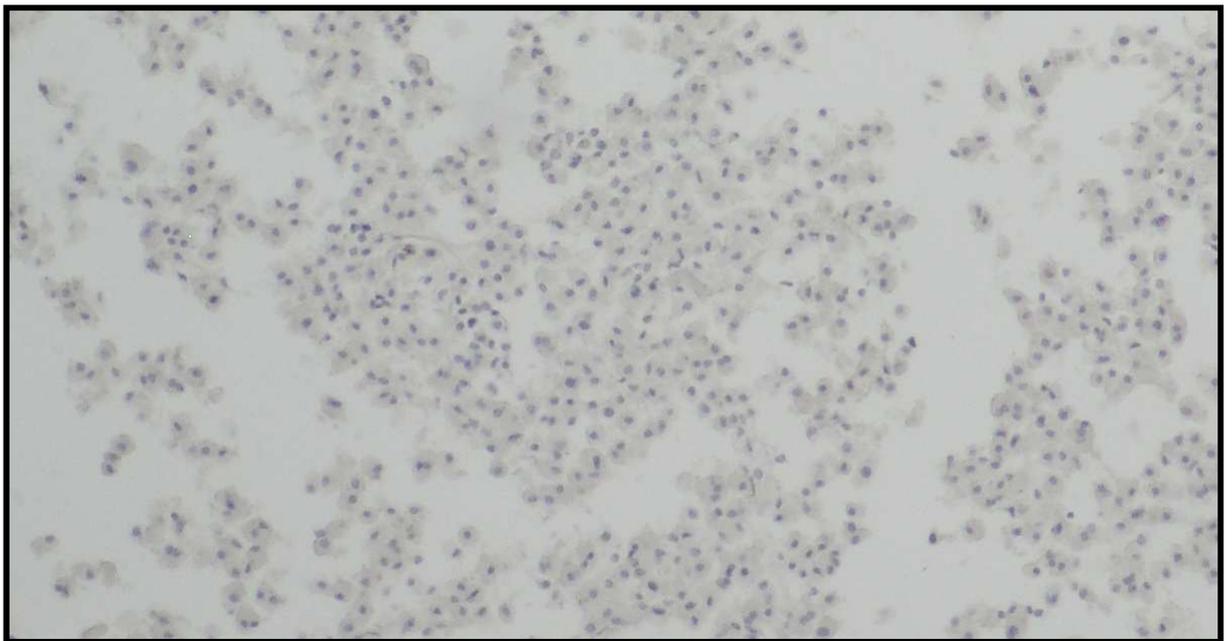


Abbildung 4: negativer immunhistologischer IgM-Nachweis auf nativen Schweinehepatozyten vor Behandlung, Patient #45

3.1.2 Nachweis von IgM-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung

Bei allen Patienten konnte in der überwiegenden Zahl der Behandlungen ein immunhistologischer Nachweis von IgM-Antikörper-Anlagerung an den Schweinehepatozyten gelingen. Lediglich bei Patient #149 konnte in Behandlung 1 und 2 kein Nachweis von IgM-Anlagerung erbracht werden.

Patienten-Nr.	Behandlung	IgM-Nachweis nach Behandlung
#45	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
	6	+
	7	+
	8	+
#93	1	++
#149	1	-
	2	-
	3	+
	4	+

Tabelle 8: Nachweis von IgM auf Schweinehepatozyten nach Behandlung

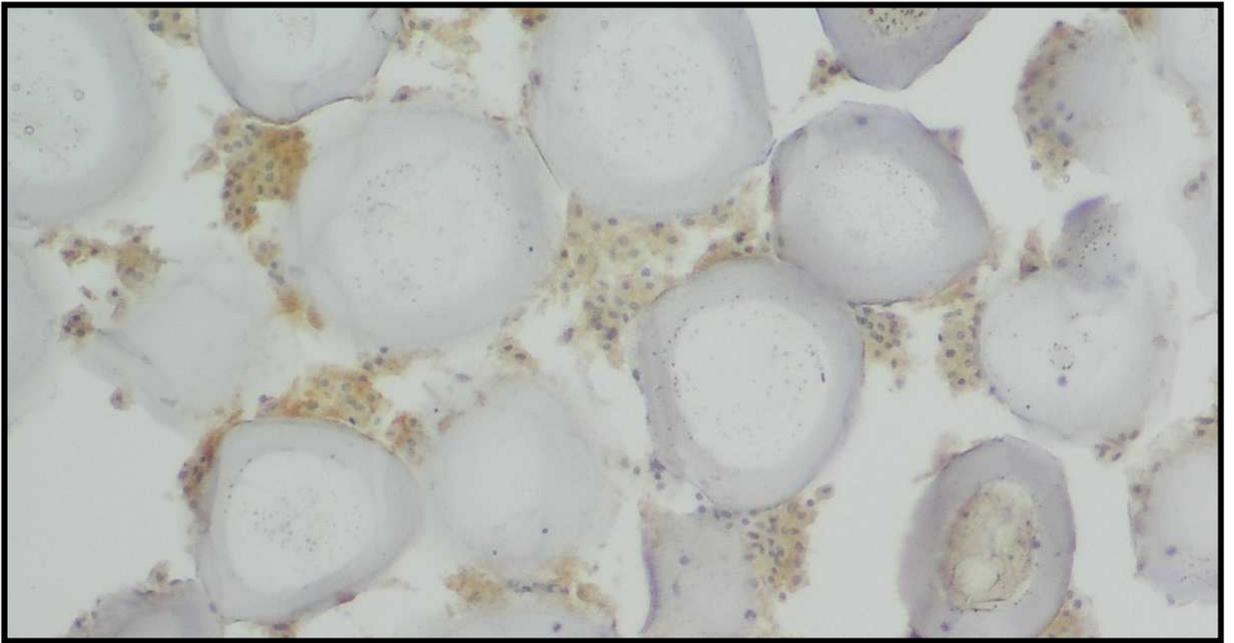


Abbildung 5: schwach positiver immunhistologischer Nachweis von IgM auf Schweinehepatozyten, Patient #45, 5. Behandlung

3.1.3 Nachweis von IgG-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung

Patienten-Nr.	Behandlung	IgG-Nachweis nach Behandlung
#45	1	+
	2	++
	3	++
	4	++
	5	++
	6	++
	7	++
	8	++
#93	1	+++
#149	1	++
	2	++
	3	++
	4	++

Tabelle 9: Nachweis von IgG auf Schweinehepatozyten nach Behandlung

Bei allen Patienten konnte nach den Behandlungen auf den verwendeten Schweinehepatozyten der immunhistologische Nachweis von IgG-Antikörpern gelingen. Dabei war bei Patient #45 nach der ersten Behandlung eine schwach positive Anfärbung, nach den weiteren Behandlungen zeigte sich eine intensivere Anfärbung. Bei Patient #93 zeigt sich eine starke Anfärbung.

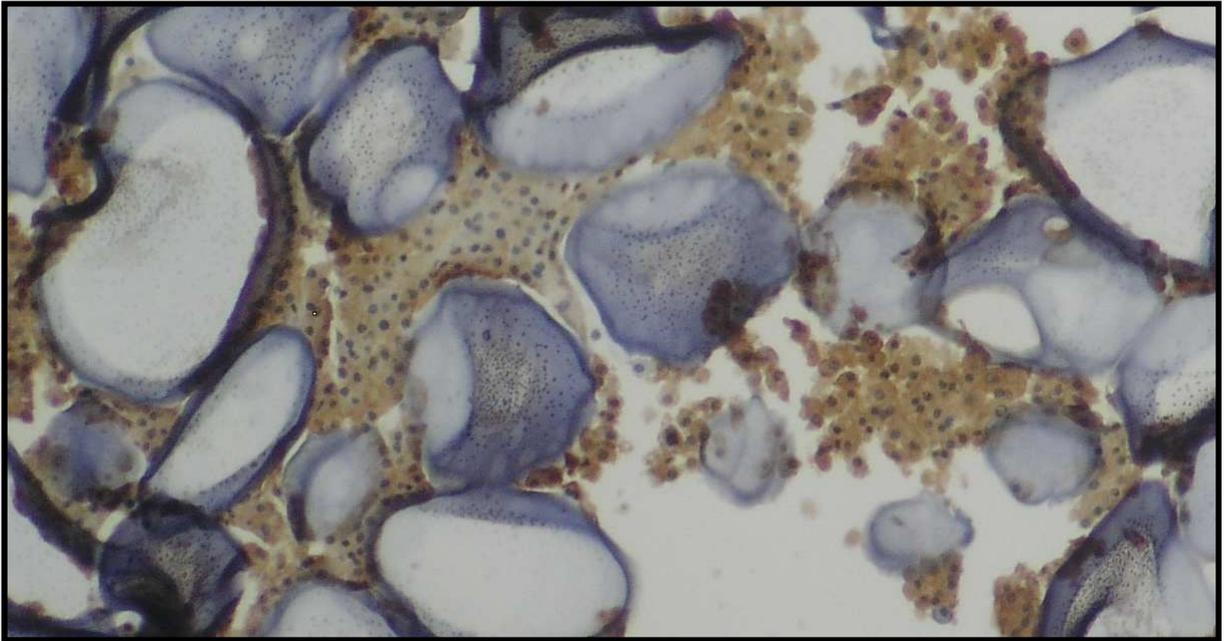


Abbildung 6: positiver immunhistologischer Nachweis von IgG auf Schweinehepatozyten, Patient #149, 1. Behandlung

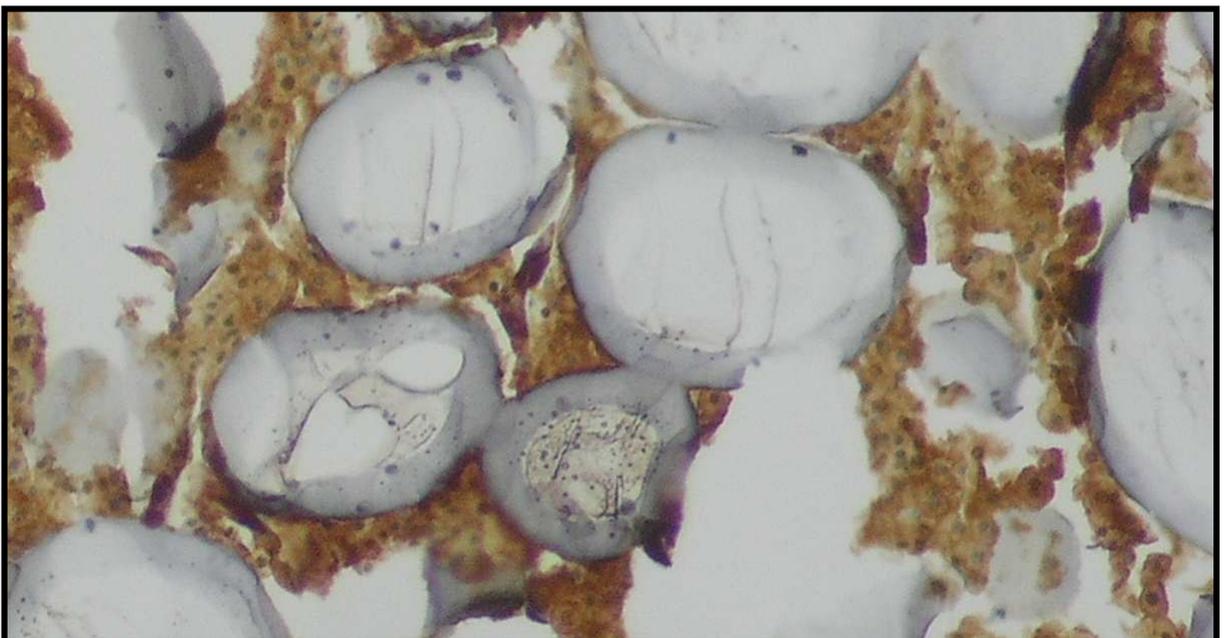


Abbildung 7: stark positive immunhistologische Anfärbung von IgG auf Schweinehepatozyten, Patient #93, 1. Behandlung

3.1.4 Nachweis von IgG₁-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung

Patienten-Nr.	Behandlung	IgG ₁ -Nachweis nach Behandlung
#45	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
	5	-
	6	-
	7	-
	8	-
#93	1	-
#149	1	-
	2	-
	3	-
	4	-

Tabelle 10: Nachweis von IgG₁ auf Schweinehepatozyten nach
Behandlung

Bei der immunhistochemischen Aufarbeitung der Schweinehepatozyten nach der Behandlung, konnten bei keinem der Patienten ein Nachweis von der IgG₁-Antikörperanlagerung erbracht werden.

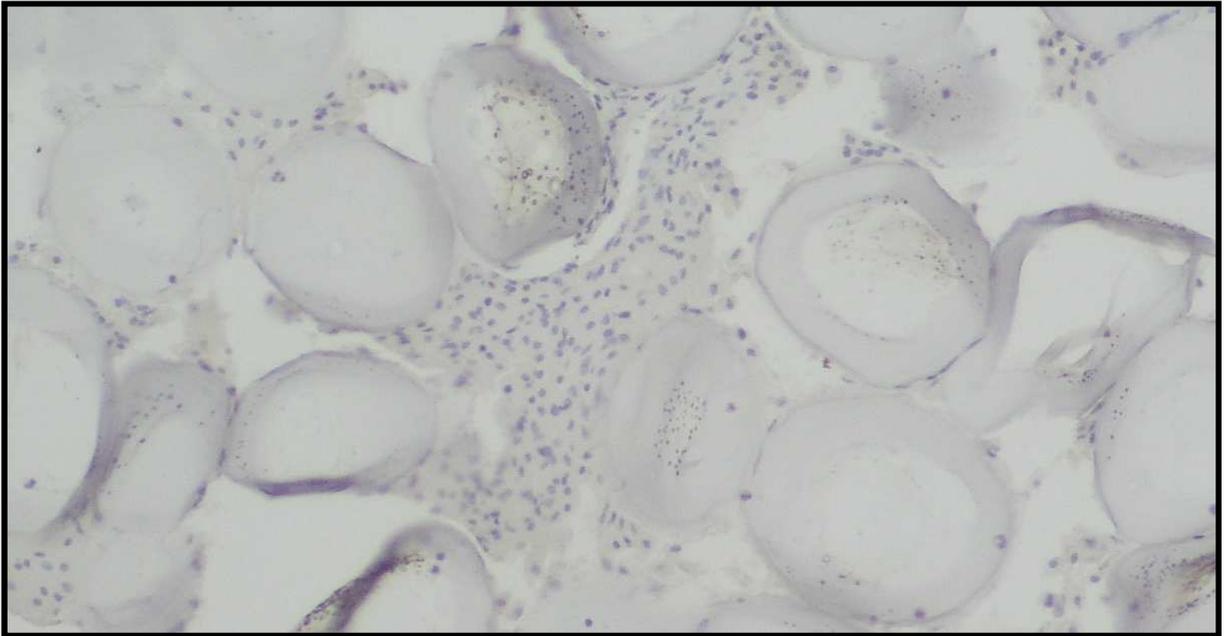


Abbildung 8: kein immunhistologischer Nachweis von IgG₁ auf den Schweinehepatozyten nach der Behandlung, exemplarisch Patient #45, 5. Behandlung

3.1.5 Nachweis von IgG₂-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung

Patienten-Nr.	Behandlung	IgG ₂ -Nachweis nach Behandlung
#45	1	+
	2	-
	3	+
	4	+
	5	+
	6	+
	7	+
	8	+
#93	1	++
#149	1	+
	2	+
	3	+
	4	+

Tabelle 11: Nachweis von IgG₂ auf Schweinehepatozyten nach Behandlung

Nach den Behandlungen Nr. 1 und Nr. 3 bis Nr. 8 konnte bei Patient #45 ein schwach positiver Nachweis von IgG₂-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten erbracht werden. Nach der immunhistologischen Anfärbung der genutzten Schweinehepatozyten der Behandlung 2 zeigte sich kein Nachweis von IgG₂-Antikörpern. Bei Patient #93 ergab die Anfärbung der Schweinehepatozyten einen positiven Nachweis von IgG₂-Antikörpern.

Nach den vier Behandlungen von Patient #149 zeigte sich anschließend ein schwach positiver Nachweis von IgG₂-Antikörpern auf den verwendeten Schweinehepatozyten.

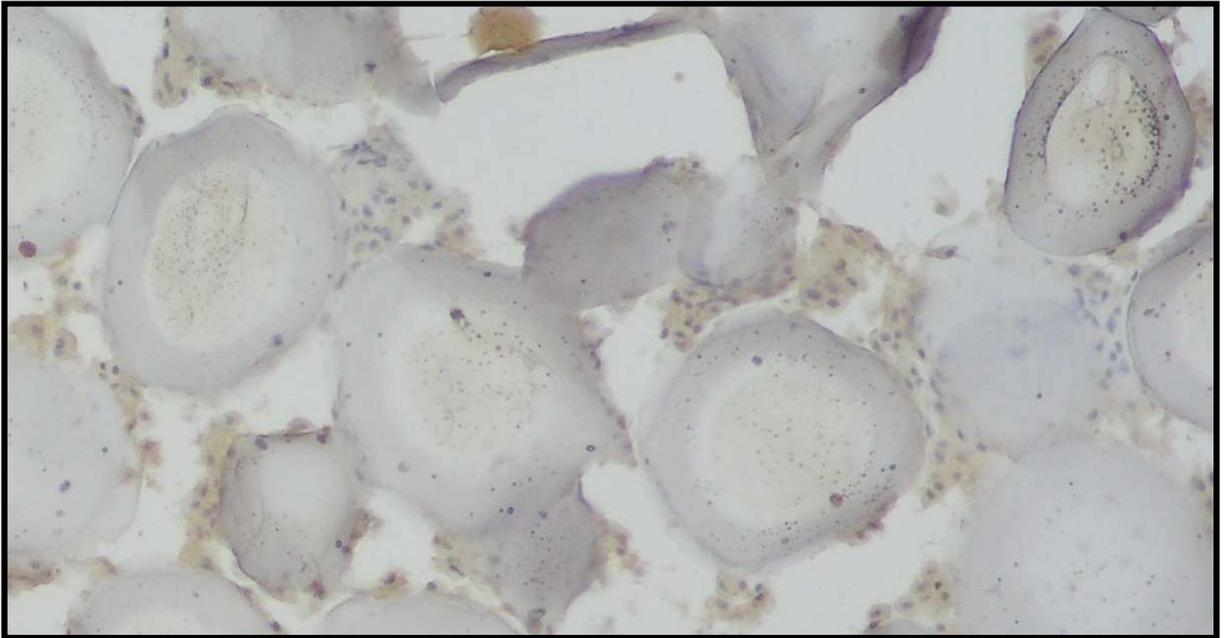


Abbildung 9: schwach positiver IgG₂-Antikörper Nachweis auf Schweinehepatozyten, exemplarisch Patient #45, 5. Behandlung

3.1.6 Nachweis von IgG₃-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung

Patienten-Nr.	Behandlung	IgG ₃ -Nachweis nach Behandlung
#45	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
	5	-
	6	-
	7	-
	8	-
#93	1	-
#149	1	-
	2	-
	3	-
	4	-

Tabelle 12: Nachweis von IgG₃ auf Schweinehepatozyten nach
Behandlung

Nach sämtlichen Behandlungen konnte mittels immunhistochemischer Aufarbeitung keinerlei Nachweis von IgG₃-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten erbracht werden.

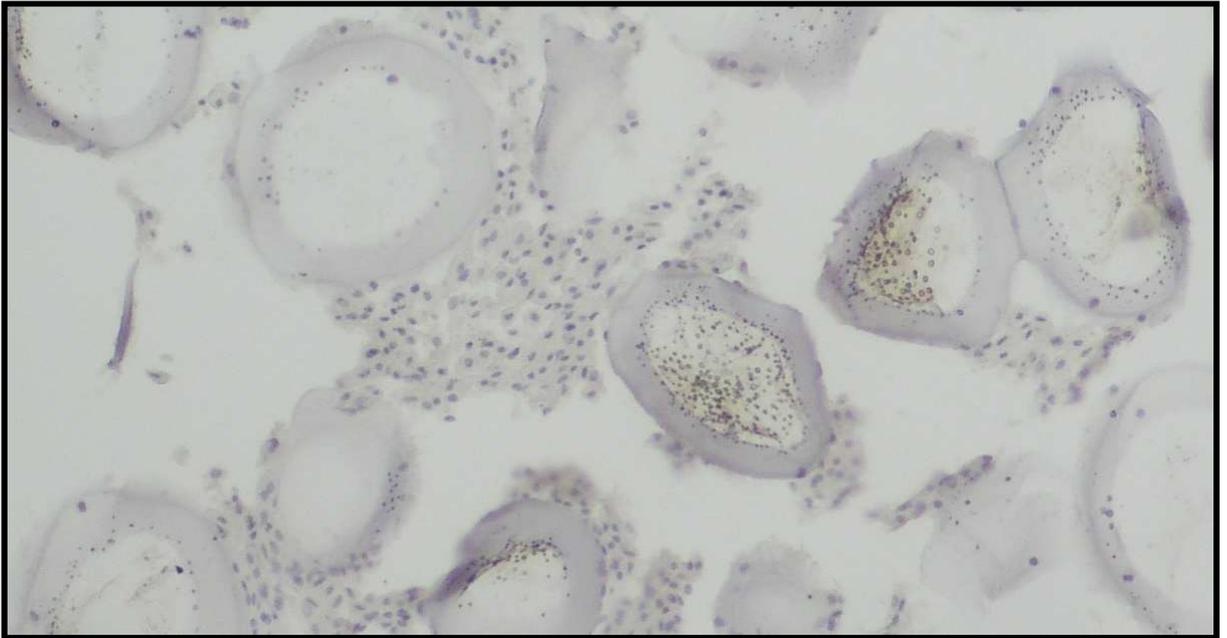


Abbildung 10: kein Nachweis von IgG₃-Antikörpern auf Schweinehepatozyten nach der Behandlung, exemplarisch Patient #45, 4. Behandlung

3.1.7 Nachweis von IgG₄-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten nach Behandlung

Patienten-Nr.	Behandlung	IgG ₄ -Nachweis nach Behandlung
#45	1	++
	2	++
	3	++
	4	++
	5	++
	6	++
	7	++
	8	++
#93	1	++
#149	1	++
	2	++
	3	+++
	4	+++

Tabelle 13: Nachweis von IgG₄ auf Schweinehepatozyten nach Behandlung

Bei allen Behandlungen konnte ein positiver immunhistologischer Nachweis von IgG₄-Antikörpern auf den verwendeten Schweinehepatozyten nachgewiesen werden. Bei Patient #149 konnte nach Behandlung 3 und 4 eine stark positive Anfärbung von IgG₄-Antikörpern gelingen.

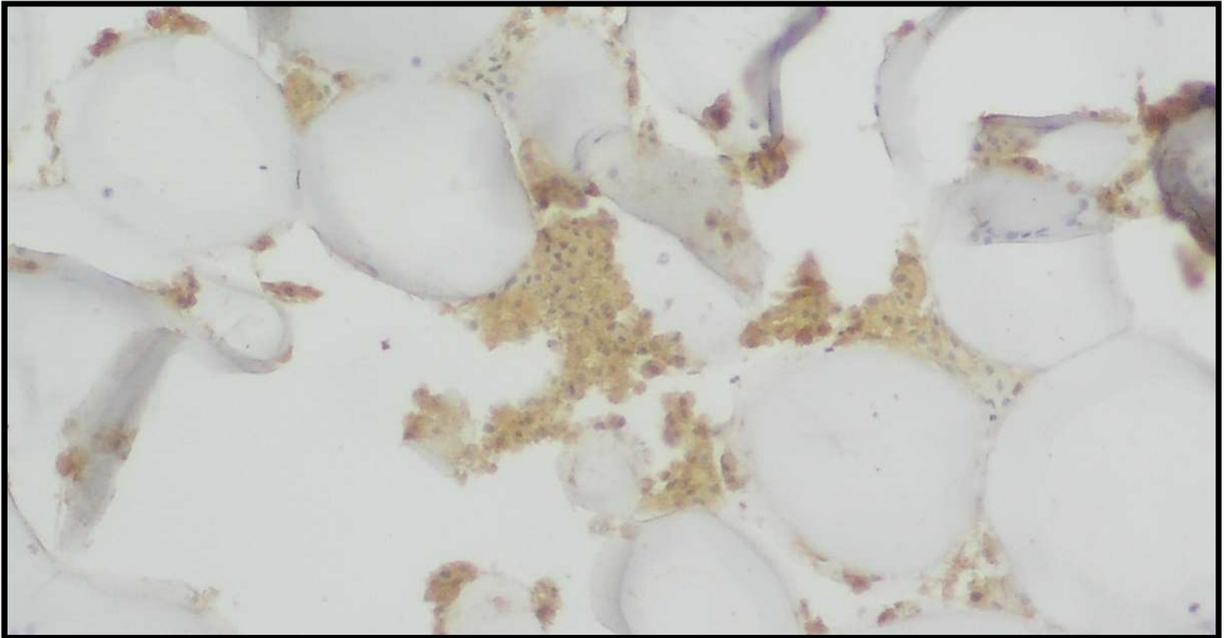


Abbildung 11: positiver IgG₄-Antikörpernachweis auf Schweinehepatozyten nach Behandlung, exemplarisch Patient#45, 7. Behandlung

3.2 Ausgangswerte der Patienten für xenoreaktive Antikörper

3.2.3 Ausgangswerte der Patienten für IgM-Antikörper

Beim Vergleich der Serumquotienten bei der Untersuchung mittels Durchflußzytometrie zeigten sich vor Beginn der ersten Behandlung unterschiedliche Ausgangswerte. Für Patienten #33 ergab sich bezogen auf das Serum der Referenzgruppe eine Konzentration von schweinehepatozytenbindenden IgM-Antikörpern von 107,85%, für Patient #45 74,19%, für Patient #93 200,53% und für Patient #149 122,08%.

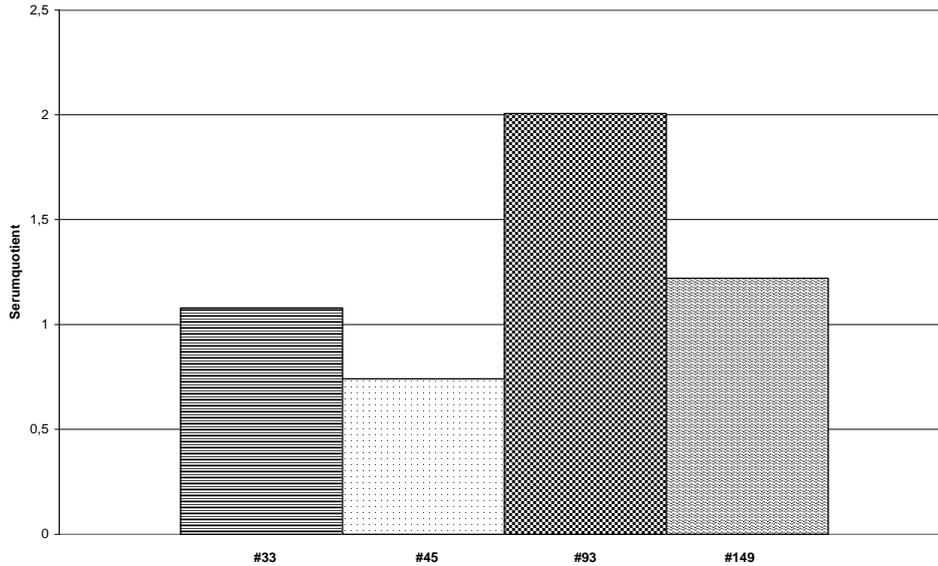


Abbildung 12: IgM-Titervergleich zwischen den Patienten vor der 1. Behandlung

3.2.4 Ausgangswerte der Patienten für IgG

Bei der Untersuchung mittels Durchflußzytometrie zeigte sich, dass bei Patient #33 die Konzentration an schweinehepatozytenbindenden IgG-Antikörpern 143,83% der Konzentration der Referenzgruppe gemessenen Antikörpern ist. Für Patient #45 lag die Konzentration bei 195%, bei Patient #93 betrug diese 73,24%, bei Patient #149 77,75%.

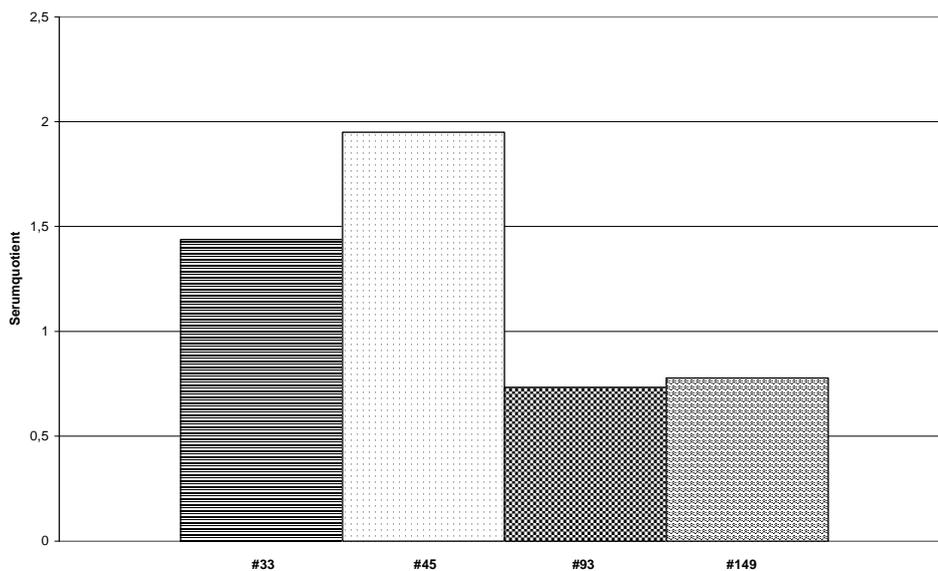


Abbildung 13: IgG-Titervergleich zwischen den Patienten vor der 1. Behandlung

3.2.5 Ausgangswerte der Patienten für IgG₂

Die Konzentration an IgG₂-Antikörpern lag im Verhältnis zur Referenzgruppe für Patient #33 bei 109,88%, für Patient #45 bei 41,5%, für Patient #93 bei 132,21% und für Patient #149 bei 123,22%.

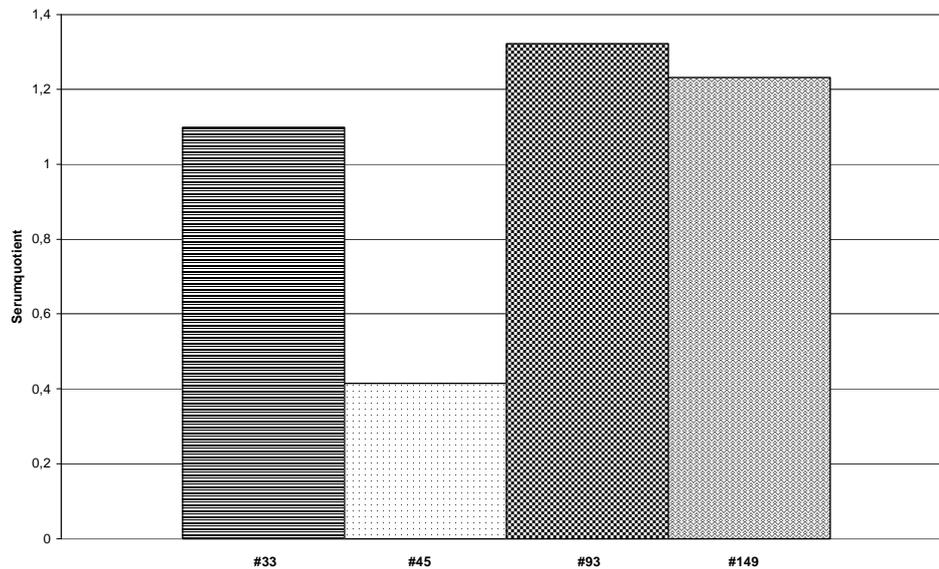


Abbildung 14: IgG₂-Titervergleich zwischen den Patienten vor der 1. Behandlung

3.2.6 Ausgangswerte der Patienten für IgG₄

Für die IgG₄-Antikörper, die an die Schweinehepatozyten binden, lag die Konzentration im Verhältnis zur Referenzgruppe für Patient #33 bei 95,75%, für Patient #45 bei 105,46%, für Patient #93 bei 79,64% und für Patient #149 bei 78,61%.

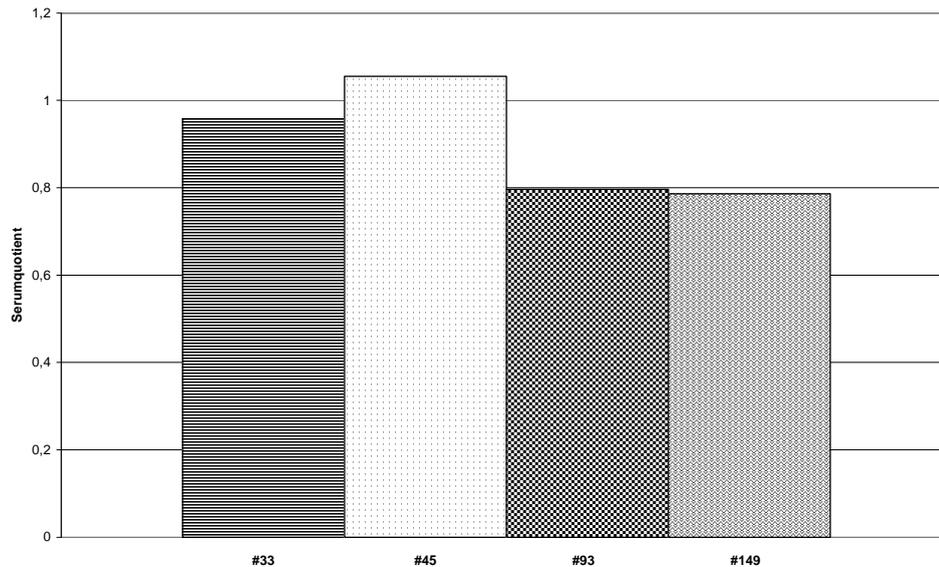


Abbildung 15: IgG₄-Titervergleich zwischen den Patienten vor der 1. Behandlung

3.3 Ergebnisse des Zell-ELISA

3.3.1 IgM-Verlauf während der Behandlungen

Im Verlauf der ersten Hälfte der Behandlung kam es zu einem Abfall des IgM-Serumquotienten von $0,889 \pm 0,171$ auf $0,765 \pm 0,199$. Am Ende der Behandlung weist der Serumquotient einen Wert von $0,822 \pm 0,142$ auf. Der Abfall des IgM-Serumquotienten zur Mitte der Behandlung, zum Ausgangsniveau vor der Behandlung ist mit $p=0,031$ signifikant. Der Verlauf vom Anfang der Behandlung zum Ende der Behandlung ist mit $p=0,08$ nicht statistisch signifikant.

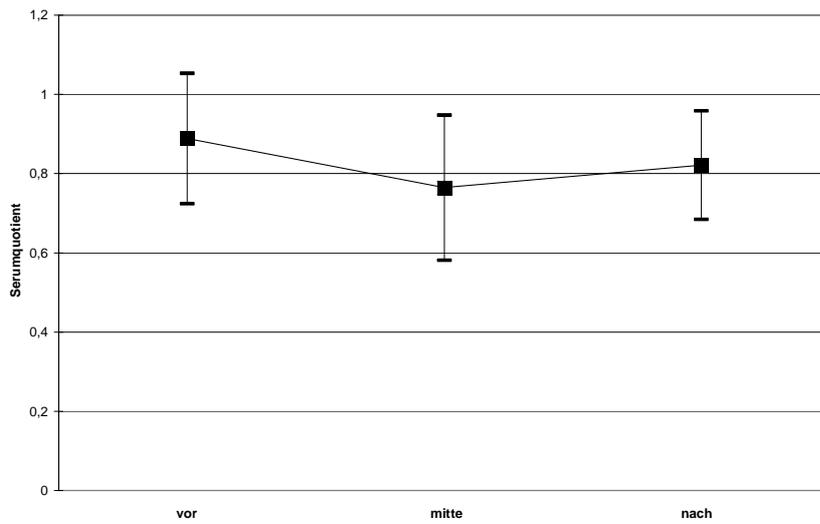


Abbildung 16: Zell-ELISA, IgM Titerverlauf während der Behandlungen

3.3.2 IgG-Verlauf während der Behandlungen

Vor der Behandlung betrug der Wert für der IgG-Serumquotient $0,751 \pm 0,279$, zur Mitte der Behandlung fiel der Wert auf $0,572 \pm 0,188$ ab ($p=0,013$), um unmittelbar nach der Behandlung einen Wert von $0,571 \pm 0,221$ ($p=0,017$) aufzuweisen (Abbildung Nr. 14).

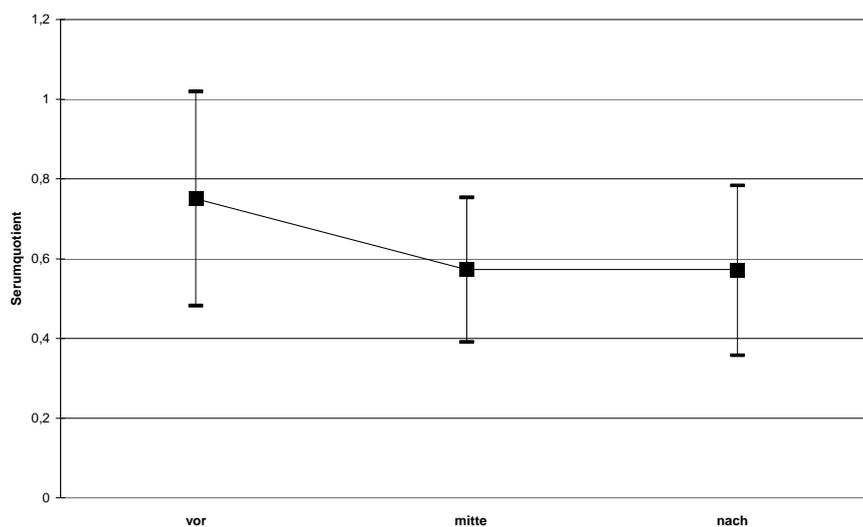


Abbildung 17: Zell-ELISA, IgG Titerverlauf während der Behandlungen

3.4 Ergebnisse der Durchflußzytometrie

3.4.1 IgM-Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung

Vor dem Start der Behandlung wies der Serumquotient für IgM einen Wert von $0,923 \pm 0,361$ auf, zur Mitte der Behandlung fiel der Wert auf $0,699 \pm 0,13$ ($p=0,005$), um nach der Behandlung einen Wert von $0,695 \pm 0,175$ ($p=0,002$) aufzuweisen.

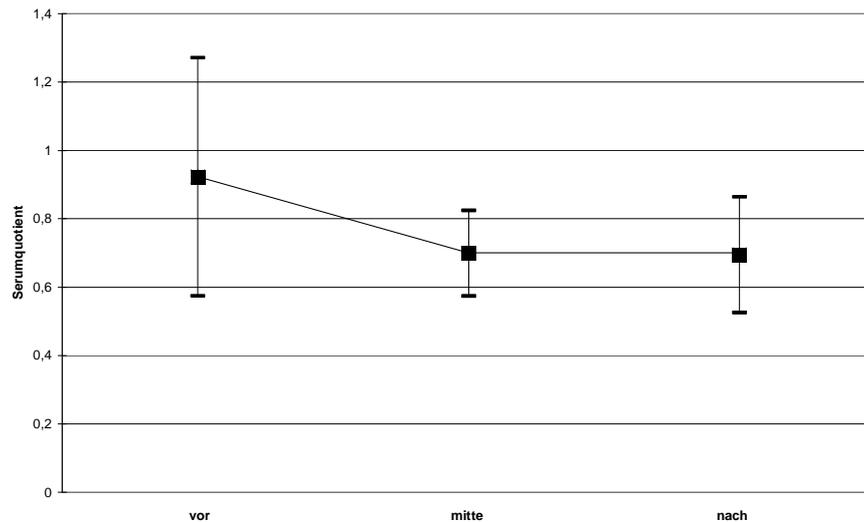


Abbildung 18: Durchflußzytometrie, IgM-Titerverlauf während der Behandlungen

3.4.2 IgG-Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung

Vor Behandlungsbeginn konnte ein Serumquotient von $1,234 \pm 0,468$ gemessen werden. Zur Behandlungsmitte fiel dieser auf $0,801 \pm 0,291$ ($p=0,005$), um nach Behandlung weiter auf einen Wert von $0,787 \pm 0,314$ ($p=0,011$) zu fallen.

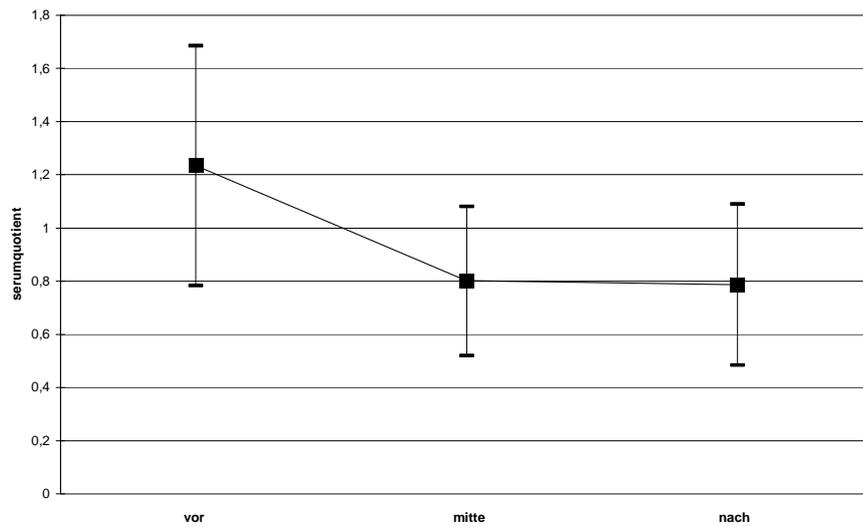


Abbildung 19: DurchflußzytometriellgG-Titerverlauf während der Behandlungen

3.4.3 IgG₁-Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung

Der Serumquotient für den Nachweis von IgG₁ betrug vor der Behandlung $0,781 \pm 0,511$, zur Mitte der Behandlung $0,788 \pm 0,386$ ($p=0,958$). Nach Ende der Behandlung betrug der Serumquotient für IgG₁ $0,895 \pm 0,448$ ($p=0,389$).

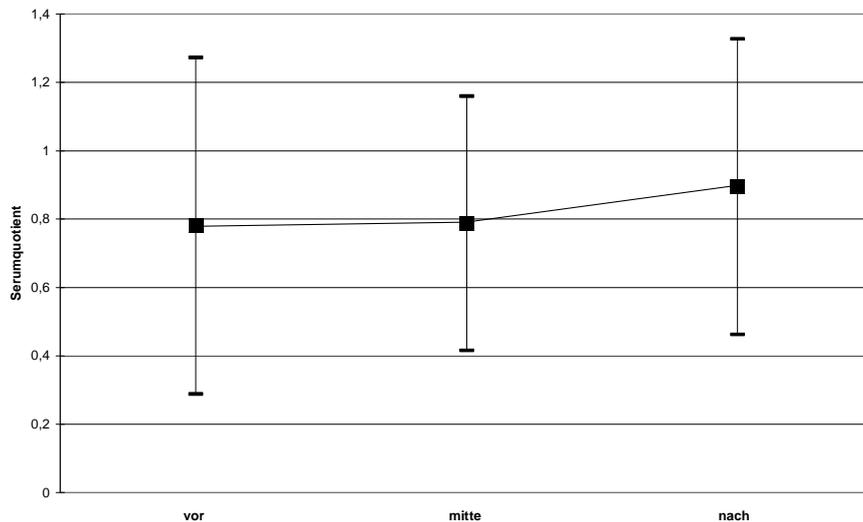


Abbildung 20: Durchflußzytometrie, IgG₁-Titerverlauf während der Behandlungen

3.4.4 IgG₂-Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung

Vor Beginn der Behandlung betrug der Serumquotient für IgG₂ $0,669 \pm 0,393$, zur Mitte der Behandlung fiel dieser auf $0,508 \pm 0,34$ ($p=0,015$), nach Beendigung der Behandlung betrug der Serumquotient $0,47 \pm 0,347$ ($p=0,005$).

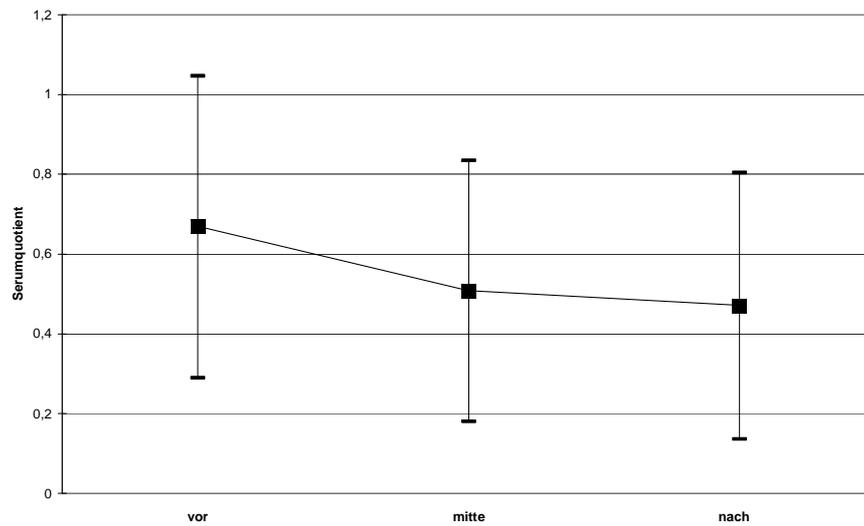


Abbildung 21: Durchflußzytometrie, IgG₂-Titerverlauf während der Behandlungen

3.4.5 IgG₃-Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung

Vor Behandlungsbeginn betrug der Serumquotient für IgG₃ $0,855 \pm 0,357$, zur Behandlungsmitte fällt der Serumquotient auf $0,663 \pm 0,257$ ($p=0,004$) ab, nach der Behandlung betrug der Serumquotient $0,715 \pm 0,302$ ($p=0,138$).

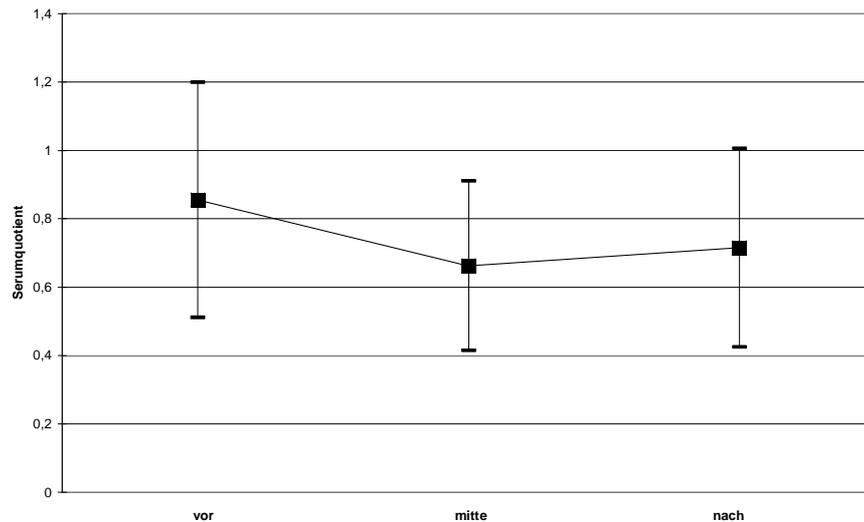


Abbildung 22: Durchflußzytometrie, IgG₃-Titerverlauf während der Behandlungen

3.4.6 IgG₄-Verlauf vor, mitte und nach der Behandlung

Vor dem Beginn der Behandlung betrug der Serumquotient für IgG₄ $0,776 \pm 0,17$, zur Mitte der Behandlung betrug der Wert $0,816 \pm 0,319$ ($p=0,633$), zum Behandlungsende $0,708 \pm 0,225$ ($p=0,207$).

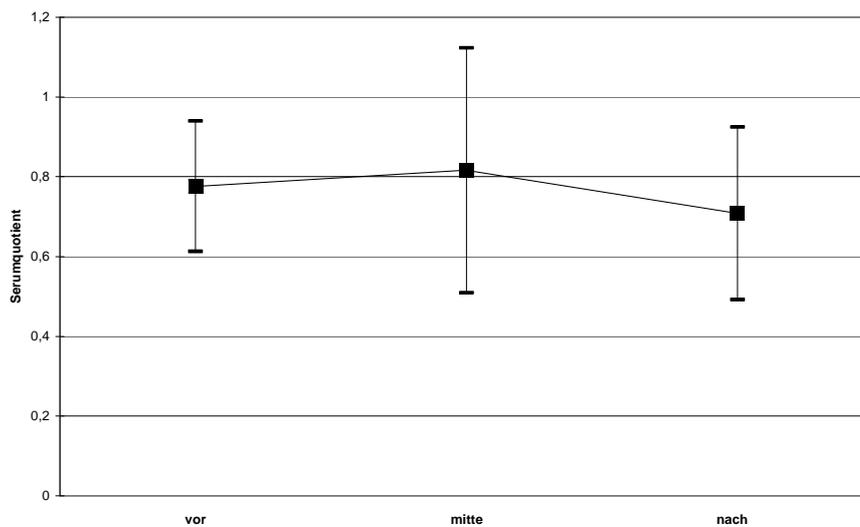


Abbildung 23: IgG₄-Titerverlauf während der Behandlungen

3.5 Vergleich der Serumquotienten über die Behandlung

Zum Vergleich der Behandlungen wurden für die Patienten #45 und #149 die Serumquotienten vor der ersten sowie vierten Behandlung, für Patient #45 zusätzlich vor der achten Behandlung verglichen.

3.5.1 Verlauf für IgM

Bei dem Serumquotienten für IgM zeigte sich eine Reduktion über den gesamten Behandlungszeitraum. Bei Patient #45 reduzierte sich dieser von 0,742 (vor der ersten Behandlung) auf 0,697 (Vor der vierten Behandlung) um vor der achten Behandlung einen Wert von 0,606 aufzuweisen. Bei Patient #149 fiel der Serumquotient von 1,221 vor der ersten Behandlung auf 0,807 vor der vierten Behandlung. Insgesamt kam es zu einem Abfall des Serumquotienten über die Behandlungen.

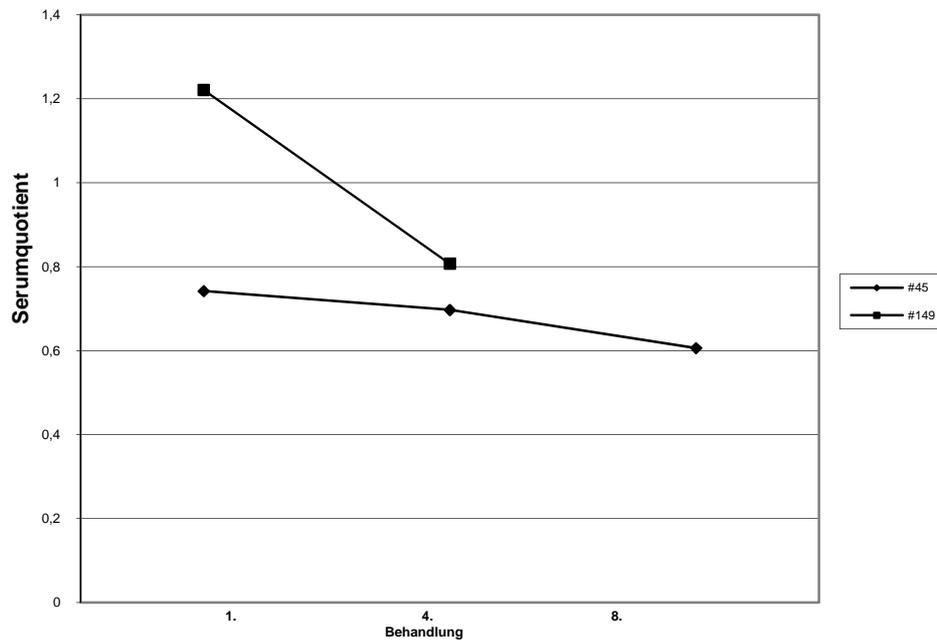


Abbildung 24: IgM-Titerverlauf über die Gesamtbehandlungsdauer

3.5.2 Verlauf für IgG

Der Verlauf von IgG über die Behandlungen zeigte einen Anstieg der Serumquotienten. So konnte für Patient #45 ein Anstieg von 0,533, vor der ersten Behandlung auf 0,865 zum Zeitpunkt, vor der vierten Behandlung, um vor der achten Behandlung einen Wert von 0,901 aufzuweisen. Bei Patient #149 zeigte sich ein Anstieg von 0,778, vor der ersten Behandlung, auf 0,836, zum Zeitpunkt vor der vierten Behandlung.

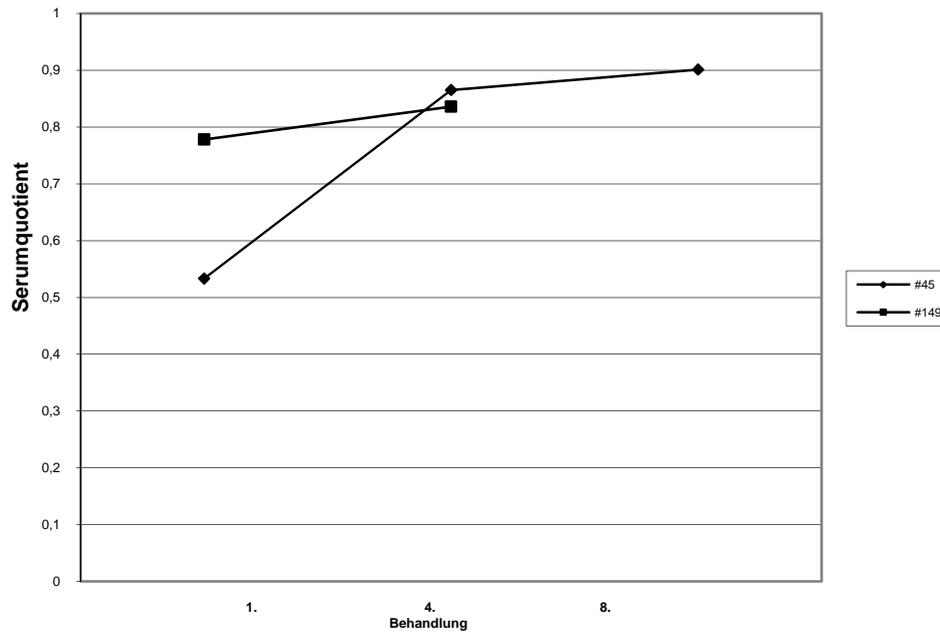


Abbildung 25: IgG-Titerverlauf über die Gesamtbehandlungsdauer

3.5.3 Verlauf für IgG₂

Bei Patient #45 stieg der Serumquotient zunächst zur vierten Behandlung hin an, von 0,415 auf 0,518, um zum Beginn der achten Behandlung unter den Ausgangswert vor der ersten Behandlung hin abzusinken (0,306). Bei Patient #149 sank der Serumquotient vor Beginn der ersten Behandlung, von 1,232, auf 0,883 vor Beginn der vierten Behandlung.

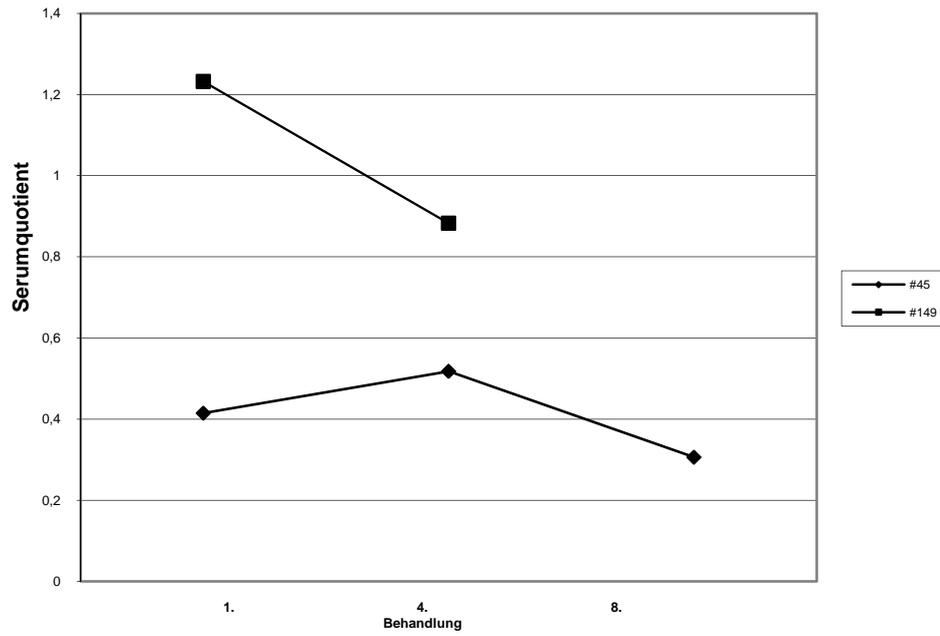


Abbildung 26: IgG₂-Titerverlauf über die Gesamtbehandlungsdauer

3.5.4 Verlauf für IgG₄

Bei Patient #45 sank der Serumquotient von der ersten zur vierten Behandlung zunächst von 1,055 auf 0,394, um vor Beginn der achten Behandlung einen Wert von 0,853 anzusteigen. Bei Patient #149 sank der Wert vor der ersten Behandlung von 0,786 auf 0,691 zuvor Beginn der vierten Behandlung.

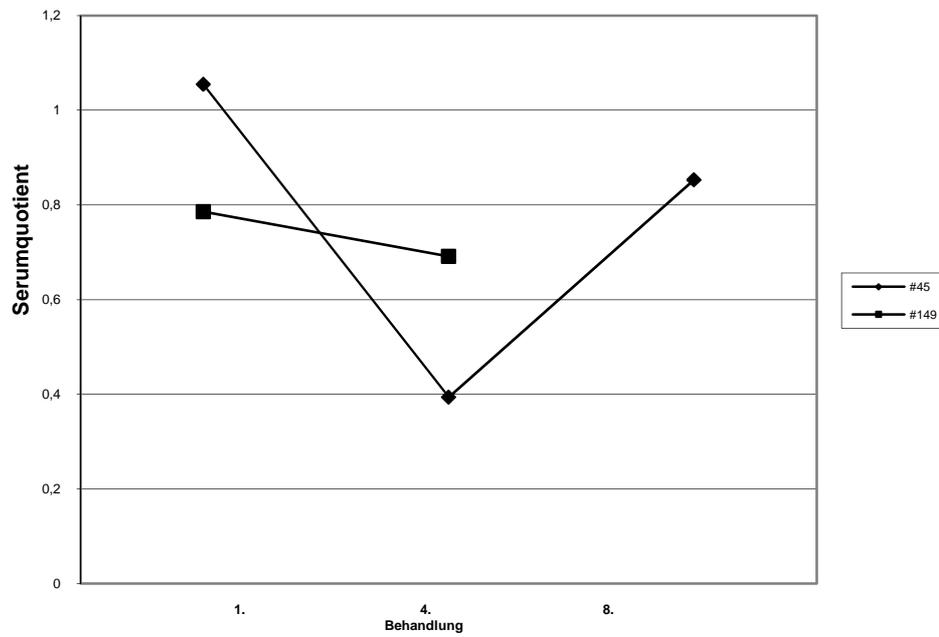


Abbildung 27: IgG₄-Titerverlauf über die Gesamtbehandlungsdauer

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Antikörperreaktion, im Sinne einer Antikörperbindung, auf den in der BAL verwandten isolierten parenchymalen Schweineleberzellen nachgewiesen. Diese spielt bei der hyperakuten Abstoßung im Rahmen der Xenotransplantation eine wichtige Rolle.

Es konnte gezeigt werden, dass sich während der Behandlung mit der BAL xenoreaktive Antikörper der Gruppe IgM und IgG an die verwendeten Schweinehepatozyten binden.

Die Anfärbung, zum Nachweis von IgM-Antikörpern bei der überwiegenden Zahl der Untersuchungen schwach positiv gewesen, die Anfärbung zum Nachweis von IgG-Antikörpern deutlich intensiver. In Studien zuvor, bei denen überwiegend isolierte Schweineendothelzellen (Parker et al. 1994, Platt et al. 1991, Tuso et al. 1993) verwendet wurden, wie auch bei der Perfusion von Organen wie Nieren (Tuso et al. 1992), Leber (Cotterell et al. 1995, Tuso et al. 1992) oder Herz (Ross et al. 1993) zeigte sich eine vorwiegend durch IgM dominierte Anlagerung von Antikörpern. Die bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion primär beteiligten präformierten xenoreaktiven Antikörper binden am Alpha-Gal-Epitop (Palmetshofer et al. 1998, McMorrow et al. 1997, Good et al. 1992). Die Ausprägung der Antikörperbindung an die unterschiedlichen Zelltypen ist nicht nur artspezifisch (Tanemura und Galili 2000a, Tanemura et al. 2000b), sondern auch innerhalb einer Spezies, wie dem Schwein, unterschiedlich (Alvarado et al. 1995). So ist bei der Präsentation der Schweinezellen gegenüber humanem Serum die Anlagerung von IgM-Antikörpern, sowie IgG-Antikörpern in seiner Ausprägung vom jeweiligen Antikörper (IgG oder IgM), als auch vom jeweiligen Gewebe abhängig (Fujioka et al. 1995).

Bei isolierten Schweinehepatozyten, im direkten Vergleich zu Schweinehepatozyten in situ konnte jeweils das für die hyperaktue xenoreaktive Abstoßung verantwortliche Gal α (1-3)Gal-Epitope nachgewiesen werden, jedoch in geringerer Menge als dies Hepatozyten in situ der Fall ist (van de Kerkhove et al. 2005). Bei der Epitopcharakterisierung, ist zu beachten, dass das primäre Epitop zwar das Gal α (1-3)Gal-Epitop ist, bei der xenoreaktiven Abstoßung aber auch so genannte non-Gal α (1-3)Gal-Epitope als Antigen zum Tragen kommen.

Nach dem enzymatischen Abbau von α -Gala-Epitopen mittels Alpha-Galactosidase ist die Antikörperbindung von IgM und IgG an Schweinezellen deutlich reduziert (59%-90%) (Parker et al. 1994, Cotterell et al. 1995, LaVecchio et al. 1995). Dabei ist in dieser Arbeit die Differenzierung zwischen xenoreaktiven Antikörpern der Gruppe anti- α Gal-Antikörper und non- α Gal-Antikörpern nicht erfolgt.

4.1 Immunhistochemischer Nachweis von IgM

Auf den, bei den Behandlungen verwendeten Schweinehepatozyten, konnte überwiegend ein Nachweis von IgM-Antikörpern gelingen. Daraus lässt sich schließen, dass bei der humoralen Abstoßungsreaktion IgM-Antikörper eine Rolle spielen. Dies lässt sich damit erklären, dass die Antikörper der Klasse IgM in Phylogenese als auch in der Ontogenese als erstes Immunglobulin erscheint (Keller 1994). Durch ihre Pentamerstruktur sind die IgM-Antikörper hochreaktiv und verfügen so über beträchtliche Fähigkeiten zur Opsonisation, Agglutination und Komplementaktivierung. Voraussetzungen, die unumgänglich für eine suffiziente Abwehr von Antigenen sind.

4.2 Immunhistochemischer Nachweis von IgG₁

Immunhistochemisch konnte kein Nachweis erbracht werden, dass sich während der Behandlungen bei den behandelten Patienten IgG₁-Antikörper an die Schweinehepatozyten angelagert haben. Es ist somit davon auszugehen, und weitere Studien bestätigen dies (Lindborg et al 2001, Ross et al. 1993), dass die IgG₁-Subklasse keine Rolle bei der humoralen xenoreaktiven Abstoßung spielt. Lindborg et al. (2001) konnten bei einigen Patienten xenoreaktive IgG₁ gegen non-Gal α (1-3)Gal-Epitope nachweisen, denen bei Diabetes Typ I, fetale Schweineinseln implantiert, dies jedoch erst im späten Intervall von 30 Tagen bzw. 1 Jahr. Ross et al. (1993) konnten bei ex-vivo perfundierten Schweineherzen keine Anlagerung von IgG₁ an das Herzgewebe nachweisen. Es handelt sich dabei jedoch um gänzlich andere Gewebetypen, so dass dabei die gewebespezifische Epitop-Präsentation zu berücksichtigen ist und es somit auch zu einer gewebspezifischen Anlagerung von IgG₁ kommen könnte. Baquerizo et al. (1999) haben bei Verwendung des gleichen bioartifiziellen

Leberunterstützungssystem, bei einem Patienten nach 4 Behandlungen einen Anstieg von IgG₁ zu verzeichnen können. Dies jedoch bei dem Nachweis durch einen Zell-ELISA, der auf der Verwendung von Schweineendothelzellen beruht, somit artengleichem Gewebe, jedoch nicht strukturgleichem Gewebe. Es somit davon auszugehen, dass bei der Antigenpräsentation durch Schweinehepatozyten während der Behandlung und dem Antikörpernachweis im Zell-ELISA mittels Schweinehepatozyten, IgG₁ keine Rolle bei der humoralen Abstoßungsreaktion gegen Schweinehepatozyten spielt. Dieses lässt vermuten, dass es sich bei den IgG₁-relevanten Epitopen um solche handelt, die auf den Endothelzellen vorhanden sind, jedoch nicht auf den Schweinehepatozyten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass die B-Zellen die Fähigkeit haben, die synthetisierende Ig-Klasse zu wechseln. So konnte Zahorsky-Reeves et al. (2006) zeigen, dass bei der Präsentation von Schweineendothelzellen, zunächst durch die Nutzung des V_H3-Gens es zur Produktion von IgM-Xenoantikörpern kommt. Später jedoch wurde dasselbe Gen auch zur Kodierung von IgG-Antikörpern herangezogen. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass der Subtyp IgG₁ durch einen Wechsel der Antikörperproduktion der B-Zellen mit einem Konzentrationsanstieg reagiert (Gochi et al. 1999). Dies geschieht jedoch erst im Intervall von 8 Tagen und lässt sich somit bis zu diesem Zeitpunkt auch nicht immunhistochemisch nachweisen.

4.3 Immunhistochemischer Nachweis von IgG₂

Der immunhistochemische Nachweis von IgG₂-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten zeigte überwiegend eine schwache positive Anfärbung. Somit, und das bestätigen anderweitige Studien gibt es innerhalb der IgG₂-Subklasse xenoreaktiven Antikörper, die sowohl an Schweineendothelzellen (Baquerizo et al. 1999, Ross et al. 1993) binden, als auch an Schweinehepatozyten (Zahorsky-Reeves et al. 2006). So scheint es, dass auf den Schweinehepatozyten als auch auf den Endothelzellen, die gleichen Epitope vorhanden sind, an denen IgG₂ bindet. Damit zeigt sich, dass IgG₂-Antikörper bei der humoralen xenoreaktiven Abstoßungsreaktion eine Rolle spielen.

4.4 Immunhistochemischer Nachweis von IgG₃

Der Immunhistochemische Nachweis von angelagerten IgG₃-Antikörpern an die eingesetzten Schweinehepatozyten lies sich bei keinem der Patienten erbringen. Somit zeigt sich, und dies wird durch die Arbeit von Ross et al. (1993) bestätigt, dass IgG₃ bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion von Schweinegewebe keine Rolle spielt.

4.5 Immunhistochemischer Nachweis von IgG₄

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich nach allen Behandlungen mit der BAL auf den verwendeten Schweinehepatozyten IgG₄-Antikörper anlagern. Alle immunhistochemischen Schnitte zeigten eine deutliche Anfärbung an. Die Schnitte der dritten und vierten Behandlung von Patient #149 zeigten nochmals eine stärkere Färbung an, als nach den beiden Behandlungen zuvor. Somit ist von einer Bindung von IgG₄ im Rahmen der hyperakuten Abstoßungsreaktion gegenüber Schweinehepatozyten auszugehen. Im Vergleich dazu zeigt sich bei der Untersuchung der Bindung von IgG₄ an porcinem Herzgewebe keine Bindung (Ross et al. 1993), was vermuten lässt, dass sich die Epitopstruktur auf den Schweinehepatozyten und Schweineendothelzellen im Hinblick auf ihre Bindung mit IgG₄ unterscheidet.

4.6 Zell-ELISA/Durchflußzytometrie zur Xenoantikörpercharakterisierung

Das Studiendesign lässt keinen Schluss bezüglich der absoluten Antikörperkonzentration im Serum der Patienten zu, da als Referenz Serum von gesunden Probanden genommen wurde, in dem die Konzentration an xenogenen Antikörpern nicht bekannt ist. Es ist also lediglich eine Veränderung der Antikörperkonzentrationen im Verlauf der Behandlungen zu erkennen. Für die genaue Konzentrationsbestimmung wäre eine Referenzprobe mit einer definierten Konzentration an xenoreaktiven Antikörpern nötig gewesen. Diese stand jedoch bei den Versuchabläufen für den Zell-ELISA und die durchflußzytometrischen Untersuchungen nicht zu Verfügung. Problem hierbei war, dass es keine kommerziell erhältlichen Lösungen mit definierter Konzentration xenoreaktiven Antikörpern gibt. Die Herstellung solcher Lösungen mit definierten Konzentrationen hätte den Umfang dieser Arbeit gesprengt.

Es hat sich beim Vergleich der Methoden Durchflußzytometrie und Zell-ELISA gezeigt, das eine gute bis sehr hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen, die mittels Durchflußzytometrie und denen, die mittels Zell-ELISA ermittelt worden sind. So beträgt die Korrelation zwischen den Ergebnissen bezüglich des IgM-Serumquotienten $r=0,881$ ($r^2=0,777$). Die Korrelation zwischen den durch Durchflußzytometrie und durch Zell-ELISA erbrachten Ergebnissen für IgG beträgt $r=1$ ($r^2=0,999$).

4.7 Peripheres IgM

Sowohl die mittels Zell-ELISA, als auch mittels durchflußzytometrischen Messungen gemessene IgM-Antikörperkonzentration, zeigte zur Mitte der Behandlung eine Erniedrigung der Konzentration. Hierbei kommt es bei der Untersuchung mittels Zell-ELISA zum Ende der Behandlung zu einem leichten Anstieg der Konzentration gegenüber der zur Behandlungsmitte gemessenen Konzentration. Der Serumquotient bei der durchflußzytometrischen Messung blieb daher annähernd auf gleichem Niveau.

Es ist hinlänglich bekannt, dass xenoreaktive IgM-Antikörper eine große Rolle bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion spielen (Tuso et al. 1993, Baquerizo et al. 1999, Platt et al. 1991, Tuso et al. 1992, Edwards et al. 1990) und diese als natürliche Antikörper, ohne vorherigen discordanten Gewebekontakt, vorkommen (Sandrin et al. 1993, Baquerizo et al. 1999). So ist der Konzentrationsabfall unter anderem dadurch zu erklären, das sich während der Perfusion der mit Schweinehepatozyten gefüllten Kartusche sich die Antikörper an den Schweinehepatozyten anlagern (Vergl. IgM-Nachweis auf den genutzten Schweinehepatozyten).

Der Abfall von der IgM-Antikörperkonzentration konnte auch in anderen Studien, die ein bioartifizielles Leberunterstützungssystem mit Grundlage von Schweinehepatozyten hatte (Baquerizo et al. 1999), sowie im Tierexperiment (Platt et al. 1991) nachgewiesen werden. Es ist somit nachgewiesen, dass sich durch Anwendung des HapatAssist™-Systems, während der Behandlungsdauer über die ersten drei Stunden, die Konzentration an xenoreaktiven IgM-Antikörper im Patientenserum signifikant reduzieren lässt. Der weitere Konzentrationsverlauf

über die letzten drei Stunden der Behandlung lässt vermuten, dass zum einen die Bindungskapazität erreicht ist, oder die Antigenstrukturen auf den Schweinehepatozyten komplett mit Antikörpern besetzt sind, so dass es zu keiner weiteren Antikörperbindung kommen kann. Eine immunologische Reaktion, im Sinne einer weiteren Ausschüttung/Bildung von Antikörpern scheint nicht der Fall, da es zu keinem Konzentrationsanstieg kommt.

4.8 Peripheres IgG

Das Absinken der Serumkonzentration der xenoreaktiven IgG-Antikörper konnte sowohl mittels Zell-ELISA, als auch mittels durchflußzytometrischen Untersuchung nachgewiesen werden. Dabei war der Konzentrationsabfall von der Mitte der Behandlung zum Ende der Behandlung hin nur geringfügig. Im direkten Vergleich dazu konnte der immunhistochemische Nachweis mit der Anlagerung von IgG-Antikörpern an den genutzten Schweinehepatozyten gelingen. Auch hier kommt es durch die Anlagerung von den IgG-Antikörpern zu einer Reduktion der Konzentration. Wenn man den Verlauf der Konzentrations-Ratio über die Behandlungsdauer verfolgt ist der maßgebliche Teil des Konzentrationsrückganges bis zur Hälfte der Behandlung bereits abgeschlossen. Dies kann dafür sprechen, dass die IgG-Antikörper hoch reaktiv gegenüber den präsentierten Epitopen auf den Schweinehepatozyten sind, und eine Zeit von 3 Stunden ausreicht, um einen maßgeblichen Teil der IgG-Antikörper binden zu lassen.

4.9 Peripheres IgG₁

Der Verlauf des IgG₁-Serumquotienten zeigt keine signifikante Veränderung über den Zeitraum der Behandlung. Im Zusammenhang mit der immunhistochemischen Aufarbeitung der benutzten Schweinehepatozyten, an denen sich nach der Behandlung keine Anlagerung von IgG₁ nachweisen ließ, ist davon auszugehen, dass bei der humoralen xenoreaktiven Abstoßungsreaktion IgG₁ keine Rolle spielt. Vielmehr, wie bei der Diskussion der immunhistochemischen Ergebnisse, ist davon auszugehen, dass IgG₁ allenfalls bei der Abstoßungsreaktion im späteren Intervall zum Tragen kommt (Zahorsky-Reeves et al. 2006). Damit ist methodisch nicht davon auszugehen, dass sich

beim Nachweis von xenoreaktiven Antikörpern mittels Zell-ELISA auf Basis von Schweinehepatozyten IgG₁-Antikörper anlagern, da zuvor schon kein Nachweis von gebundenen IgG₁-Antikörpern auf den während der Behandlung verwendeten Schweinehepatozyten gelingen konnte.

4.10 Peripheres IgG₂

Der Serumquotient von IgG₂ sank im Verlauf, bis zum Ende der Behandlung kontinuierlich. Im Vergleich dazu ließen sich immunhistochemisch IgG₂-Antikörperanlagerungen an den BAL-verwendeten Schweinehepatozyten nachweisen. In sofern ist auch hier die Anlagerung der IgG₂-Antikörper so groß, dass sich dies in einem Konzentrationsabfall während der Behandlung bemerkbar macht. Die Rolle der IgG₂-Subklasse ist indes bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion noch nicht gänzlich verstanden. Die IgG₂-Antwort auf polysaccharid-Antigene auf Bakterien, sowie die Bindung auf Schweinehepatozyten lassen auch hier den Schluss zu, das es sich bei der IgG₂-Subgruppe um präformierte Antikörper handelt. Zumal auch eine Bindung der IgG₂-Antikörper auf den Schweinehepatozyten bei den initialen Behandlungen mittels BAL gezeigt werden konnte. IgG₂-Antikörper spielen bei der xenoreaktiven Abstoßung eine Rolle, da sich diese mit Hilfe von FcγII-Rezeptoren der Monozyten und Neutrophile binden und diese für die zelluläre Abstoßungsreaktion eine Rolle spielen.

4.11 Peripheres IgG₃

Der Serumquotient für IgG₃ reduzierte sich zur Mitte der Behandlungen, konnte nach Beendigung der Behandlung jedoch keine Signifikanz mehr aufweisen. Immunhistochemisch gibt es keinen Anhalt dafür, dass sich die Konzentrationsreduktion aufgrund einer Bindung an die Schweinehepatozyten ergibt. Aufgrund der immunhistochemisch nachgewiesenen Ergebnisse, dass sich keine gebundenen IgG₃ Antikörper auf den genutzten Schweinehepatozyten anfärben lassen, ist zu vermuten, dass auch bei der durchflußzytometrischen Untersuchung unter Verwendung von Schweinehepatozyten es zu keiner Antikörperbindung kommt und so keine Konzentrationsänderungen nachweisen lassen.

4.12 Peripheres IgG₄

Im Verlauf der Behandlungen kommt es zu keiner Veränderung des IgG₄-Serumquotienten. Im Vergleich dazu ist der immunhistochemische Nachweis von IgG₄ auf den BAL-verwendeten Schweinehepatozyten deutlich. Bei Patient #149 nimmt die Farbintensität in den Behandlungen drei und vier noch zu. Geht man nun davon aus, dass sich die natürlichen, xenoreaktiven Antikörper aufgrund des gastrointestinalen Kontaktes mit Bakterien und deren α Gal-Strukturen, bilden (Galili et al. 1988a, Hamedeh et al. 1992), so besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der Steigerung zur Mitte der Behandlung um eine ausgeprägte Reboundphänomen (Li et al. 1996, Taniguchi et al. 1996) handelt. Die gemeinsamen Epitope von gastrointestinalen Bakterien (E. coli, Klebsiella, Serratia) und Schweinehepatozyten könnten dafür als Erklärung dienen. Dieses Reboundphänomen könnte erklären, warum trotz Bindung an Schweinehepatozyten kein Abfall peripher zu verzeichnen ist.

4.13 Kinetik der Antikörperreaktionen

Sowohl die Ergebnisse des Zell-ELISA und der durchflußzytometrischen Untersuchungen zeigen, dass sich innerhalb der ersten drei Stunden die Konzentration verändern. Für IgM, IgG, sowie die Subtyp IgG₂ kommt es zu einer Konzentrationsverminderung über die Zeit. Im weiteren Verlauf, bis zum Ende der Behandlung, kommt es zu keiner größeren Konzentrationsänderung. Somit ist davon auszugehen, dass sich in den ersten drei Stunden des Kontaktes zwischen Patientenserum und Schweinehepatozyten der Großteil der Antikörperreaktion abspielt. Die Frage, ob sich das Konzentrationsniveau, welches zu Mitte der Behandlung gemessen worden ist, nicht schon viel früher in der Behandlung erreicht ist, kann aufgrund des Studiendesigns, mit alleinigen Serumproben zu den Zeitpunkten vor-mitte-ende der Behandlung nicht beantwortet werden. Hierzu wären Probenentnahmen zu weiteren Zeitpunkten nötig gewesen. Bei dem möglichen Reboundphänom von IgG₄ zeigt sich, dass es bei Antigen-Antikörperreaktionen sich nicht im klassischen Sinne um chemische Reaktionen handelt. Vielmehr handelt es sich bei dieser hoch spezifizierten Reaktion zwischen Antigen und Antikörper um einen dynamischen

und individuellen Prozess. Die Immunogenität eines Stoffes ist stark von seiner Molekulargewicht, der Anzahl, Polarität bzw. Rigidität der antigenen Determinanten abhängig. Dabei spielt die Eigenschaft des Antigens eine Rolle (Fremdheitsgrad, Molekulargewicht, Löslichkeit, Abbaubarkeit), die Antigenendosis, der Immunisierungsgrad, Kreuzreaktivität und nicht zuletzt, genetische Faktoren, und somit Speziesdifferenzen eine Rolle.

Da das HepatAssist™-System aus mehreren potentiell antikörperbindenden Einheiten besteht, ist es nicht auszuschließen, dass diese (Plasmaphereseeinheit, Aktivkohlefilter) den Konzentrationsverlauf innerhalb der Behandlung beeinflussen.

4.14 Vergleich der initialen Serumquotienten

Bei dem Vergleich der initialen Serumquotienten von IgM vor der ersten Behandlung, konnten Unterschiede im Vergleich zum Kontrollserum aufgezeigt werden. Auch der Vergleich der IgG-Ratio zum gleichen Zeitpunkt zeigt eine Differenzen. Für die IgG-Subtypen IgG₂ und IgG₄, denen eine Anlagerung an die Schweinehepatozyten nachgewiesen werden kann, zeigt sich ebenso eine unterschiedliche Ausprägung. Die Variation der Serumquotienten und somit der Antikörper-Konzentrationen ist auf die individuelle Antigenpräsentation jedes Patienten zurückzuführen, insbesondere gegenüber dem α Gal-Epitop der gastrointestinal vorkommenden Bakterien (Galili et al. 1988a, Hamadeh et al. 1992). Schon zuvor wurde über die Variation bezüglich der xenoreaktiven Antikörper berichtet, beiden eine individuelle Konzentration von xenoreaktiven Antikörpern vorlag (Zhu und Hurst 200, Hammer et al. 1992, Edwards et al. 1990).

4.15 Ergebnisse im Kontext der Komplementaktivierung

Im Rahmen der HepatAssist™-Studie wurde durch Dr. med. Daniel Hamann, die Rolle der Komplementaktivierung bei der xenoreaktiven Abstoßung untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Komplementaktivierung über den klassischen Weg, als auch über den alternativen Weg (mit Aktivierung über Antigen-Antikörperkomplexe) ein Teil der xenoreaktiven Abstoßungsreaktion ist

(Hamann 2005). Da die Komplementaktivierung über den klassischen Weg nur über IgG, mit Ausnahme von IgG₄, und IgM stattfindet (Spiegelberg 1989), und bei den IgG-Subtypen IgG₁₊₃ die besten Aktivatoren zur Komplementaktivierung sind (Baquerizo et al. 1999), diese aber nicht immunhistochemisch auf den Schweinehepatozyten nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Kaskade überwiegend über die Antikörpergruppen IgG₂ und IgM abläuft.

4.16 Ergebnisse im Kontext der hyperakuten Abstoßungsreaktion

Die hyperakute xenoreaktive Abstoßungsreaktion von Schweinehepatozyten beruht somit auf der Bindung von präformierten Antikörpern an der Zelloberfläche, sowie der Aktivierung von Komplementsystem über den klassischen und alternativen Weg.

IgM als bindender Antikörper an die Schweinehepatozyten ist phylogenetisch, ontogenetisch und aufgrund seiner speziellen Pentamerstruktur hoch effektiv in Funktion der Opsonisation, Agglutination und Komplementaktivierung (Keller 1994), und somit ein wichtiger funktioneller Antikörper bei der hyperakuten xenoreaktiven Abstoßungsreaktion. Dem xenoreaktiven IgM kann somit gewisse Schlüsselrolle bei der hyperakuten xenoreaktiven Abstoßungsreaktion eingeräumt werden.

IgG und seine Subgruppen haben bei der hyperakuten xenoreaktiven Abstoßungsreaktion einen unterschiedlichen Stellenwert. IgG₁ und IgG₃ scheinen dabei keine Rolle zu spielen, erst mit zeitlicher Latenz, die sich jenseits des Zeitraumes einer hyperakuten Abstoßungsreaktion befindet, scheint IgG₁ von Bedeutung zu sein (Lindeborg et al. 2001, Zahorsky-Reeves et al. 2006). IgG₂ in seiner Bindung an die Schweinehepatozyten nachweisbar, nimmt ebenso wie IgM eine gewisse Schlüsselrolle bei der hyperaktuen Abstoßungsreaktion ein (Zahorsky-Reeves 2006, Ross et al. 1993, Baquerizo et al. 1999). Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass IgG₂ ein wichtiger Faktor bei der Komplementaktivierung ist (Lucisano Valim und Lachmann 1991). IgG₄, bindend an die Schweinehepatozyten, spielt mit einem möglichen Reboundphänomen während der Behandlung ebenso eine Rolle wie bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion.

Im Vergleich zur hyperakuten Abstoßungsreaktion von vaskularisierten Vollorganen sind bei der Immunreaktion mit isolierten Schweinehepatozyten einige Unterschiede zu beachten. Bei vaskularisierten Organen kommt es bei einer hyperakuten xenoreaktiven Abstoßung zur Interaktion mit dem Endothel der Gefäße. Hier gibt es Anzeichen, dass sich die Präsentation von Antigenen auf Schweineendothel und Schweinehepatozyten unterscheidet (Fujioka et al. 1995, Van de Kerkhove et al. 2005). Speziell IgG₄ scheint bei hyperakuten Abstoßungsreaktion gegenüber Schweineendothelzellen keine Rolle zu spielen (Ross et al. 1993) ist jedoch beim immunhistochemischen Nachweis auf Schweinehepatozyten nach den Behandlungen zu finden. In wie weit jedoch diese Unterschiede einen Einfluss auf den Ablauf der hyperakuten xenoreaktiven Abstoßungsreaktion haben kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Folgt man dem Reaktionsverlauf der Abstoßungsreaktion, so sind sicherlich für die Komplementaktivierung verantwortlichen Wege (klassischer und alternativer Aktivierungsweg) für beide Szenarien (HepatAssist™-System und Vollorgane) ähnlich. Bezüglich des alternativen Weges, der unspezifisch aktiviert wird, gibt es wenig Einflußfaktoren, die sich aus der Behandlung mit dem Hepat-Assist-System ergeben. Beim klassischen Weg, sind gegebenenfalls oben genannte Unterschiede aufgrund der Antigenpräsentation, und damit auch der Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen zu berücksichtigen.

Ein weiterer entscheidender Faktor, welcher die Vergleichbarkeit zwischen HepatAssist™-System und Vollorgan einschränkt ist die Tatsache, dass bei dem HepatAssist™-System keine korpuskulären Blutbestandteile in Interaktion mit den Schweinehepatozyten kommen. Beim implantierten Vollorgan erfolgt die Perfusion mit Vollblut und entsprechend erfolgt auch eine, wenn nicht im klassischen Sinne, Abstoßungsreaktion. Es kommt zur Aktivierung der Inflammations-/Gerinnungskaskade, der Thrombozyten und zur Ausbildung von Thromben innerhalb des Organs, damit zur Organischämie und somit zum Organuntergang (Makowka et al. 1994). In wie weit aus der hyperakuten Abstoßungsreaktion auch ein Zelluntergang der Schweinehepatozyten im Hepat-

Assist-System resultiert ist Gegenstand einer zurzeit in Arbeit befindlichen Dissertation. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass es während der Behandlung zu einem Schaden der Schweinehepatozyten kommt (Schulte am Esch et al. 2002).

4.17 Ausblick

Für die weitere Anwendung des Hepat-Assist™-Systems können folgende Überlegungen angestellt werden: Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass in den ersten drei Stunden der Behandlung der überwiegende Teil der Antigen-Antikörperreaktion an den Schweinehepatozyten stattfindet. Zu klären wird sein, in wie weit diese Immunreaktion bis zu diesem Zeitpunkt die Funktion der Schweinehepatozyten beeinträchtigt, und somit ein Austausch der Schweinehepatozyten nötig ist, oder gar eine Behandlung von nur drei Stunden den gleichen Effekt hat wie der einer sechsstündigen Behandlung. Weitere Untersuchungszeitpunkte zwischen Beginn der Behandlung und Mitte der Behandlung könnten weiteren Aufschluss über die Reaktionskinetik der Antikörperbindung im HepatAssist™-System geben. Unter dieser Berücksichtigung könnte man Verfahren etablieren, die die xenoreaktiven Antikörper schon vor Beginn der Behandlung eliminiert, um die humorale xenoreaktive Reaktion zu verlangsamen, somit gegebenenfalls die Effektivität des HepatAssist™-Systems erhöht. Verfahren dieser Art sind in anderen Studien bereits zum Einsatz gekommen (Kozlowski et al. 1997, Magnusson et al. 2000). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Eliminierung der Antigenstruktur auf den Schweinehepatozyten, sei es nun enzymatisch oder genetisch, in transgenen Schweinen, in denen Antigenstrukturen, speziell das α -Gal-Epitop nicht oder vermindert exprimiert werden. In wie weit jedoch das α -Gal-Epitop für die strukturelle Integrität der Zellen verantwortlich ist und welche Konsequenz dies hat, ist zuvor zu klären.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels immunhistochemischer Aufarbeitung der, in einem klinisch angewendetem bioartifziellem Leberunterstützungssystem, verwendeten Schweinehepatozyten gezeigt werden, dass sich xenoreaktive Antikörper an diese Schweinehepatozyten anlagern. Dabei war die Anfärbung für den Nachweis von IgM-Antikörpern auf den Schweinehepatozyten schwach positiv ausgefallen. Im Vergleich dazu zeigte sich bei der Anfärbung für den Nachweis von IgG-Antikörpern eine deutlich positiv Anfärbung. Bei der Diskriminierung in die IgG-Subtypen konnte für IgG₁ und IgG₃ keine Bindung an die Schweinehepatozyten nachgewiesen werden. Die Subtypen IgG₂ und IgG₄ konnten dagegen auf den verwendeten Schweinehepatozyten angefärbt werden. Bei den Patienten, die mehr als eine Anwendung erhalten hatten, konnte im Verlauf über die Behandlungen keine eindeutige Veränderung in der Färbungsintensität registriert werden. Aufgrund dessen lässt sich sagen, dass xenoreaktive Antikörper der Gruppe IgM, sowie die IgG-Subpopulation IgG₂ und IgG₄ die prädominanten Antikörper bei der humoralen Immunreaktion sind. Der fehlende Nachweis von IgG₁ und IgG₃ auf den bei der Behandlung beteiligten Schweinehepatozyten lässt zu Schluss zu, dass diese Subpopulationen nicht an der humoralen Immunreaktion im HepatAssist™-System beteiligt sind.

Mittels durchflußzytometrischer Untersuchung und unter Verwendung eines Zell-ELISA, beides auf Basis der in dem bioartifziellem Leberunterstützungssystem verwendeten Schweinehepatozyten, konnte gezeigt werden, dass sich im Verlauf der sechsständigen Behandlung die Konzentration der xenoreaktiven IgM-Antikörper signifikant reduziert. Die Reduktion der IgG-Konzentration ist im Verlauf der Behandlung ist ebenso deutlich signifikant. Auch bei der IgG₂-Subpopulation konnte eine signifikante Konzentrationsreduktion im Verlauf der Behandlung festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die zuvor immunhistologisch nachgewiesene Bindung dieser Antikörper, im Rahmen einer xenoreaktiven Abstoßungsreaktion bei der Behandlung mit einem bioartifziellen Leberunterstützungssystem, einen Konzentrationsverminderung im Patientenserum zur Folge hat. Bei Betrachtung der IgG₄-Subpopulation zeigte

sich keine signifikante Reduktion der Antikörperkonzentration zum Ende der Behandlung. Hier kann vermutet werden, dass ein Rebound-Phänomen bezüglich der Reaktion auf das gemeinsame Antigen des α -Gal vorliegt, da diese auch auf gastrointestinalen Bakterien vorkommt.

Bei dem Vergleich der Antikörper-Titer vor der Gesamtbehandlung mittels des HepatAssist™-Systems, und damit auch vor Kontaktaufnahme mit xenogenen Antigenen, konnte gezeigt werden, dass es einen individuellen Unterschied bezüglich der Antikörper-Titer zwischen den behandelten Patienten gibt. Somit ist von einer individuellen Primärreaktion gegenüber dem α Gal-Epitop auf den gastrointestinalen Bakterien auszugehen, die einen individuellen Titer zur Folge hat.

6 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
ALV	akutes Leberversagen
AP	alkalische Phosphatase
AV	arterio-venös
BAL	bioartifizielle Leberunterstützung
CCT	craniale Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HE	hepatische Enzephalopathie
HRP	hoersradishperoxidase
IgG	Immunlobulin G
IgM	Immunglobulin M
LPS	Lipopolysaccharid
LTX	Lebertransplantation
MAC	Membran Angriffs Komplex
MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOPC	mouse plasmocytoma
mRNA	messenger ribonucleic acid
MYA	million years ago
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PE	Phycoerythrin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SIT	standard Intensivtherapie
tgl.	täglich

U/min

UDP

1,3-GT

Umdrehungen pro Minute

Uridindiphosphat

Alpha1,3-Galactosyltransferase

7 Literaturverzeichnis

1. Adachi H, Rosengard BR, Hutchins GM, Hall TS, Baumgartner WA, Borkon AM, Reitz BA (1987) Effects of cyclosporine, aspirin, and cobra venom factor on discordant cardiac xenograft survival in rats. *Transplantation Proc* 19:1145-1148.
2. Alvarado CG, Cotterell AH, McCurry KR, Collins BH, Magee JC, Berthold J, Logan JS, Platt JL (1995) Variation in the level of xenoantigen expression in porcine organs. *Transplantation* 59(11):1589-1596.
3. Baquerizo A, Mhoyan A, Kearns-Jonker M, Arnaout WS, Shackelton C, Busuttill RW, Demetriou AA, Cramer DV (1999) Characterisation of human xenoreactive Antibodies in liver failure patients exposed to pig hepatocytes after bioartificial liver treatment, *Transplantation* 67:5-18.
4. Basu M, Basu S (1973) Enzymatic synthesis of a blood group B-related pentaglycosylceramide by an α -galactosyltransferase from rabbit bone marrow. *J. Biol. Chem.* 248(5):1700-1706.
5. Betteridge A, Watkins WM (1983) Two α -3-D-galactosyltransferase in rabbit stomach mucosa with different acceptor substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* 132(1):29-35.
6. Bjorndal H, Lindberg B, Nimmich W (1971) Structural studies on Klebsiella O group 1 and 6 lipopolysaccharides, *Acta Chem Scand.* 25(2):750.
7. Böker KH, Manns MP (1998) Akutes Leberversagen, *Internist*, 39(5):442-452.
8. Burnell JM, Dawborn JK, Epstein RB, Gutman RA, Leinbach GE, Thomas ED, Volwiler W (1967) Acute hepatic coma treated by cross-circulation or exchange transfusion. *New Engl J Med* 276(17): 935-943.
9. Calne RY (1970) Organ transplantation between widely disparate species, *Transplant Proc.* 2(4):550-556.
10. Capocaccia L, Angelico M (1991) Fulminant Hepatic Failure. Clinical Features, Etiology, Epidemiology, and current Management, *Dig Dis Sci* 36(6):775-779.
11. Chen S, Eguchi S, Watanabe F, Hewitt W, Kahaku E, Arnout W, Rozga J, Demetriou AA (1996) Hepatic Support Strategies, *Transplant Proc* 28(4):2036-2038.

12. Chen SC, Hewitt WR, Watanabe FD, Eguchi S, Kahaku E, Middleton Y, Rozga J, Demetriou AA (1996) Clinical experience with a porcine hepatocyte-based liver support system. *Int J Artif Organs* 19(11): 664-669.
13. Cotterell AH, Collins BH, Parker W, Harland RC, Platt JL (1995) The humoral immune response in humans following cross-perfusion of the porcine Organs. *Transplantation* 60(8):861-868.
14. Curvall M, Lindberg B, Lönnngren J, Rudén U, Nimmich W (1973) Structural studies of Klebsiella O group 8 polysaccharides, *Acta Chem Scand* 27(10):4019-4021.
15. Dodson SF, Dehara K, Iwatsuki S (1994) Liver transplantation for fulminant hepatic failure *ASAIO J* 40(1):86-88.
16. Edwards N, Ott, G, Berger C, He X, Teppler I, Copey L, Smith C, Reemtsma K, Rose E (1990) Incidence of preformed antibodies against potential xenodonors in human sera. *Transplantation* 49(5):1022-1024.
17. Eiseman B, Liem DS, Raffucci F (1965) Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure. *Ann Surg* 162(3): 329-345.
18. Eto T, Ichikawa Y, Nishimura K, Ando S, Yamakawa T (1968) Chemistry of lipid posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. XVI. Occurrence of ceramide pentasaccharide in the membrane of erythrocytes and reticulocytes of rabbit. *J Biochem* 64(2): 205-213.
19. Forty J, Hasan R, Cary N, White DJG, Wallwork J (1992) Hyperacute rejection of rabbit hearts by human blood is mediated by the alternative pathway of complement. *Transplantation proceedings* 24(2):488-489.
20. Friedman DJ, Shimizu A, Smith RN, Colvin RB, Seebach JD, Sachs DH, Iacomini J (1999) Human CD4+ T-cells mediate rejection of porcine xenografts. *Journal of Immunology* 162(9): 5256-5262.
21. Fujioka H, Cramer DV, Yasunaga C, Tusso PJ, Wu GD, Middleton Y, Moscioni AD, Rozga J, Demetriou AA, Makowka L (1995) Differential patterns of reaction of human natural antibodies to pig hepatocytes and vascular endothelium. *Liver Transpl Surg* 1(2):85-93.

22. Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I (1984) A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med* 160(5):1519-1531.
23. Galili U, Macher BA, Buehler J, Shohet SB (1985) Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha(1-3)-linked galactose residues. *J Exp Med* 162(2):573-582.
24. Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA (1987) Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1-3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(5):1369-1373.
25. Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffiss JM (1988) Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 56(7):1730-1737.
26. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA (1988) Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 263(33):17755-17762.
27. Galili U, Swanson K (1991) Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(16):7401-7404.
28. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397(6718):436-441.
29. Gimson AE, Braude S, Mellon PJ, Canalese J, Williams R (1982) Earlier charcoal haemoperfusion in fulminant hepatic failure. *Lancet* 2(8300): 681-683.
30. Gimson AE, White YS, Eddleston AL, Williams R (1983) Clinical and prognostic differences in fulminant hepatitis type A, B and non-A non-B. *Gut* 24(12):1194-1198.

31. Gochi E, Wu GD, Wakiyama S, Kearns-Jonker M, Swensson J, Cramer DV (1999) Genetic control of the humoral responses to xenografts. III Identification of the immunoglobulin V_H Genes responsible for encoding rat immunoglobulin G xenoantibodies to hamster heart grafts. *Transplantation* 68(1):15-24.
32. Good AH, Cooper DK, Malcolm AJ, Ippolito RM, Koren E, Neethling FA, Ye Y, Zuhdi N, Lamontagne LR (1992) Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: Implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc* 24(2): 559-562.
33. Goulet F, Normand C, Morin O (1988) Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. *Hepatology* 8(5):1010-1018.
34. Hamadeh RM, Jarvis GA, Galili U, Mandrell RE, Zhou P, Griffiss JM (1992) Human natural anti-Gal IgG regulates alternative complement pathway activation on bacterial surfaces. *J Clin Invest* 89(4):1223-1235.
35. Hamann D (2005) Komplementaktivierung im Rahmen der Therapie mit einer klinisch angewendeten xenogenen extracorporalen bioartifiziellen Leberunterstützungsmaschine bei Patienten mit akutem Leberversagen. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
36. Hammer C, Csapo C, Höbel G, Müller U, Werdan K (1992) Preformed natural antibodies: action on endothelial cells. *Transplant Proc* 24(2):590-591.
37. Häussinger D, Gerok W, Sies, H (1986) The effect of urea synthesis on extracellular pH in isolated perfused rat liver. *Biochem J* 236(1):261-265.
38. Hoofnagle JH, Carithers RL, Shapiro C, Ascher N (1995) Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 21(1): 240-252.
39. Hughes RD, Wendon J, Gimson AE (1991) Acute liver failure. *Gut Suppl*: S86-91.
40. Jansson PE, Lindberg AA, Lindberg B, Wollin R (1981) Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from *Enterobacteriaceae*. *Eur J Biochem* 115(3):571-577.

41. Johnston PS, Lim SML, Wang MW, Wright L, White DJ (1991) Hyperacute rejection of xenografts in the complete absence of antibody. *Transplant Proc* 23(1): 877-879.
42. Joziassse DH, Shaper JH, Van den Eijnden DH, Van Tunen AH, Shaper NL (1989) Bovine alpha 1-3-galactosyltransferase: isolation and characterization of a cDNA Clone. Identification of homologous sequences in human genomic DNA. *J Biol Chem* 264(24):14290-14297.
43. Kawamura A, Takahashi T, Kusumoto K (1985) The development of a new hybrid hepatic support system using frozen liver pieces. *Jpn J Artif Organs* 14: 253-257.
44. Keller R, 1994 *Immunologie und Immunpathologie* 4. Aufl., Thieme Stuttgart.
45. Kemp E, White D, Dieperink H, Larsen S, Starklint H, Steinbruchel D (1987) Delayed rejection of rabbit kidneys transplanted into baby pigs, *Transplant Proc* 19(1Pt2):1143-1144.
46. Van de Kerkhove MP, Germans MR, Deurholt T, Hoekstra R, Joziassse DH, van Wijk AC, van Gulik TM, Chamuleau RA, Ross A (2005) Evidence of Gal α (1-3)Gal expression on primary porcine hepatocytes: implications for bioartificial liver systems. *J Hepatol* 42(4): 531-547.
47. Kimura K, Gundermann KJ, Lie TS (1980) Hemoperfusion over small liver pieces for liver support. *Artif Organs* 4: 297-301.
48. Kozlowski T, Fuchimoto Y, Monroy M, Bailin M, Martin-Ruiz R, Foley A, Xu Y, Awwad M, Fishman J, Andrews D, Ritzenthaler J, Sablinski T, Ierino FL, Sachs DH (1997) Apheresis and column absorption for specific removal of Gal-alpha-1,3-Gal natural antibodies in a pig-to-baoon model *Transplant Proc* 29(1-2): 961.
49. Larsen RD, Rajan VP, Ruff M, Kukowska-latallo J, Cummings RD, Lowe JB (1989) Isolation of a cDNA encoding a murine UDPgalactose:beta-D-galactosyl-1,4-N-acetyl-D-glucosaminide alpha-1,3-galactosyltransferase: expression cloning by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(21):8227-8231.

50. LaVecchio JA, Dunne AD, Edge AS (1995) Enzymatic removal of alpha-Galactosyl epitopes from porcine endothelial cells diminishes the cytotoxic effect of natural antibodies. *Transplantation* 60(8):841-847.
51. Lee WM (1993) Acute Liver Failure. *N Engl J Med* 329(25):1862-1872.
52. Lee WM (1996) Management of acute liver failure, *Semin Liver Dis*, 16(4):369-378.
53. Li SF, Neethling FA, Taniguchi S, Yeh JC, Kobayashi T, Ye Y, Koren E, Cummings RD, Cooper DK (1996) Glycans derived from porcine stomach mucin are effective inhibitors of natural ant-alpha-Galactosyl antibodies in vitro and after intravenous infusion in baboons. *Transplantation* 62(9):1324-1331.
54. Lidofsky SD (1995) Fulminant hepatic failure. *Crit Care Clin* 11(2):415-430.
55. Lindeborg E, Kumagai-Braesch, Tibell A, Möller E (2001) Continued production of xenoimmune antibodies 6-8 years after clinical transplantation of fetal pig islet-like cell-clusters. *Xenotransplantation* 8(4):273-283.
56. Lucisano Valim YM, Lachmann PJ (1991) The effect of antibody isotope and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: A systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin Exp Immunol* 84(1): 1-8.
57. Magnusson S, Stokan V, Mölne J, Nilsson K, Rydberg L, Breimer ME (2000) Blocking of human anti-pig xenoantibodies by soluble GAL alpha 1-3GAL and GAL alpha 1-2GAL disaccharides; studies in a pig kidney in vitro perfusion model. *Transpl Int* 13(6): 402-412.
58. Makowka L, Chapman FA, Cramer DV, Qian S, Sun H, Starzl TE (1990) Platelet-activating factor and hyperacute rejection. The effect of a platelet-activating factor antagonist, SRI 63-441, on rejection of xenografts and allografts in sensitized hosts. *Transplantation* 50(3):359-365.
59. Makowka L, Cramer DV (1994) The pathogenesis of the xenograft rejection. *Clin. Transplant.* 8(2 Pt 2):145-154.
60. Manns MP (1990) Akutes Leberversagen: Definition, Ätiologie, klinisches Bild und Prognose. *Ergebnisse der Gastroenterologie, Verhandlungs-Band* 26:7-9.

61. Matsubara S, Okabe K, Ouche K, Miyazaki Y, Yajima Y, Suzuki H, Otsuki M, Matsuno S (1990) Continuous removal of middle molecules by hemofiltration in patients with acute liver failure. *Crit Care Med* 18(12): 1331–1338.
62. McMorro IM, Comrack CA, Sachs DH, DerSimonian H (1997) Heterogeneity of human Anti-Pig natural Antibodies cross-reactive with the Gal(alpha1,3)Galactose Epitope. *Transplantation* 64(3):501-510.
63. Mendoza A, Fernandez F, Mutimer DJ (1997) Liver transplantation for fulminant hepatic failure: importance of renal failure. *Transpl Int* 10(1):55-60.
64. Moore K (1991) Etiology and Management of renal failure in acute liver failure. In: *Acute liver failure: improved understanding and better therapy.* Hughes RD, Williams R (Hrg.) SmithKline Beecham Pharmaceuticals, London 47-53.
65. Morsiani E, Rozga J, Scott H, Lebow L, Mosaoni A, Kong L, McGrath M, Rosen H, Demetriou AA (1995) Automated liver cell processing facilities large-scale isolation and purification of porcine hepatocytes. *ASAIO J* 41(2): 155-161.
66. Mullan C (1999) Bioartificial organs may help to reduce risk of zoonosis in xenotransplantation. *Artif Organs* 23(4): 366-367.
67. O'Grady JG, Langley PG, Isola LM, Aledort LM, Williams R (1986) Coagulopathy of fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 6(2):159-163.
68. Ostapowicz G, Lee WM (2000) Acute hepatic failure: A western perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 15(5): 480-488.
69. Palmetshofer A, Galili U, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH (1998) Alpha-Galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type II activation. *Transplantation* 65(7): 971-978.
70. Pandha HS (1992) Treating acidosis in fulminant hepatic failure: the case against use bicarbonate solutions. *N Z Med J* 105(937):271.
71. Parker W, Bruno D, Holzknicht ZE, Platt JL (1994) Characterization and affinity of xenoreactive human natural antibodies. *J Immunol* 153(8):3791-3803.

72. Pereira SP, Langley PG, Williams R (1996) The management of abnormalities of hemostasis in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 16(4):403-414.
73. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolam RM, Bach FH (1991) Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate Model. *Transplantation* 52(2):214-220.
74. Ross JR, Kirk AD, Ibrahim SE, Howell DN, Baldwin WM III, Sanfilippo FP (1993) Characterization of human anti-porcine „natural antibodies“ recovered from ex vivo perfused hearts – predominance of IgM and IgG2, *Transplantation* 55(5):1144-1150.
75. Rozga J, Holzman MD, Ro MS, Griffin DW, Neuzil DF, Giorgio TD, Moscioni AD, Demetriou AA (1993) Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann Surg* 217(5): 502-511.
76. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IFC (1993) Studies on human naturally occurring antibodies to pig xenografts. *Transplant Proc* 25(5):2917-2918.
77. Saracco G, Macagno S, Rosina F, Rizzetto M (1988) Serologic markers with fulminant hepatitis in persons positive for hepatitis B surface antigen. A worldwide epidemiologic and clinical survey. *Ann Intern Med* 108(3):380-383.
78. Schulte am Esch J II, Hamann D, Soltau M, Zante B, Jungbluth M, Sputek A, Nierhaus A, Broering DC, Rogiers X (2002) Human antibody deposition, complement activation and DNA-fragmentation are observed for porcine hepatocytes in a clinically applied bioartificial liver assist system. *Transplant Proc.* 34(6): 2321.
79. Sen PK, Bhalerao RA, Parulkar GP, Samsi AB, Shah BK, Kinare SG (1966) Use of isolated perfused cadaveric liver in the management of hepatic failure. *Surgery* 59(5):774-781.
80. Shons AR, Najarian J (1974) Modification of xenograft rejection by aspirin, dextran, and cinanserin: the importance of platelets in hyperacute rejection. *Transplant Proc* 6(4):435-440.

- 81.** Silk DB, Trewby PN, Chase RA, Mellon PJ, Hanid MA, Davies M, Langley PG, Wheeler PG, Williams R (1977) Treatment of fulminant hepatic failure by polyacrylonitrile-membrane haemodialysis. *Lancet* 2(8027): 1–3.
- 82.** Spiegelberg HL (1989) Biological role of different antibody classes. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 90 Suppl 1: 22-27.
- 83.** Starzl T, Demetris AJ, Van Thiel D (1989) Liver Transplantation (1), *N Engl J Med* 321(15):1014-1022.
- 84.** Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D (1989) Liver transplantation – Second of two parts. *N Engl J Med* 321(16):1092-1099.
- 85.** Tanemura M, Galili U (2000) Differential expression of alpha-Gal epitopes on pig and mouse organs. *Transplant Proc* 32(5):843.
- 86.** Tanemura M, Maruyama S, Galili U (2000) Differential expression of alpha-Gal epitopes (Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R) on pig and mouse organs. *Transplantation* 69(1):187-190.
- 87.** Taniguchi S, Neethling FA, Korchagina EY, Bovin N, Ye Y, Kobayashi T, Niekrasz M, Li S, Koren E, Oriol R, Cooper DK (1996) In vivo immunoadsorption of antipig antibodies in baboons using a specific Gal(alpha)1-3Gal Column. *Transplantation* 62(10):1379-1384.
- 88.** Thall A, Etienne-Decerf J, Winand R, Galili U (1991) The alpha-galactosyl epitope on mammalian thyroid cells. *Acta Endocrin (Copenh)* 124(6):692-699.
- 89.** Trey, C (1972) The fulminant hepatic failure surveillance study. Brief review of the effects of presumed etiology and age of survival. *Can Med Assoc J* 106 :525-529.
- 90.** Tuso PJ, Cramer DV, Yasunaga C, Cosenza C, Makowka L (1992) Immunochemical characterization of the binding of human Immunoglobulins to pig vascular Endothelium. *Transplant Proc* 24(2): 596-597.
- 91.** Tuso PJ, Cramer DV, Middelton YD, Kearns-Jonker M, Yasunaga C, Cosenza CA, Davis WC, Wu GU, Makowka L (1993) Pig aortic endothelial cell antigens recognized by human IgM natural antibodies. *Transplantation* 56(3):651-655.

- 92.** Watanabe FD, Mullon JP, Hewitt WR, Arkadopoulos N, Kahaku E, Eguchi S, Khalili T, Arnout WS, Shakelton CR, Rozga J, Solomon B, Demetriou AA (1997) Clinical Experience with a bioartificial Liver in the Treatment of severe Liver failure – A phase I trial. *Ann Surg* 225(5):484-494.
- 93.** Williams R, Gimson AE (1991) Intensive liver care and management of acute hepatic failure. *Dig Dis Sci* 36(6):820-826.
- 94.** Williams R (1996) Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 16(4):343-348.
- 95.** Xu H, Edwards NM, Chen JM, Dong RN, Michler RE (1995) Natural anti-pig xenoantibody is absent in neonatal human serum. *J Heart Lung Transplant* 14(4):749-754.
- 96.** Xu H, Edwards NM, Chen JM, Kwiatkowski P, Rosenberg SE, Michler RE (1995) Newborn baboon Serum lacks natural anti-Pig xenoantibody, *Transplantation* 59(8):1189-1194.
- 97.** Zahorsky-Reeves JL, Gregory CR, Cramer DV, Patanwala IY, Kyles AE, Borie DC, Kearns-Jonker MK, (2006) Similarities in the Immunglobulin response and VH gene Usage in rhesus monkeys and humans exposed to porcine hepatocytes. *BMC Immunol* 20;7:3.
- 98.** Zhu A, Hurst R (2000) Human natural antibodies that recognize nonalphaGal antigens on porcine red blood cells. *Transplant Proc* 32(5):872-873.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor X. Rogiers für die Themenstellung, die gewährte Unterstützung und die vortrefflichen Arbeitsbedingungen an seinem Institut. Ebenso danke ich seinem Nachfolger Herrn Professor B. Nashan für die exzellente Weiterbereuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Jan Schulte am Esch, für seine geduldige Unterstützung und Vertrauen, sowie Diskussionsbreitschaft und motivierenden Ratschlägen. Diese Zusammenarbeit war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und Gelingen dieser Arbeit. Weiter danke ich Herrn Privatdozent L. Fischer für die hervorragende Unterstützung um dieses Projekt zu vollenden.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten des chirurgischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf schulde ich großen Dank für die Unterstützung und ständige Bereitschaft bei der Klärung von laborchemischen Fragestellungen sowie bei der Etablierung der angewandten Methoden.

Dem Team des Transplantationszentrums des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich für die Bereitstellung der erforderlichen Daten.

9 Lebenslauf

Entfällt in der Veröffentlichung der Dissertation aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

B. Zante