

Fachinformationen für Ärzte, Kliniken und Interessierte über Forschungsprojekte der *kinderherzen*

„Entwicklung von mitwachsenden Herzklappenprothesen für die pädiatrische Herzchirurgie basierend auf xenogenen dezellularisierten Herzklappenmatrices – Entwicklung eines präoperativen Tests zum Ausschluss immunologischer Inkompatibilitäten zwischen Patient und dezellularisierter xenogener Herzklappenprothese“

Weltweit benötigen jährlich etwa 70.000 Kinder, junge Erwachsene und Frauen mit Kinderwunsch einen Herzklappenersatz, der perfekte haemodynamische Eigenschaften und eine möglichst lebenslange Haltbarkeit besitzt. Leider erfüllen die zur Verfügung stehenden konventionellen Herzklappenprothesen jeweils nur eine dieser Eigenschaften, sodass haltbare mechanische Herzklappen nicht ohne Antikoagulationstherapie und haemokompatible bioprothetische Herzklappen nicht ohne Reoperationen auskommen. Aus diesem Grund haben wir dezellularisierte menschliche Herzklappenprothesen entwickelt, die perfekte

Haemokompatibilität mit Langlebigkeit und sogar Wachstumspotenzial verbinden. Diese werden momentan in zwei europaweiten klinischen

Studien (ESPOIR und ARISE) ausführlich getestet. Leider führt der Mangel an geeigneten menschlichen Spenderherzklappen dazu, dass nicht alle Patienten mit einer dezellularisierten Herzklappe versorgt werden können. So stehen für pädiatrische Patienten, die am meisten von dezellularisierten Herzklappenimplantaten profitieren könnten, nur sehr wenige „kleine“ Spenderherzklappen zur Verfügung. Unsere Arbeitsgruppe arbeitet deshalb daran, dezellularisierte xenogene Herzklappen von Schweinen für die Herzchirurgie nutzbar zu machen. Die größte Gefahr bei der Verwendung xenogener Materialien ist die mögliche Abstoßungsreaktion, die durch präformierte Antikörper der Empfänger gegen das xenogene Implantat (Xenoantikörper) vermittelt wird.

Ziel des geförderten Versuchsvorhabens war deshalb die Entwicklung eines Tests, mit dem vor einer geplanten Operation ermittelt werden kann, ob ein Herzklappenersatz, basierend auf einer dezellularisierten xenogenen Herzklappe, vom Immunsystem des potenziellen Empfängers abgestoßen werden würde oder nicht. (Abb. 1)



Abbildung 1: Dezellularisierte Herzklappe (von oben – arterielle Seite)

Um die zu erwartende Immunreaktion eines möglichen Herzklappenempfängers gegen eine spezifische xenogene, dezellularisierte Herzklappe zu untersuchen, wurde ein Dot-blot Verfahren entwickelt, das die Quantifizierung der Bindung präformierter

Antikörper des potenziellen Empfängers an das Implantat erlaubt. Für dieses Verfahren reichen wenige Milligramm der zu testenden dezellularisierten Herzklappen aus. Dieses Probenmaterial wird mit Collagenase verdaut und auf einer Nitrocellulose-Membran fixiert, um dann zu humanen Seren von Probanden exponiert zu werden. Sind passende präformierte Antikörper im Serum vorhanden, binden diese an die jeweiligen Epitope der Herzklappe und können mittels HRP-gekoppelter Sekundärantikörper und ECL (= Enhanced ChemiLuminescence) sichtbar gemacht werden. Die Quantität dieser Antikörper wird mit Hilfe von ImageLab anhand unterschiedlicher Farbtintensitäten visualisiert und kann durch densitometrische Messung numerisch dargestellt werden. (Abb. 2)

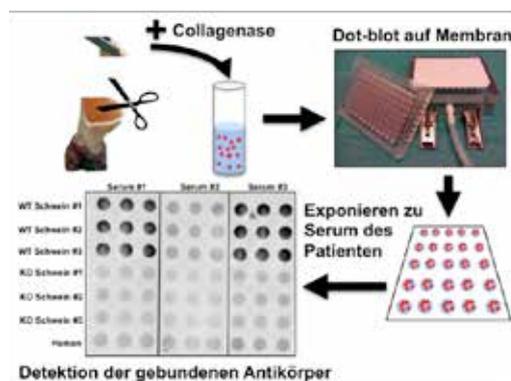


Abbildung 2: Schema und Beispielmembran des entwickelten Dot-blot Verfahrens zur Testung der Bindung präformierter Antikörper des Patienten zu potenziellen dezellularisierten Herzklappenimplantaten.

Um den entwickelten Test zu validieren, wurde die Reaktion humaner Herzklappenmatrices und Matrices von normalen Landrasse-Schweinen und von GGTA1-KO(= α -1,3-Galactosyltransferase-knockout) Schweinen miteinander verglichen, indem sie an Seren von 12 verschiedenen Spendern getestet wurden. Die GGTA1-KO-Schweine sind durch den Verlust des GGTA1-Gens nicht in der Lage, α Gal-Epitope zu bilden. Da die meisten Xenoantikörper gegen das α Gal-Epitop gerichtet sind, sollten dezellularisierte Herzklappen dieser GGTA1-KO-Schweine weniger präformierte Antikörper binden als solche von normalen Landrasse-Schweinen.

Der in diesem Versuchsvorhaben entwickelte Test zeigte die für die Kontrollen erwarteten Ergebnisse. So wurden bei dezellularisierten Herzklappen α Gal-positiver Schweine (WT) Antikörper ausnahmslos stärker gebunden als bei dezellularisierten α Gal-negativen Herzklappen von GGTA1-KO-Schweinen (KO) oder Menschen. **Diese Ergebnisse zeigen, dass dezellularisierte Herzklappen α Gal-positiver Schweine nicht als Implantate für die klinische Anwendung in Frage kommen.** (Abb. 3, siehe Seite 2)

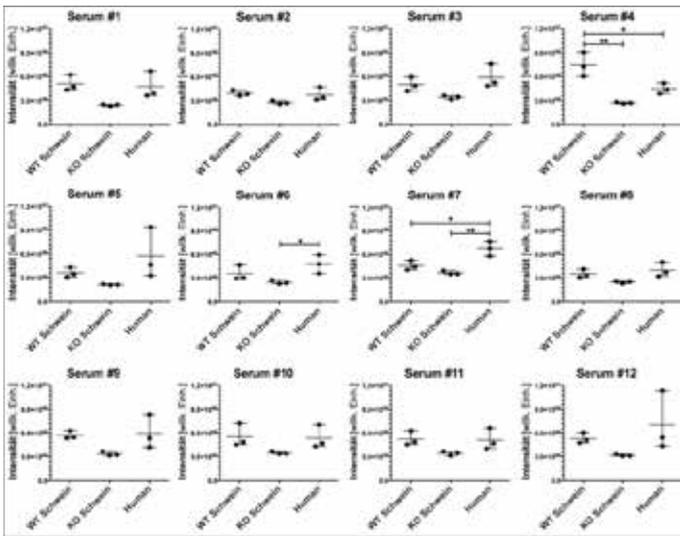


Abbildung 3: Semi-quantitative Analyse der Dot-blot Membranen bezüglich der Bindung humaner Antikörper an dezellularisierte αGal-positive porzine (WT), αGal-negative porzine (KO) und humane (H) Herzklappen.

Unerwartet war jedoch die Beobachtung, dass die dezellularisierten humanen Herzklappen stärkere Signale lieferten als die Implantate von GGTA1-KO-Schweinen. Eine genauere Untersuchung der Proben ergab, dass dieses Signal auf humane Immunglobuline zurückzuführen war, die vom Spender stammen müssen und die trotz der Dezellularisierung und dem intensiven Waschen zum Entfernen der Zelltrümmer in den humanen dezellularisierten Herzklappen zurückblieben. Der sekundäre Antikörper, der spezifisch an humane Immunglobuline bindet, führt nun zu einem Signal, ohne dass die Klappenproben zu humanen Seren exponiert worden wären. Dies führt im Test zu einem falsch-positiven Ergebnis und lässt die Bindung der Serumantikörper zu den humanen Proben stärker erscheinen.

Trotz dieser unerwarteten Resultate zeigten sich sowohl auf der Seite der Implantate als auch auf der Seite der Spender individuelle Unterschiede. So zeigte ein Spender eine sehr starke Reaktion gegen alle αGal-positiven porzinen Implantate, während alle anderen

11 Spender nur marginale Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten. Interessanterweise zeigte auch ein humanes Implantat mit einzelnen Spendern eine sehr starke Reaktion. Die Unterschiede innerhalb der Implantatsgruppen (Variationskoeffizienten) waren dementsprechend für die humanen (30%) und αGal-positiven porzinen (17%) Proben recht hoch. Die genetisch eng miteinander verwandten αGal-negativen (KO) Schweine zeigen hingegen nur einen Variationskoeffizienten von 6,6%. (Abb. 4)

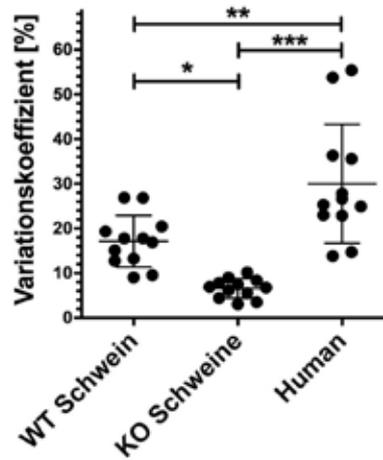


Abbildung 4: Variationskoeffizienten innerhalb der porzinen (WT), αGal-negativen KO und humanen Proben. Die humanen Proben zeigten die größten Unterschiede innerhalb der Gruppe, während die αGal-negative KO (KO) Proben eine sehr homogene Reaktion mit den verschiedenen Seren aufwiesen.

Zusammenfassend konnten wir ein Testverfahren entwickeln, das es erlaubt, vor der Implantation einer dezellularisierten Herzklappe, die Kompatibilität von Empfänger und Implantat bezüglich präformierter Antikörper zu testen. Es erwies sich in einem ersten Versuch alle 12 getesteten humanen Seren als inkompatibel mit dezellularisierten Herzklappen von αGal-positiven Schweinen. Im Gegensatz dazu zeigten die dezellularisierten Herzklappen von αGal-negativen GGTA1-KO-Schweinen eine deutlich höhere Kompatibilität mit allen 12 getesteten Seren. In wieweit dies ausreicht, um dezellularisierte Herzklappen von GGTA1-KO-Schweinen in die klinische Prüfung zu bringen, ist ungewiss und kann nur durch weiterführende Studien in einem geeigneten Großtiermodell getestet werden.

In wieweit dies ausreicht, um dezellularisierte Herzklappen von GGTA1-KO-Schweinen in die klinische Prüfung zu bringen, ist ungewiss und kann nur durch weiterführende Studien in einem geeigneten Großtiermodell getestet werden.

Durchführende Klinik:

Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie, Medizinische Hochschule Hannover

Projektleitung: Dr. Andres Hilfiker

Abteilungsdirektor: Prof. Dr. Axel Haverich

Im Rahmen der Studie wurde u.a. folgende Publikation erstellt:

Ramm R, Niemann H, Petersen B, Haverich A, Hilfiker A. *Decellularized GGTA1-KO pig heart valves do not bind preformed human xenobodies* Basic Res Cardiol. 2016; 111: 1-13

kinderherzen forscht und fördert Forschungsvorhaben im Bereich der Kinderherzmedizin – mit Schwerpunkt Kinderkardiologie und Kinderherzchirurgie – und stellt im „*kinderherzen* Research Report“ Kliniken und Ärzten die Inhalte aktuell laufender sowie Ergebnisse abgeschlossener Projekte vor. Antragstellungen zu Forschungsvorhaben sind jeweils zum 31.03. und 30.09. eines Jahres einzureichen.

Impressum: V.i.S.d.P.: Jörg Gattenlöhner, Geschäftsführer der *kinderherzen* **Text:** Dr. Andres Hilfiker, Dr. Robert Ramm **Mitglieder des Wissenschaftlichen Beirats:** Prof. em. Dr. Hellmut Oelert (Sprecher), Prof. Dr. Dr. Christian Schlensak (stellv. Sprecher), Prof. Dr. Felix Berger, Prof. Dr. Oliver Dewald, Prof. em. Dr. John Hess, Prof. em. Dr. Hans-Carlo Kallfelz, Prof. Dr. Thomas Paul, Prof. Dr. Brigitte Stiller

Spendenkonto: Bank für Sozialwirtschaft
IBAN: DE47 3702 0500 0008 1242 00 | BIC: BFSWDE33XXX

Fördergemeinschaft Deutsche Kinderherzzentren e.V.
Elsa-Brändström-Straße 21 · 53225 Bonn
Tel.: +49 (0) 228 | 42 28 0-0 · Fax: +49 (0) 228 | 35 57 22
Ansprechpartnerin: Tanja Schmitz · tanja.schmitz@kinderherzen.de
www.kinderherzen.de