

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ehemaliger kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

Aktueller Vorstand: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Immunhistochemische Untersuchung von Markern
endothelialer Aktivierung, der Fibrinolyse und Antikoagulation
nach orthotoper Herztransplantation und deren
Korrelation mit Befunden der koronarmorphologischen und
stressechokardiographischen Diagnostik**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Harald Erich Birk

aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Christoph H. Spes

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W.-M. Franz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Thomas M. Behr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2004

*Für meine Familie
und
Connie*

Inhaltsübersicht

		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung der Transplantatvaskulopathie	1
1.2	Diagnostik der Transplantatvaskulopathie	2
1.3	Koronarendothel und Transplantatvaskulopathie	3
2	Zielsetzung	7
3	Methodik	8
3.1	Patientenkollektiv	8
3.2	Immunfluoreszenzdiagnostik	9
3.2.1	Endomyokardbiopsien	9
3.2.2	Kryostatschnitte	9
3.2.3	Immunfluoreszenzfärbung	10
3.2.3.1	Allgemeine Prinzipien immunhistochemischer Färbeverfahren	10
3.2.3.2	Ablauf des Färbeverfahrens	11
3.2.3.2.1	Objekträger	11
3.2.3.2.2	Vorbereitung der Präparate	11
3.2.3.2.3	Antikörper	11
3.2.3.2.4	Anfärbung der Präparate	13
3.2.3.2.5	Kontrollfärbungen	14
3.2.3.2.6	Hämalaun-Eosin-Färbung	14
3.2.3.2.7	Van-Gieson-Färbung	14
3.2.4	Mikroskopische Dokumentation und Auswertung	15
3.2.5	Diagnose von zellulärer Abstoßung	15
3.3	Referenzmethoden	17
3.3.1	Dobutaminbelastungsechokardiographie	17
3.3.1.1	Pharmakologische Grundlagen	17
3.3.1.2	Kardiovaskuläre Wirkungen bei Koronarstenosen	18
3.3.1.3	Protokoll der Belastungsuntersuchung	18
3.3.1.4	Echokardiographie	19
3.3.2	Koronarangiographie	22
3.3.3	Intravaskulärer Ultraschall	22
3.3.4	Definition der TVP nach angiographischen und IVUS-Kriterien	23
3.4	Statistische Methoden	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Patienten	25
4.1.1	Klinische Daten	25
4.1.2	Patienten mit kardialen Ereignissen	27
4.2	Ergebnisse der Referenzuntersuchungen	27
4.2.1	Angiographie und intravaskulärer Ultraschall	27
4.2.2	Belastungsechokardiographie	29
4.3	Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen	31
4.3.1	Quantitative Befundung	31
4.3.2	Anfärbungsintensitäten der einzelnen Antikörper	31

4.3.2.1	ICAM-1	31
4.3.2.1.1	Normalbefunde	31
4.3.2.1.2	Biopsien der transplantierten Patienten	32
4.3.2.2	t-PA	35
4.3.2.2.1	Normalbefunde	35
4.3.2.2.2	Biopsien der transplantierten Patienten	35
4.3.2.3	Fibrin	39
4.3.2.3.1	Normalbefunde	39
4.3.2.3.2	Biopsien der transplantierten Patienten	39
4.3.2.4	AT-III	43
4.3.2.4.1	Normalbefunde	43
4.3.2.4.2	Biopsien der transplantierten Patienten	43
4.3.3	Korrelation der Marker untereinander	47
4.3.4	Korrelation der Immunfluoreszenzergebnisse mit klinische Daten	48
4.3.4.1	Alter der Organspender und Organempfänger	48
4.3.4.2	Posttransplantationszeitraum	49
4.3.4.3	Kardiale Ereignisse	49
4.3.4.4	Zelluläre Abstoßung	50
4.3.5	Korrelation der Immunfluoreszenzergebnisse mit den koronarmorphologischen Untersuchungen	52
4.3.5.1	Angiographie	52
4.3.5.2	Intravaskulärer Ultraschall	53
4.3.5.3	Dobutaminbelastungsechokardiographie	55
5	Diskussion	64
5.1	Stellenwert von Endomyokardbiopsien nach Herztransplantation	64
5.2	Referenzuntersuchungen	64
5.3	Immunfluoreszenz	66
5.3.1	ICAM-1	66
5.3.1.1	Färbeergebnisse und Zusammenhang mit klinischen Daten	66
5.3.1.2	Zusammenhang mit den koronarmorphologischen Untersuchungen	67
5.3.1.3	Zusammenhang mit der Stressechokardiographie	68
5.3.2	t-PA, Fibrin und AT-III als Marker der lokalen Blutgerinnung, Fibrinolyse und Antikoagulation	69
5.3.2.1	Färbeergebnisse und Zusammenhang mit klinischen Daten	69
5.3.2.2	Zusammenhang mit den koronarmorphologischen Untersuchungen	72
5.3.2.3	Zusammenhang mit der Stressechokardiographie	73
5.4	Kritische Interpretation der gefundenen Zusammenhänge, Limitationen	74
6	Zusammenfassung und Ausblick	76
6.1	Zusammenfassung des Themas und der wesentlichen Ergebnisse	76
6.2	Ausblick	78
7	Anhang	79
7.1	Abkürzungsverzeichnis	79
7.2	Literaturverzeichnis	80
	Danksagung	97
	Lebenslauf	98

1 Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen stehen heute in der Todesursachenstatistik von Industrieländern eindeutig an erster Stelle. Klinisch tätige Ärzte in Praxis und Krankenhaus sehen sich einer stetig wachsenden Zahl an Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz gegenüber. Für einen Teil dieser Patienten ist nur die orthotope Herztransplantation (HTX) eine echte Therapieoption. Bisher wurden weltweit über 60000 Herzen transplantiert (41).

Die Überlebensraten konnten seit den ersten Transplantationen Ende der sechziger Jahre deutlich verbessert werden, nicht zuletzt aufgrund der Weiterentwicklung immunsuppressiver Therapieschemata (9). Besonders die Einführung von Cyclosporin in den frühen achtziger Jahren hatte eine wesentliche Verbesserung der Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen zur Folge (55). Gerade aber die Notwendigkeit lebenslanger Immunsuppression mit ihren typischen Nebenwirkungen wie erhöhte Infektanfälligkeit, irreversible Nierenschädigung und Begünstigung von Malignomentstehung bedeutet für die Patienten auch eine erhebliche Einschränkung ihrer Lebensqualität.

1.1 Bedeutung der Transplantatvaskulopathie

Eine wesentliche Mortalitätsursache unter der wachsenden Zahl der Langzeitüberlebenden nach HTX ist die Transplantatvaskulopathie (TVP), eine panvaskuläre und oft schnell voranschreitende Form einer koronaren Herzerkrankung (35). Beinahe alle Patienten, die fünf Jahre nach ihrer Herztransplantation noch am Leben sind, weisen bei der histopathologischen Untersuchung von Endomyokardbiopsien Merkmale der Transplantatvaskulopathie auf (101). Histologisch zeigt sich bei der TVP eine diffuse, konzentrische Intimahyperplasie, die nicht nur die Koronararterien, sondern auch Arteriolen, Kapillaren und Venen betrifft (106). Der Befall des koronaren Gefäßsystems ist dabei oft inhomogen: Der Befall kleiner myokardialer Gefäße muß nicht mit Veränderungen von epikardialen Gefäßen verbunden sein (18), und auch die Veränderungen großer Koronararterien sind oftmals diskontinuierlich (49).

Sehr ähnliche Gefäßveränderungen finden sich auch in anderen transplantierten Organen, in der Niere sogar mit fast gleicher Häufigkeit wie bei Transplantatherzen (73). Die Pathogenese der TVP ist keineswegs vollständig geklärt; sowohl immunologische Faktoren, wie Inkompatibilitäten im HLA-System und humorale Abstoßung (72), als auch nicht-

immunologische Ursachen konnten bereits identifiziert werden, darunter klassische vaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie und Hyperlipidämie (36), aber auch die Infektion mit dem Cytomegalievirus (29,104). Eine wesentliche Rolle soll die initiale Schädigung des Transplantats durch Ischämie und Reperfusion während des Transplantationsverfahrens spielen (56, 95). So ist die Dickenzunahme der Gefäßintima während des ersten Jahres nach der Transplantation auch am ausgeprägtesten (35); bei Überschreitung einer Intimadicke von 0.3 mm kommt es in den folgenden Jahren zu einer signifikanten Zunahme von kardial bedingten Todesfällen und Retransplantationen (78).

Die Therapieoptionen bei einer schweren TVP sind sehr begrenzt; sowohl die koronare Bypass-Chirurgie als auch die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) zeigen unbefriedigende Langzeitergebnisse (39). So bleibt häufig nur die Retransplantation, die jedoch im Vergleich zur Primärtransplantation mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität behaftet ist (28, 91).

1.2 Diagnostik der Transplantatvaskulopathie

Die klinische Diagnose einer TVP ist aufgrund der Denervation des transplantierten Herzens deutlich erschwert, da das wesentliche Frühsymptom der Koronarischämie, die Angina pectoris, fehlt. Daher wird die TVP oft erst durch kardiales Pumpversagen, ventrikuläre Arrhythmien oder den plötzlichen Herztod klinisch auffällig. Dies unterstreicht die Notwendigkeit regelmäßiger Kontrolluntersuchungen der Koronargefäße (47). Neben routinemäßig durchgeführten jährlichen Koronarangiographien findet hierzu in vielen Zentren zunehmend die intravaskuläre Ultraschalluntersuchung (IVUS) Verwendung, bei der im Rahmen einer Linksherzkatheterisierung die Hauptäste der Koronararterien mit einer Ultraschallsonde morphologisch beurteilt werden können. Dieses Verfahren ist hinsichtlich der Erkennung einer TVP deutlich sensitiver als die Koronarangiographie (94).

Beim Versuch, nichtinvasive Methoden zur Diagnose der TVP in die Klinik einzuführen, zeigte sich, dass neben nuklearmedizinischen Untersuchungen wie dem Thallium-201-SPECT auch regelmäßige Ruheechokardiographieuntersuchungen aufgrund ihrer geringen Sensitivität wenig geeignet sind (86). Die Aussagekraft der Ultraschalluntersuchung des Herzens hinsichtlich der Erkennung ischämischer Myokardareale ist jedoch deutlich erhöht, wenn die Untersuchung während körperlicher Belastung durchgeführt wird (81, 83). Neben Ergometer

und Laufband stehen hierfür auch pharmakologische Methoden zur Verfügung. Im Vergleich mit anderen Substanzen hat sich das synthetische Katecholaminderivat Dobutamin am geeignetsten erwiesen (100). In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Belastungsechokardiographie mit Dobutamin funktionell relevante Koronarstenosen bei der koronaren Herzerkrankung nicht nur mit hoher Spezifität, sondern, im Gegensatz zur Angiographie, auch mit hoher Sensitivität nachweisen kann (5, 42, 70). Die Belastungsuntersuchung mittels Ergometer ist bei Transplantationspatienten durch den unzureichenden Herzfrequenzanstieg und die muskuläre Schwäche infolge häufiger Steroideinnahme deutlich limitiert (19, 69). Auch bei diesen Patienten konnte eine hohe Sensitivität der Stressechokardiographie hinsichtlich der Erkennung einer TVP gefunden werden (25, 88). Dabei fiel allerdings auf, dass Wandbewegungsstörungen auch bei einigen Patienten nachweisbar waren, die Normalbefunde in der Angiographie und im IVUS aufwiesen (1, 90). Als ursächlich hierfür werden insbesondere Beeinträchtigungen der koronaren Mikrozirkulation durch Störungen von Endothelzellfunktionen diskutiert, die koronarmorphologischen Veränderungen oftmals vorausgehen (101, 109).

1.3 Koronarendothel und Transplantatvaskulopathie

Die Endothelzelle steht im Mittelpunkt zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Prozesse. Besonders hervorzuheben ist ihre Rolle bei Entzündungsvorgängen, Abstoßungsreaktionen, der Blutgerinnung und bei der Regulierung des Gefäßtonus. Längst überholt ist die Vorstellung einer rein passiven Barrierefunktion.

So kommt es am Endothel zu zahlreichen Interaktionen zwischen Endothelzellen und anderen Zellsystemen, wie z.B. Leukozyten und Thrombozyten, die von sogenannten Adhäsionsmolekülen vermittelt werden. Insbesondere bei biologischen Phänomenen wie Embryogenese, Zelldifferenzierung, bei Entzündungsvorgängen und Transplantatabstoßung spielt diese biochemisch sehr heterogene Gruppe von membranständigen Molekülen eine wichtige Rolle (34, 93). Beim lokalen Entzündungsprozeß, bedingt durch Trauma oder Infektion, exprimiert die Endothelzelle unter Vermittlung von Zytokinen Adhäsionsmoleküle wie die P-Selektine, das endotheliale Leukozytenadhäsionsmolekül (ELAM), oder das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) (16, 93). Die Expression dieser Moleküle erleichtert die lockere Anheftung vorbeiziehender Leukozyten, deren feste Adhäsion und

schließlich die Migration in das Gewebe (93). Beim Abstoßungsprozeß nach Organtransplantation, der letztlich auch ein Entzündungsgeschehen darstellt (68), unterstützen die Adhäsionsmoleküle die unspezifische Bindung zirkulierender Lymphozyten an das Endothel. Hierdurch werden spezifische Interaktionen zwischen T-Zell-Rezeptoren und endothelständigen Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) ermöglicht, die letztendlich die Proliferation von T-Zellen und deren Auswandern in das umliegende Gewebe mit einer entsprechenden Entzündungsreaktion zur Folge haben (74). Eine vermehrte Expression von ICAM-1 auf koronaren Arterien und Arteriolen im Transplantatherzen wird in Zusammenhang mit der Entwicklung einer TVP gebracht (57).

Eine weitere wesentliche Hauptfunktion des Endothels ist die Steuerung des Gefäßtonus durch die Freisetzung vasokonstringierender und vasodilatierender Substanzen wie zum Beispiel dem Stickstoffmonoxid, oftmals auch als „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet (14, 109). Sowohl bei der koronaren Herzkrankheit des nicht-transplantierten Herzens als auch bei der Transplantatvaskulopathie konnte eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer Verminderung der endothel-abhängigen Gefäßdilatation und einer erhöhten vaskulären Kontraktilität beobachtet werden (32, 50, 65), in vielen Fällen schon vor dem sensitiven Nachweis von Intimaverdickungen mittels intracoronarem Ultraschall. Ein direkter Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion epikardialer Gefäße und Gefäßen der koronaren Mikrozirkulation scheint nicht zu bestehen (18, 44). Es bestehen starke Hinweise darauf, dass der Nachweis einer Endotheldysfunktion in der Frühphase nach HTX mit einem erhöhten Risiko für die spätere Entwicklung einer TVP verbunden ist (21). Endotheliale Dysfunktion kann sich aber im Laufe von vielen Jahren nach HTX auch wieder zurückbilden (4).

Eng verknüpft mit seiner Rolle bei den oben genannten immunologischen und vasomotorischen Vorgängen hat das Endothel entscheidende Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des Hämostasegleichgewichtes in der koronaren Mikrozirkulation (93). Endothelzellen produzieren sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren der Thrombozytenaggregation, der plasmatischen Blutgerinnung und der Fibrinolyse. Die folgende Tabelle zeigt eine Aufstellung der wesentlichen antithrombogenen und prothrombogenen Substanzen, die am Endothel zusammenwirken:

Tabelle 1: Endothel-assoziierte antithrombogene und prothrombogene Substanzen

Antithrombogen	Prothrombogen
-Prostazyklin	-Gewebsthromboplasmin
-EDRF (endothelium derived relaxing factor = Stickoxid)	-Plättchenaktivierender Faktor (PAF)
-t-PA (Geweb plasminogen-aktivator)	-Faktor V
-Antithrombin-III	-Faktor VIII
-Thrombomodulin	-Faktor IX-Rezeptor
-Protein S	-Faktor X-Rezeptor
	-PAI (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor)

Dieses labile Gleichgewicht, bei dem unter physiologischen Bedingungen die antithrombogene Aktivität des Endothels überwiegt, kann sich im Rahmen zahlreicher pathologischer Zustände zugunsten der prothrombogenen Funktionen verändern. So ist z.B. bei Patienten mit instabiler Angina pectoris eine Aktivitätsabnahme des Geweb plasminogen-aktivators ein Hinweis auf drohende Infarzierung (43).

Im Hinblick auf die Transplantatvaskulopathie ist besonders die Rolle des Geweb plasminogenaktivators (t-PA) und von Antithrombin-III hervorzuheben. T-PA ist der entscheidende Aktivator von Plasmin und damit der Fibrinolyse in Blutgefäßen; Hauptsyntheseorte sind endotheliale Zellen und vaskuläre glatte Muskelzellen (51, 53, 62, 66); die Halbwertszeit im Blut beträgt infolge schneller hepatischer Elimination lediglich ca. fünf Minuten (64).

Antithrombin-III ist ein von der Leber produziertes, ubiquitäres Plasmaprotein, das über Heparansulfat-Proteoglykane an endotheliale Plasmamembranen und glatte Gefäßmuskelzellen gebunden wird und von hier aus aktivierte Gerinnungsfaktoren des endogenen und exogenen Systems hemmt und die Aktivierung und Wirkung von Thrombin vermindert (23, 79).

Sowohl eine Abnahme des arteriolen t-PA im Koronargefäßsystem transplanteder Herzen als auch Veränderungen im mikrovaskulären Verteilungsmuster von AT-III kurze Zeit nach HTX scheinen mit einer deutlich früheren Entwicklung einer TVP assoziiert zu sein (61).

Auch vermehrte Ablagerungen von Fibrin in der koronaren Mikrozirkulation werden als Risikofaktor für eine spätere TVP diskutiert (31, 56).

2. Zielsetzung

In vorausgehenden Untersuchungen fanden sich Hinweise darauf, dass die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie nach HTX mit endothelialer Aktivierung und Störungen der lokalen Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systeme im transplantierten Herzen zusammenhängt.

In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden,

- ob und in welchem Ausmaß Marker endothelialer Aktivierung, der Fibrinolyse und Antikoagulation bei Patienten in der Spätphase nach HTX verändert sind.
Hierzu wurden, im Rahmen der routinemäßigen Abstoßungsdiagnostik entnommene, Endomyokardbiopsien mit den Methoden der Immunfluoreszenz untersucht.
- ob Zusammenhänge der ermittelten Immunfluoreszenzerggebnisse mit zeitnah erhobenen Befunden der funktionellen kardiologischen Diagnostik (Dobutaminbelastungsechokardiographie) und dem morphologischen Nachweis einer Transplantatvaskulopathie in der Koronarangiographie bzw. im intravaskulären Ultraschall bestehen und
- ob routinemäßig zur Abstoßungsdiagnostik nach HTX entnommene Herzmuskelbiopsien auch zusätzliche Informationen über ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer TVP liefern können.

3 Methodik

3.1 Patientenkollektiv

69 Patienten aus dem Routine-Nachsorgekollektiv unserer Klinik wurden in die Studie eingeschlossen. Die Routine-Nachsorge umfasste neben den Endomyokardbiopsien stressechokardiographische und koronarmorphologische Untersuchungen (Angiographie und ggf. zusätzlich IVUS) zur Diagnose einer TVP. Diese wurden innerhalb weniger Tage vor oder nach der Biopsie durchgeführt.

Die Biopsieentnahmen fanden im Zeitraum zwischen Juni 1993 und März 1998 statt. Zusätzlich zu den für die Routine-Abstoßungsdiagnostik benötigten 4 Biopsien wurden für die Immunfluoreszenzdiagnostik 1-2 weitere Proben pro Patient entnommen. Hierfür lag ein von der Ethikkommission der LMU-München befürworteter Ethikantrag vor. Alle Patienten hatten, nach vorangegangener Aufklärung über Ablauf und Risiken, ihre Zustimmung zur Studienteilnahme gegeben.

Die klinische Nachbeobachtung endete im Oktober 1998.

Gemäß den Standards der American Heart Association für die Durchführung von Belastungsuntersuchungen (33) wurden Patienten mit akutem Myokardinfarkt, akuten Angina pectoris-Beschwerden, bekannter Stenose des Hauptstammes der linken Koronararterie, höhergradiger Aortenstenose, akuter Peri- oder Myokarditis, komplexen Rhythmusstörungen in Ruhe, schwerem Linksherzversagen, oder einer akuten nichtkardialen Systemerkrankung von der stressechokardiographischen Untersuchung und damit von der Studie ausgeschlossen. Weiterhin wurden jene Patienten nicht berücksichtigt, die in der Endomyokardbiopsie eine akute zelluläre Transplantatabstoßung > Grad 1B nach ISHLT (s.Tabelle 2) aufwiesen, da bei einer mittelschweren oder schweren Abstoßungsreaktion signifikante Veränderungen echokardiographischer Parameter auftreten (8, 17).

Kam es im Beobachtungszeitraum zu TVP-bedingten Komplikationen (Notwendigkeit einer PTCA, dekompensierte Herzinsuffizienz, kardial bedingter Tod, Notwendigkeit der Retransplantation), so wurde dies als kardiales Ereignis gewertet.

Als Normalbefunde wurden Endomyokardbiopsien von zwei Patientinnen mitgefärbt, die im Jahr 1995 im Alter von 26 bzw. 39 Jahren bei einem Verkehrsunfall starben. Die Gewebeentnahme erfolgte jeweils einen Tag post mortem; die pathologische Untersuchung

des Herzmuskels erbrachte keinen Anhalt für eine organische Herzerkrankung , anamnestisch war bei beiden Frauen keine Herzerkrankung bekannt.

3.2 Immunfluoreszenzdiagnostik

3.2.1 Endomyokardbiopsien

Im Rahmen der routinemäßigen rechtsventrikulären Biopsierung zur histologischen Verlaufskontrolle von Abstoßungsreaktionen wurden von den 69 Patienten zusätzliche Endomyokardbiopsien für die Immunfluoreszenzdiagnostik entnommen. Bei bereits schon häufiger biopsierten Patienten wurde darauf geachtet , alte Entnahmestellen zu vermeiden, da Narbengewebe für eine Beurteilung völlig ungeeignet ist. Sofort nach der Entnahme wurden die Biopsien in einer Küvette asserviert und diese in flüssigen Stickstoff gegeben. Unmittelbar hierauf erfolgte die Aufbringung der Biopsien auf Korkscheiben und die Einbettung in Tissue-Tek-OCT-Compound-Einbettmedium (Miles Inc., USA). Die Biopsien wurden bis zur Weiterbearbeitung im Labor bei -80°C gelagert.

3.2.2 Kryostatschnitte

Bei -20°C wurden in einem Kryostaten Serienschritte von $6\mu\text{m}$ Dicke angefertigt. Diese wurden auf, mit Chromalaungelatine beschichtete, Objektträger aufgebracht. Während des Schneideverfahrens wurden die Gewebsschnitte laufend lichtmikroskopisch kontrolliert und bei zu geringer Gewebsfläche ($< 0.25\text{mm}^2$) oder zu hohem Bindegewebsanteil verworfen, da hier eine ausreichende Beurteilbarkeit nicht mehr gewährleistet ist (12). Schnitte, die nicht sofort weiterverarbeitet werden konnten, wurden unverzüglich bei -80°C eingefroren.

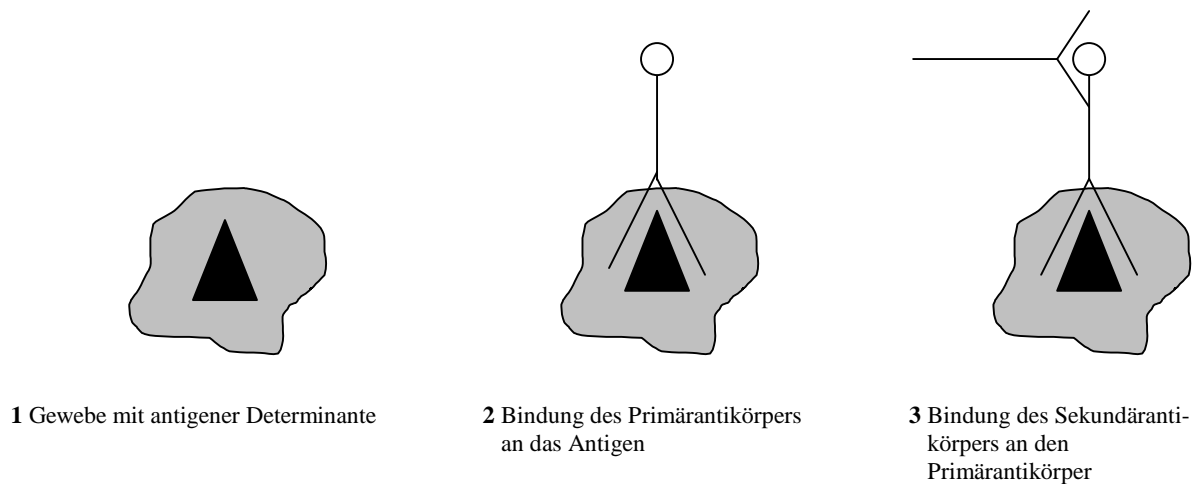
3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

3.2.3.1 Allgemeine Prinzipien immunhistochemischer Färbemethoden

Ziele immunhistochemischer Techniken sind Nachweis und Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten durch spezifische Antikörper, die durch Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, partikuläres Material (z.B. Goldpartikel, Erythrozyten), oder Isotope markiert sind (11). Entscheidende Voraussetzungen für die Verwertbarkeit der Untersuchungen sind die Spezifität der verwendeten Antikörper und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Determinanten.

Bei der Methode der indirekten Immunfluoreszenz wird der an das Gewebsantigen gebundene, nicht selbst fluorochromierte Primärantikörper über einen fluorochromierten, gegen den primären Antikörper gerichteten Sekundärantikörper nachgewiesen. Vorteil dieser Methode ist ihre hohe Sensitivität, die allerdings wegen der Verdopplung der Antikörpersysteme auch mit einer größeren Gefahr unspezifischer Reaktionen einhergeht (11).

Abbildung 1: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung



3.2.3.2 Ablauf des Färbeverfahrens

3.2.3.2.1 Objektträger

Um eine optimale Haftung der Präparate zu erzielen, wurden gereinigte Objektträger vorab mit Chromalaungelatine beschichtet.

3.2.3.2.2 Vorbereitung der Präparate

Tiefgekühlte Schnitte wurden langsam auf Raumtemperatur erwärmt, um eine Schädigung des Gewebes während des Auftauvorgangs zu vermeiden; unmittelbar darauf erfolgte eine zehnmünütige Fixierung in reinem Aceton.

3.2.3.2.3 Antikörper

Für die Immunhistochemie wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet:

Primärantikörper

ICAM-1

Immunglobulinklasse: IgG 1

Klon: 15.2 (Maus)

Spezifität: Der Antikörper erkennt spezifisch das ICAM-1/CD54-Antigen auf einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen.

Quelle: Boehringer-Mannheim, Deutschland

Verdünnung: 1:25

t-PA

Immunglobulinklasse: IgG 1

Klon: ESP 4 (Maus)

Spezifität: Der Antikörper erkennt spezifisch zellständiges t-PA.

Quelle: American Diagnostica, Greenwich, USA

Verdünnung: 1:10

Fibrin

Immunglobulinklasse: IgG 1

Klon: ADI #350 (Maus)

Spezifität: Der Antikörper bindet spezifisch an die β -Kette im Fibrinogenmolekül;
reagiert schwach mit humanem Fibrinogen, aber stark mit humanem Fibrin.

Quelle: American Diagnostica, Greenwich, USA

Verdünnung: 1:20

AT-III

Immunglobulinklasse: IgG 1, polyklonal (Kaninchen)

Spezifität: Der Antikörper erkennt ungebundenes AT-III und AT-III-Protease-
Komplexe

Quelle: DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Deutschland

Verdünnung: 1:300

*Sekundärantikörper:***Anti-Maus-Antikörper vom Kaninchen**

Immunglobulinklasse: IgG, konjugiert mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC),
polyklonal

Spezifität: Der Antikörper bindet an Maus-Immunglobuline aller Klassen; geringe
Kreuzreaktivität mit Immunglobulinen anderer Spezies.

Quelle: DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Deutschland

Verdünnung: 1:50

Anti-Kaninchen-Antikörper vom Schwein

Immunglobulinklasse: IgG, konjugiert mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC),
polyklonal

Spezifität: Der Antikörper bindet an Kaninchen-Immunglobuline aller Klassen; fast
keine Kreuzreaktivität mit menschlichen Immunglobulinen.

Quelle: DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Deutschland

Verdünnung: 1:50

Die einzelnen Antikörper wurden mit 2%igem bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnt, das in isotonem TRIS-HCL-Puffer (0.05 molar, pH 7.4) aufgelöst wurde.

3.2.3.2.4 Anfärbung der Präparate

Die Objektträger wurden jeweils zehn Minuten lang mit 100µl 2%igem bovinem Serumalbumin vorinkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen abzusättigen, die besonders in den Randgebieten der Gewebsschnitte die Erkennbarkeit spezifischer Anfärbung erheblich beeinträchtigen können.

Nach vorsichtigem Abklopfen der Vorinkubationslösung wurden die Gewebsschnitte unter der Verwendung einer Eppendorf-Pipette mit je 100µl der entsprechenden verdünnten Primärantikörperlösung beträufelt. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten in einer feuchten Kammer unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur.

Hierauf wurden die Objektträger zur Entfernung der Primärantikörperlösung mit Tris-Puffer gespült und um die Gewebsschnitte herum behutsam mit Saugpapier abgetrocknet, um eine unerwünschte weitere Verdünnung des Sekundärantikörpers zu vermeiden.

Je 100µl des entsprechenden Sekundärantikörpers wurden nun aufgebracht und die Präparate wieder 60 Minuten, wie oben dargestellt, inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Objektträger nochmals mit Tris-Puffer gespült, abgetrocknet und mit einem Tropfen Eindeckmedium (“Aqueous Mounting Medium Permaflour”) versehen.

Sofern die Präparate nicht sofort fotografiert werden konnten, wurden sie unter Lichtabschluß im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.2.3.2.5 Kontrollfärbungen

Von jeder Biopsie wurden zwei Negativkontrollen mitgefärbt; zu diesem Zweck wurden die Objektträger mit 2%igem BSA ohne Zugabe eines Primärantikörpers inkubiert und jeweils mit Maus- oder Kaninchen-Sekundärantikörpern behandelt. Alle übrigen Färbeschritte blieben unverändert.

Um die Färbeergebnisse mit gesundem, nicht transplantiertem Herzmuskelgewebe vergleichen zu können, wurden bei jeder Färbung Herzmuskelschnitte zweier Patientinnen (27 und 39 Jahre alt) mitgefärbt, die im Jahr 1995 jeweils bei einem Verkehrsunfall getötet worden waren; beide wiesen keine kardialen Vorerkrankungen auf. Zur besseren Dokumentation der histologischen Qualität der einzelnen Präparate, v.a. im Hinblick auf ihren Bindegewebsanteil und etwaige Zellinfiltrate, wurden jeweils eine Hämalaun-Eosin- und eine van Gieson-Färbung nach folgendem Schema angefertigt (11):

3.2.3.2.6 Hämalaun-Eosin-Färbung

- 5 Minuten Fixierung in 5%igem Formalin
- 5 Minuten Wässern in destilliertem Wasser
- 3-8 Minuten einlegen in saurer Hämalaunlösung (Kernfärbung)
- Spülen mit destilliertem Wasser
- 10 Minuten bläuen unter fließendem Leitungswasser
- 5-10 Minuten färben in Eosinlösung
- 3 Minuten Spülen mit destilliertem Wasser
- Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe: 70%, 96%, dreimal absoluter Alkohol, abschließend Xylol
- Eindecken der Präparate mit Eukitt (schnell härtendes Eindeckmedium für mikroskopische Präparate)

3.2.3.2.7 Van Gieson-Färbung

- 5 Minuten Fixierung in 5%igem Formalin
- 5 Minuten Wässern in Leitungswasser
- 2 Minuten färben in Fe-Hämatoxylin nach Weigert
- 5 Minuten bläuen unter fließendem Leitungswasser
- Abtrocknen mit Filterpapier
- 1 Minute einlegen in Picrofuchsin

- Abschleudern der Farblösung und Abtrocknen mit Filterpapier
- Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe wie bei der Hämalaun-Eosin-Färbung
- Eindecken der Präparate mit Eukitt

3.2.4 Mikroskopische Dokumentation und Auswertung

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma LEICA (LEICA-Laborlux D) verwendet. Von jedem gefärbten Biopsieschnitt und den entsprechenden Kontrollpräparaten wurden in zwei Vergrößerungen (100/400-fach) mindestens je eine Diafotographie erstellt.

Bei der Bewertung der Färbeergebnisse wurde mittels Dia-Doppelprojektion (Verwendung zweier Diaprojektoren mit gleicher Lichtstärke und Einhaltung gleichen Projektionsabstands) die Biopsie mit der Negativkontrolle und dem Normalbefund verglichen; die Intensität der spezifischen Anfärbung bewerteten zwei unabhängige Betrachter mit einer Zahl zwischen 0 und 3 (Skalenabstand 0.5, "0" bedeutet "keine spezifische Anfärbung", "3" bedeutet "sehr starke spezifische Anfärbung").

3.2.5 Diagnose von zellulärer Abstoßung

Die histologische Diagnostik der Endomyokardbiopsien zur Beurteilung zellulärer Abstoßungsreaktionen wurde am Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Zur Graduierung fand die überarbeitete Nomenklatur nach ISHLT (10) Verwendung.

Tabelle 2: Graduierung zellulärer Abstoßung nach ISHLT (nach (10))

Abstoßungsgrad			Histologisches Korrelat
0	→	→	kein zelluläres Infiltrat
1a	→	→	fokales Infiltrat (interstitiell oder perivaskulär), ohne Nekrose
1b	→	→	diffuse, spärliche Infiltrate, ohne Nekrose
2	→	→	singulärer Fokus mit aggressiver Infiltration, evtl. mit fokaler Myozytenschädigung
3a	→	→	multifokale, aggressive Infiltrate, evtl. mit Myozytenschädigung
3b	→	→	diffuse Entzündung mit Nekrosen
4	→	→	diffuse, aggressive Infiltrate mit Nekrosebildung, evtl. mit Ödem und /oder Einblutung

3.3 Referenzmethoden

3.3.1 Dobutaminbelastungsechokardiographie

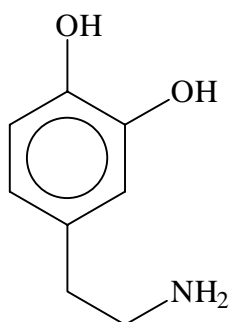
3.3.1.1 Pharmakologische Grundlagen

Dobutamin ist ein synthetisches Katecholaminderivat (Strukturformel s. Abb.2), das 1978 erstmals klinisch angewendet wurde. Hauptindikation ist die Akuttherapie eines kardialen Pumpversagens (67).

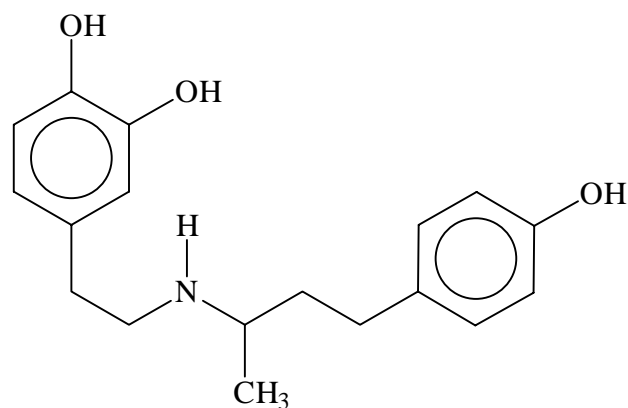
Bei nur geringer Beeinflussung sympathischer α -Rezeptoren stimuliert Dobutamin vor allem β_1 -, in etwas geringerem Ausmaß auch β_2 -Rezeptoren. Am Herz folgt daraus eine positiv inotrope, chronotrope und dromotrope Wirkung, darüberhinaus ein dilatativer Effekt auf das Bronchialsystem und periphere Arterien (52). Die Plasmahalbwertszeit von Dobutamin beträgt nur zwei Minuten (87), da die Substanz einer schnellen Methylierung durch die O-Methyltransferase unterliegt (55). Dies hat eine gute Steuerbarkeit der Wirkung zur Folge.

Abbildung 2: Strukturformeln von Dopamin und Dobutamin

Dopamin



Dobutamin



3.3.1.2 Kardiovaskuläre Wirkungen bei Koronarstenosen

Die Kontraktilitätszunahme verursacht eine Zunahme des myokardialen Sauerstoffverbrauchs (99); dementsprechend steigt allerdings auch der koronare Blutfluß (54), im niedrigen Dosisbereich ($<20\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) nicht nur in normal weiten, sondern auch in stenosierten Koronargefäßen (107). Eine 70-prozentige Koronarstenose ist in der Regel bereits mit einer Abnahme des maximalen koronaren Blutflusses unter Belastung verbunden (76). Kann bei steigender Herzfrequenz der gesteigerte myokardiale Sauerstoffverbrauch aufgrund der Lumeneinengung nicht mehr kompensiert werden, kommt es zum Ablauf einer „Ischämiekaskade“: Zuerst treten Inhomogenitäten der Myokardperfusion auf, gefolgt von Veränderungen im Zellstoffwechsel; im weiteren Verlauf zeigen sich diastolische und systolische Pumpfunktionsstörungen, EKG-Veränderungen und Angina pectoris-Beschwerden. Im hohen Dosisbereich führt Dobutamin zu einer Erniedrigung des totalen peripheren Widerstands (55), da die β_2 -vermittelte Dilatation kleiner Arteriolen durch die gleichzeitige Aktivierung von α_1 -Rezeptoren in den Gefäßen nicht kompensiert wird. Der hierdurch hervorgerufene Abfall des diastolischen Blutdrucks hat eine Abnahme des myokardialen Perfusionsdrucks zur Folge, der sich aus der Differenz zwischen diastolischem Blutdruck und linksventrikulärem Füllungsdruck errechnet. Daraus resultiert eine weitere Reduktion der Durchblutung von, aufgrund stenosierter Koronargefäße, minderperfundierten Myokardarealen. Die beschriebenen Effekte tragen letztendlich zur Induktion einer myokardialen Ischämie im Versorgungsbereich verengter Herzkranzgefäße bei, die echokardiographisch als Wandbewegungsstörung, herabgesetzte Verkürzungsfraction oder verminderte systolische Wanddickenänderung sichtbar wird (70, 100).

3.3.1.3 Protokoll der Belastungsuntersuchung

Die Patienten erhielten eine kontinuierliche Dobutamininfusion über einen peripher-venösen Zugang. Zur Einstellung der jeweils erforderlichen Infusionsrate wurde ein Perfusor der Firma B. Braun Melsungen AG (Typ 081702/8) verwendet. Die Startdosis betrug $5\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg KG}$ (Körpergewicht). Alle fünf Minuten erfolgte eine Dosissteigerung um weitere $5\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg KG}$. Bei Erreichen der Maximaldosis ($40\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg KG}$) oder der submaximalen Belastungsherzfrequenz ($((220-\text{Lebensjahre}) \times 0.85)$) wurde die Belastung beendet. Weitere Abbruchkriterien, die für den Nachweis einer Ischämie sprechen oder auf eine Gefährdung des Patienten hindeuten, sind in Tabelle 3 aufgeführt (siehe auch (33)).

Tabelle 3 : Abbruchkriterien der Dobutaminbelastungsuntersuchung

-
- Erreichen der maximalen Dobutamindosis
 - Erreichen der maximalen Belastungsherzfrequenz
 - Abfall des systolischen Blutdrucks unter den Ruhewert
 - Abfall des diastolischen Blutdrucks unter 40 mmHg
 - kein weiterer Anstieg der Herzfrequenz über zwei Belastungsstufen
 - deutliches subjektives Unwohlsein und Wunsch des Patienten
 - Neuauftreten oder Zunahme von Angina pectoris-Beschwerden
 - komplexe ventrikuläre Arrhythmien, anhaltende supraventrikuläre Extrasystolie
 - ischämietypische ST-Senkung $> 1.5\text{mm}$ oder ST-Hebung $> 1\text{ mm}$ im EKG
 - Blutdruckanstieg $> 110\text{ mmHg}$ diastolisch oder $> 200\text{ mmHg}$ systolisch
 - Abfall der Herzfrequenz unter Belastung
 - Auftreten regionaler oder globaler Kontraktionsstörungen
 - Zeichen peripherer Minderperfusion (Blässe, Zyanose)
 - ZNS-Symptome (Schwindel, Präsynkope)
 - schwere Dyspnoe
 - technische Probleme
-

3.3.1.4 Echokardiographie

Für die Untersuchungen wurde ein Ultraschallgerät Typ HP SONOS 1500 der Firma Hewlett Packard Deutschland, Böblingen, verwendet. In der Regel kam ein 3.5 MHz-phased-array-Schallkopf zur Anwendung, bei reduzierter Darstellbarkeit wurde auf einen Schallkopf mit einer Schallfrequenz von 2.5 MHz ausgewichen. Der gesamte Untersuchungsverlauf wurde auf SVHS-Videokassetten aufgezeichnet. Die Patienten befanden sich während des gesamten Untersuchungsablaufs in Linksseitenlage. Hierdurch konnten alle echokardiographischen Aufzeichnungen während der Belastung von den gleichen Schallkopfpositionen in Ruhe und in Echtzeit vorgenommen werden. Alle Untersuchungen wurden von demselben erfahrenen Kardiologen durchgeführt und von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet.

Zur Quantifizierung von linksventrikulären Wanddicken und Wanddickenänderungen sowie des Ventrikeldurchmessers und der Verkürzungsfraction wurde die M-Mode-Echokardiographie verwendet. Zum Erhalt einer M-Mode-Schnittebene wurde, ausgehend von einer linksparasternalen Schallkopfposition im dritten oder vierten Interkostalraum, ein zweidimensionales Längsschnittbild (PLA) dargestellt. Die Untersuchungsebene wurde anhand der mitaufgezeichneten Anteile der Mitralsegel definiert und unter visueller Kontrolle des zweidimensionalen Bildes beibehalten.

Aus den M-Mode-Registrierungen in Ruhe, zu jeder Belastungsstufe und nach Belastung wurden folgende Parameter bestimmt:

- IVSes endsystolische Dicke des interventrikulären Septums in mm
- IVSed enddiastolische Dicke des interventrikulären Septums in mm
- LHWes endsystolische Dicke der linksventrikulären Hinterwand in mm
- LHWed enddiastolische Dicke der linksventrikulären Hinterwand in mm
- LVes endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels in mm
- LVed enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels in mm

Aus diesen Werten wurden die absoluten und die prozentualen Wanddickenänderungen für das interventrikuläre Septum (ΔIVS) und die linksventrikuläre Hinterwand (ΔLHW), sowie die Verkürzungsfraction (FS) wie folgt berechnet:

- $\Delta IVS = IVSes - IVSed$
- $\Delta IVS\% = ((IVSes - IVSed) / IVSed) * 100$
- $\Delta LHW = LHWes - LHWed$
- $\Delta LHW\% = ((LHWes - LHWed) / LHWed) * 100$
- $FS = ((LVed - LVes) / LVed) * 100$

Die Ermittlung regionaler Wandbewegungsstörungen erfolgte mittels zweidimensionaler Echokardiographie in den Standard-Anlotungsebenen (parasternale Längs- und Querachse, Vierkammerblick und Zweikammerblick). Hierbei wurde, wie bereits in früheren Stressechokardiographiestudien (84), die linke Ventrikelwand in 16 anatomische Segmente eingeteilt. Sowohl in Ruhe als auch unter Belastung erfolgte eine semiquantitative Bewertung der regionalen Herzkontraktion: jedem der 16 Segmente wurde ein Punktwert zwischen eins und vier zugeordnet (s.Tab.4). In einigen Fällen bestanden Schwierigkeiten, eine eindeutige Bewertung zu finden. Für diese Fälle wurde eine weitere Abstufung eingeführt (z.B. gering hypokinetisch oder hypo- bis akinetisch) und durch die Addition von 0.5 zum niedrigeren Wert quantifizierbar gemacht.

Tabelle 4: Wandbewegungswerte (WBW)

-‘1’	Normokinesie (normales Kontraktionsverhalten)
-‘1.5’	geringe Hypokinesie
-‘2’	Hypokinesie (verminderte systolische Dickenzunahme relativ zu den Nachbarsegmenten)
-‘2.5’	Hypo- bis Akinesie
-‘3’	Akinesie (keine systolische Wandbewegung bzw. nur passive Mitbewegung)
-‘3.5’	A- bis Dyskinesie
-‘4’	Dyskinesie (Wandbewegung entgegen der normalen systolischen Wandbewegungsrichtung)

Eine Bewegungsstörung eines Segments mußte in allen Schnittebenen, in denen dieses Segment darstellbar ist, nachgewiesen werden, um als eindeutig erkannt zu gelten. Die Punktwerte von allen Segmenten wurden zu einem Wandbewegungsscore (WBS) aufaddiert. Der WBS eines Herzens mit normaler Kontraktionsfunktion beträgt ‘16’.

3.3.2 Koronarangiographie

Über einen femoralen Zugang wurde ein 7-F-Katheter eingeführt und das Koronarsystem unter Verwendung eines nicht-ionischen Kontrastmittels in biplaner Projektion dargestellt. Im Anschluß an die Untersuchung wurde der Herzkatheterfilm visuell ausgewertet.

Alle Angiographiebefunde wurden nach einem qualitativen Schema bewertet: Ein Angiographie-Grad von '1' bezeichnet das Vorliegen eines normalen Koronarbefundes. Grad '2' entspricht Wandunregelmäßigkeiten ohne nennenswerte Lumeneinengung, '3' bezeichnet eine Lumeneinengung kleiner 50% und '4' eine Lumenreduktion größer 50% bzw. eine diffuse Gefäßrarefizierung. Als Hinweis auf das Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie wurden auch geringe Veränderungen des koronaren Gefäßbaumes gewertet. Ein Angiographiebefund größer eins wurde somit als positiv im Sinne einer TVP eingestuft.

3.3.3 Intravaskulärer Ultraschall

Die intravaskuläre Ultraschallbildgebung (IVUS) ermöglicht als tomographische Schnittbildtechnik neben der Abbildung der Gefäßlumina auch die Darstellung der Gefäßwand und erlaubt so eine qualitative und quantitative Beurteilung der vorhandenen Gefäßplaques, während sich die Aussagekraft der Angiographie auf die Lumenmorphologie beschränkt (48). Die IVUS-Untersuchung ist die sensitivste Methode zur Diagnostik einer TVP in vivo (94). Für die intravaskuläre Bildgebung wurde im Rahmen einer Linksherzkatheteruntersuchung ein 30 MHz-Schallkopf über einen Führungsdraht in das jeweilige, durch intrakoronare Injektion von 0.25 mg Nitroglycerin, maximal dilatierte Koronargefäß eingeführt. Zielgefäße waren epikardiale Gefäße, die sich aufgrund eines angiographisch geeignet erscheinenden Gefäßverlaufs (wenig Torquierung) und ausreichenden Lumendiameters für die Aufnahme des Bildgebungskatheters anboten (48). Unter simultaner Videoregistrierung erfolgte ein kontrollierter und langsamer Rückzug des Bildgebungskatheters von der Gefäßperipherie bis zum Koronarostium. Die Position des Schallkopfes wurde angiographisch kontrolliert und auf Videoband dokumentiert. Die Zuordnung zu Koronarsegmenten orientierte sich am Abgang größerer Seitenäste (75). Aus den Sequenzen der untersuchten Koronarsegmente wurde jeweils das Bild ausgewählt, das qualitativ den stärksten Ausprägungsgrad der intimalen Veränderungen bei möglichst zentraler Lage des Schallkopfes zeigte. Diese wurden

digitalisiert und quantitativ hinsichtlich der Intimadicke ausgewertet (49). Zusammen mit der zirkumferentiellen Beteiligung des betroffenen Gefäßabschnitts wurde mit ihr das Ausmaß der TVP definiert. In der vorliegenden Arbeit kam die Stanford-Klassifikation nach (95) in modifizierter Form zur Anwendung (49):

Tabelle 5: Modifizierte Stanford-Klassifikation (IVUS-Grad)

Grad	Intimadicke	zirkumferentielle Ausdehnung
1	keine Verdickung	
2	< 0.3 mm	< 180°
3	< 0.3 mm	≥ 180°
4	0.3-0.5 mm	< 180°
5	0.3-0.5 mm	≥ 180°
6	> 0.5 mm	0-360°

Pro Patient wurden zwischen 3 und 12 Segmente in verschiedenen Koronargefäßen untersucht. Jedes untersuchte Koronarsegment wurde nach diesem Schema klassifiziert. Es wurde die Summe aller Segmente gebildet und durch die Anzahl der untersuchten Segmente geteilt. Der resultierende Wert wurde als mittlerer IVUS-Grad bezeichnet, dieser kann Werte von eins bis sechs erreichen. Patienten mit Werten ≤ 3.0 wurden als negativ hinsichtlich einer TVP eingestuft. Bei Patienten mit einem mittleren IVUS-Grad > 3.0 wurde das Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie angenommen (78).

3.3.4 Definition der TVP nach angiographischen und IVUS-Kriterien

Da Angiographie und IVUS die etablierten Verfahren zur Diagnosestellung einer Transplantatvaskulopathie darstellen, erfolgte in dieser Studie die Eingruppierung der Patienten in „TVP-positiv“ und „TVP-negativ“ nach den Ergebnissen der koronarmorphologischen Untersuchungen bzw. deren Kombination; als „TVP-positiv“ wurden diejenigen Patienten bewertet, die einen Angiographiegrad > 1 und/oder einen IVUS-Grad > 3.0 aufwiesen. Patienten mit einem Angiographiegrad = 1 und einem IVUS-Grad ≤ 3.0 wurden als „TVP-negativ“ eingestuft.

3.4 Statistische Methoden

Die explorative Analyse der zur Verfügung stehenden Daten erfolgte mit dem Statistik-Programm „stat view“ der SAS Institute Incorporation und in Rücksprache mit dem Institut für Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie am Klinikum Großhadern (Drs. Crispin und Weitkunert).

Für alle quantitativen Merkmale wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung angegeben.

Beim Vergleich normalverteilter quantitativer Variablen (z.B. Wanddickenänderungen) zweier unabhängiger Gruppen wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. War die Normalverteilung nicht gegeben (z.B. Wandbewegungsscore), kam der U-Test nach Mann und Whitney zur Anwendung. Bei der Ermittlung von Zusammenhängen der Immunfluoreszenzerggebnisse untereinander (z.B. t-PA vs. AT-III) wurden die Variablen dichotomisiert und mit der hiermit erhaltenen Vierfeldertafel ein χ^2 -Test durchgeführt; falls der Erwartungswert einer Zelle der Vierfeldertafel kleiner als 5 war, musste auf den exakten Test nach Fisher ausgewichen werden (38).

Als signifikant wurde ein Testergebnis gewertet, wenn der Wahrscheinlichkeitswert p für die zweiseitige Fragestellung kleiner 0.05 war.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten

4.1.1 Klinische Daten

Transplantationsindikationen waren dilatative Kardiomyopathie (43 Patienten/62.3%), koronare Herzerkrankung (20 Patienten/29.0%), dekompensierte Herzinsuffizienz bei Klappenerkrankung (5 Patienten/7.2%), und Transplantatabstoßung nach vorausgegangener HTX bei dilatativer Kardiomyopathie (1 Patient/1.4%).

Alter, Größe und Gewicht der Patienten, sowie die Zeitdauer nach der Transplantation zum Zeitpunkt der Untersuchung waren wie folgt verteilt:

Tabelle 6: Alter, Körpergröße, Körpergewicht, Posttransplantationszeitraum

Alter	(Jahre)	50.4 ± 11.4
Größe	(cm)	173.0 ± 7.7
Gewicht	(kg)	76.8 ± 12.4
Zeit posttranspl.	(Monate)	50.1 ± 36.5

Das Durchschnittsalter der Organspender betrug 31.1 ± 12.2 Jahre.

Alle Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung unter immunsuppressiver Therapie; in der Regel wurde eine medikamentöse Kombinationstherapie mit folgenden Substanzen durchgeführt (Tab. 7):

Tabelle 7: Immunsuppressive Medikamente

Immunsuppressiva	Patientenzahl (Häufigkeit)
CyA, Pred, Aza	30 (43.5%)
CyA, Pred	23 (33.3%)
CyA, Aza	3 (4.3%)
CyA	2 (2.9%)
Tacro, Pred, Aza	5 (7.2%)
Tacro, Pred	5 (7.2%)
Tacro	1 (1.4%)

CyA: Cyclosporin A; Pred: Methylprednisolon; Aza: Azathioprin; Tacro: Tacrolimus (FK 506)

Eine Aufschlüsselung der kardialen Medikation, unter der die Patienten zum Untersuchungszeitpunkt standen, ist Tabelle 8 zu entnehmen. Bei keinem Patienten bestand zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses eine Indikation für eine medikamentöse Herzinsuffizienz-Therapie, die genannten Substanzen wurden als Antihypertonika verwendet.

Tabelle 8: Antihypertensive Medikation

Antihypertonika	Patientenzahl (Häufigkeit)
ACE, Diu, Ca	12 (17.4%)
ACE, Diu	13 (18.8%)
ACE, Ca	9 (13.0%)
ACE	8 (11.6%)
Ca, Diu	10 (14.5%)
Ca	7 (10.1%)
Diu	5 (7.2%)
sonstige	2 (2.9%)
keine Therapie	3 (4.3%)

ACE: ACE-Hemmer; Diu: Diuretikum; Ca: Calciumantagonist

4.1.2 Patienten mit kardialen Ereignissen

Bei 8 der 69 Patienten kam es im Beobachtungszeitraum zu interventionspflichtigen Komplikationen aufgrund einer TVP; bei fünf Patienten war eine PTCA notwendig, in zwei Fällen kam es zu einer dekompensierten Insuffizienz des Transplantatherzens und bei einem Patienten war infolge zunehmender Transplantatinsuffizienz bei diffuser Koronarsklerose die Retransplantation erforderlich .

4.2 Ergebnisse der Referenzuntersuchungen

4.2.1 Angiographie und intravaskulärer Ultraschall

Zu den insgesamt untersuchten 69 Endomyokardbiopsien standen je 54 zeitnah durchgeführte IVUS-Untersuchungen und 68 Koronarangiographien zur Verfügung.

Ein normales Koronarangiogramm zeigte sich in 38 Fällen (Angiographie-Grad 1), Wandunregelmäßigkeiten ohne Lumeneinengung wurden bei 17 Untersuchungen gefunden (Angiographie-Grad 2). Angiographisch sichtbare Lumeneinengungen waren in 13 Fällen zu sehen (hiervon bei einem Patienten Angiographiegrad 3, bei 12 Patienten Angiographiegrad 4).

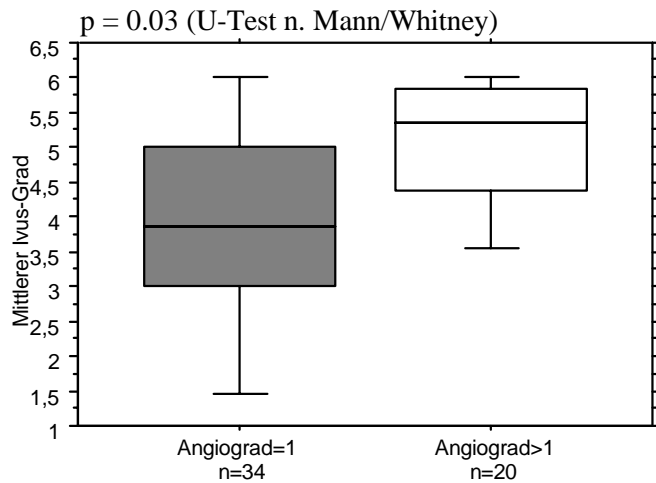
Der mittlere IVUS-Grad als wesentlicher quantitativer Parameter arteriosklerotischer Veränderungen im intrakoronaren Ultraschall lag im Durchschnitt aller Untersuchungen bei 4.2 ± 1.5 . Ein IVUS-Grad kleiner oder gleich 3.0 wurde in 9 Fällen, ein Wert größer 3.0 in 45 Fällen gefunden.

Von den 34 Patienten mit unauffälligem Koronarangiogramm (und vorhandener IVUS-Untersuchung) wiesen 25 einen mittleren IVUS-Grad > 3.0 auf, bei 9 Patienten war der mittlere IVUS-Grad ≤ 3.0 . Im Durchschnitt ergab sich bei den Patienten mit unauffälligem Koronarangiogramm ein mittlerer IVUS-Grad von 3.8 ± 1.5 , im Gegensatz zu einem Wert von 5.0 ± 1.2 bei den 20 Fällen mit pathologischer Koronarangiographie; dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant ($p = 0.03$; U-Test n. Mann/Whitney).

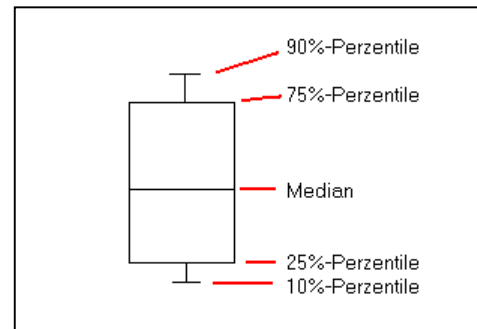
Bei den Patienten mit besonders kurzem Posttransplantationszeitraum (< 12 Monate) fand sich ein signifikant niedrigerer mittlerer IVUS-Grad von 2.9 ± 1.1 ($p=0.03$; U-Test); die Angiograde bei dieser kleinen Patientengruppe ($n=5$) waren allerdings nur im Trend niedriger.

Eine zusammenfassende Darstellung der IVUS-Grade in Abhängigkeit vom Angiographiegrad liefert folgende Abbildung:

Abbildung 3: Mittlerer IVUS-Grad in Abhängigkeit vom Angiographiegrad



Legende für die in dieser Arbeit verwendeten Box-Plot-Diagramme:



Bei den fünf Patienten, bei denen im Verlauf kardiale Komplikationen aufgetreten sind und bei denen Daten aus dem IVUS verfügbar waren, zeigte sich ein mittlerer IVUS-Grad von 5.0 ± 1.3 . Dieser Wert unterschied sich allerdings, in Anbetracht der sehr geringen Fallzahl, nicht signifikant vom Gesamtkollektiv. Auch ein höherer Anteil pathologischer Angiographiebefunde konnte beobachtet werden: bei sechs von den insgesamt acht Patienten wurde ein Angiographiegrad von 4 gefunden. Lediglich zwei Patienten hatten ein unauffälliges Koronarangiogramm, wobei beide bereits einen mittleren IVUS-Grad > 3.0 aufwiesen.

4.2.2 Belastungsechokardiographie

Insgesamt waren stressechokardiographische Daten von 65 Patienten verfügbar.

Die Analyse der für die globale linksventrikuläre systolische Funktion aussagekräftigsten Parameter Verkürzungsfraction und Wanddickenzunahme zeigte, dass bei den Patienten, die weder in der Angiographie noch im IVUS einen pathologischen Befund aufwiesen, im Bereich der linken Ventrikelhinterwand unter Dobutaminbelastung eine hochsignifikant höhere systolische Wanddickenzunahme festzustellen war. Desweiteren war die systolische Verkürzungsfraction unter Belastung bei diesen TVP-negativen Patienten signifikant höher.

Tabelle 9: Systolische Wanddickenzunahme und systolische Verkürzungsfraction

	TVP neg (n=14)	TVP pos (n=51)	Signifikanzniveau p
ΔIVS-Ruhe (%)	37.4 ± 10.6	32.4 ± 12.1	n.s. °
ΔLHW-Ruhe (%)	55.8 ± 13.9	48.2 ± 14.2	n.s. °
ΔIVS-max (%)	62.2 ± 14.2	54.1 ± 17.8	n.s. °
ΔLHW-max (%)	91.7 ± 22.1	77.6 ± 19.7	0.030 °
FS-Ruhe (%)	35.3 ± 5.3	34.5 ± 6.6	n.s. °
FS-max (%)	51.1 ± 3.5	46.6 ± 8.2	0.040 °

°: t-Test für unverbundene Stichproben

Bei 65 ausgewerteten Untersuchungen fanden sich unter Ruhebedingungen in 36 Fällen regionale Wandbewegungsstörungen, unter Dobutaminbelastung in 37 Fällen.

Von den 51 TVP-positiven Patienten waren sowohl in Ruhe als auch unter Dobutaminbelastung bei 34 Patienten regionale Wandbewegungsstörungen nachweisbar; bei den 14 TVP-negativen Patienten zeigten sich diese lediglich bei zwei Patienten in Ruhe und bei drei Patienten unter Dobutaminbelastung. Entsprechend ergaben sich beim Vergleich der Wandbewegungsscores für beide Subgruppen hochsignifikant schlechtere Werte für die TVP-positiven Patienten in Ruhe und unter Belastung (s.Tab. 10) .

Tabelle 10: Wandbewegungsscores in Ruhe und unter Dobutaminbelastung

	Gesamtkollektiv	TVP neg	TVP pos	Signifikanzn. p TVPpos/TVPneg
WBS-Ruhe	18.3 ± 3.6	16.1 ± 0.3	18.9 ± 3.9	0.008 *
WBS-max	19.0 ± 4.3	16.4 ± 0.8	19.7 ± 4.5	0.006 *

*: U-Test n. Mann/Whitney

Die untersuchten stressechokardiographischen Parameter von sieben Patienten mit kardialen Ereignissen unterschieden sich trotz der geringen Fallzahl mit hoher Signifikanz, und zwar alle im Sinne von pathologischeren Werten, von den Parametern der übrigen Patienten.

Tabelle 11: Ergebnisse der Stressechokardiographie bei Patienten mit kardialen Ereignissen

	Komplikation+ (n=7)	Komplikation- (n=58)	Signifikanzn. p
ΔIVS-Ruhe (%)	15.6 ± 7.7	35.9 ± 10.2	< 0.001 °
ΔLHW-Ruhe (%)	36.1 ± 17.2	51.8 ± 13.1	= 0.005 °
ΔIVS-max (%)	35.8 ± 14.5	58.5 ± 15.8	< 0.001 °
ΔLHW-max (%)	66.1 ± 24.4	82.8 ± 19.8	= 0.045 °
FS-Ruhe (%)	27.0 ± 8.4	35.7 ± 5.3	< 0.001 °
FS-max (%)	38.6 ± 8.4	48.6 ± 6.8	< 0.001 °
WBS-Ruhe	22.6 ± 4.2	17.7 ± 3.1	< 0.001 *
WBS-max	24.9 ± 3.7	18.2 ± 3.7	< 0.001 *

°: t-Test für unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

4.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

4.3.1 Quantitative Befundung

Die Diapositive der immunfluoreszenzgefärbten Biopsien wurden von zwei unabhängigen Beobachtern, unter simultaner Betrachtung der entsprechenden Negativkontrollen, hinsichtlich ihrer spezifischen Anfärbungsintensität quantitativ beurteilt. Die verwendete Skalierung (s. auch S.15) ist in Tab.12 nochmals dargestellt:

Tabelle 12: Bewertungsstufen bei der Quantifizierung der immunhistochemischen Färbeintensitäten

Grad	Intensität der spezifischen Anfärbung
0	keine spezifische Anfärbung
0.5	minimale spezifische Anfärbung
1	mäßige spezifische Anfärbung
1.5	mittelstarke spezifische Anfärbung
2	starke spezifische Anfärbung
2.5	starke bis sehr starke spezifische Anfärbung
3	sehr starke spezifische Anfärbung

Bei keinem der untersuchten Färbeantikörper konnte eine Abhängigkeit der Färbeintensität vom Geschlecht oder der Diagnose, die zur HTX geführt hatte, gefunden werden.

Autofluoreszierende Lipofuszin-Körper waren in wechselndem Ausmaß in allen Biopsien als unspezifischer Hintergrund-Effekt nachweisbar.

4.3.2 Anfärbungsintensitäten der einzelnen Antikörper

4.3.2.1 ICAM-1

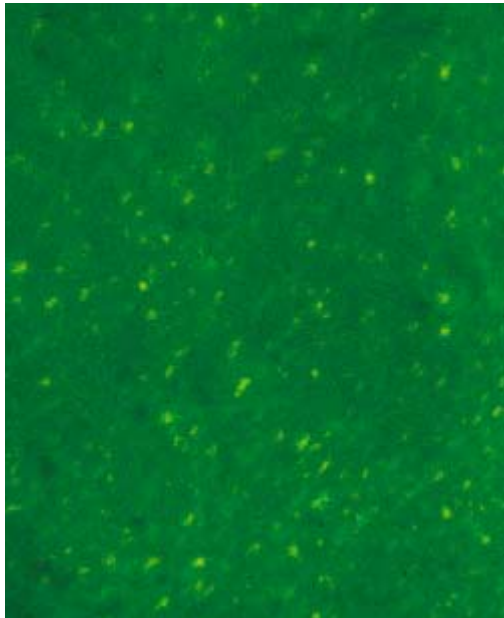
4.3.2.1.1 Normalbefunde

Bei der Anfärbung des „intercellular adhesion molecule“ (ICAM-1) zeigte sich bei den herzgesunden Unfallopfern jeweils eine minimale spezifische Anfärbung (Grad 0.5) von Kapillaren (s. Fotoabbildungen 1+2).

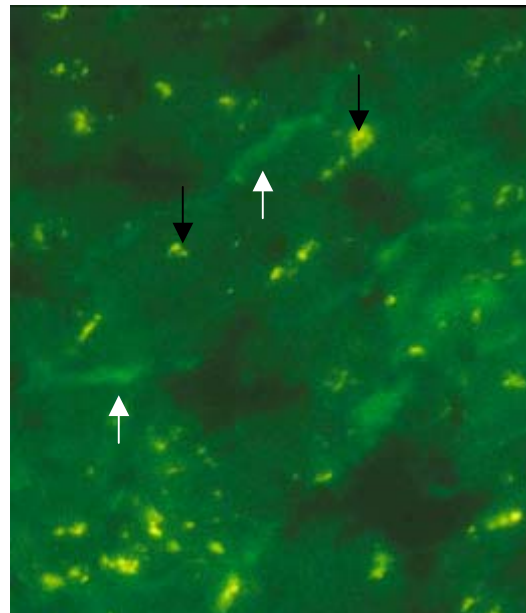
Fotoabb. 1+2: ICAM-1, Normalbefund . Minimale spezifische Anfärbung (Grad 0.5).

Schwarze Pfeile markieren Lipofuszin-Körper, weisse Pfeile markieren spezifische mikrovaskuläre Anfärbung.

1)Vergrößerung x100



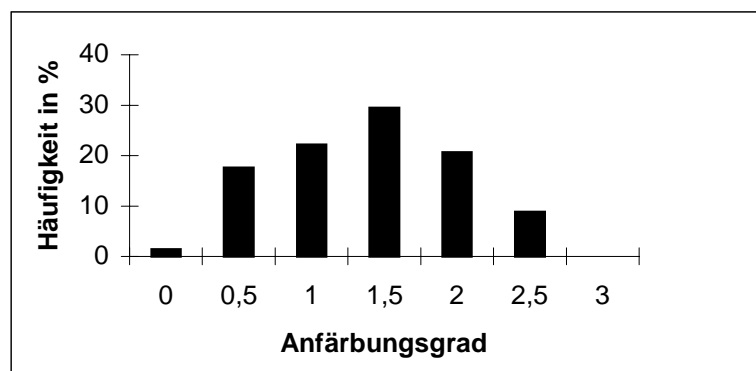
2)Vergrößerung x400



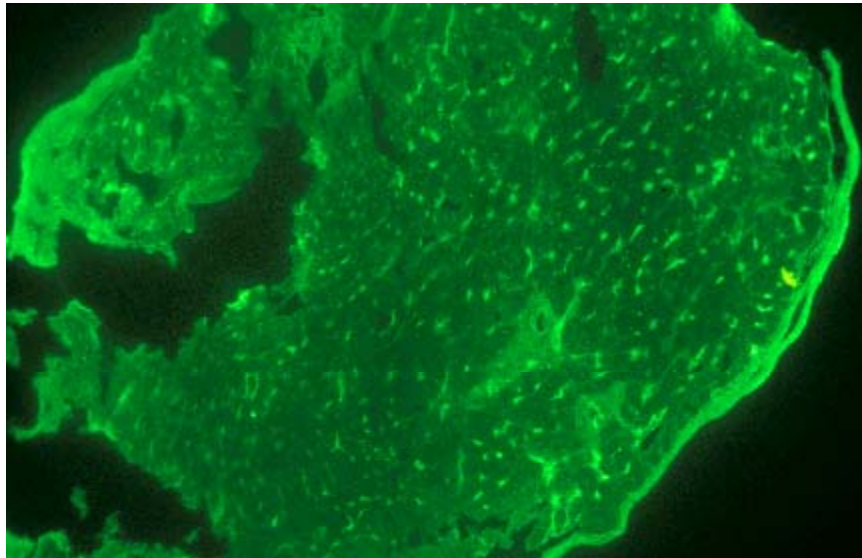
4.3.2.1.2 Biopsien der transplantierten Patienten

Die Gesamtzahl der bezüglich ICAM auswertbaren Biopsien betrug 68. Hier wurden, im Vergleich zum Normalbefund, insgesamt deutlich stärkere, kapillär betonte, spezifische Anfärbungen gefunden (s. Fotoabbildungen 3-6). Die Häufigkeitsverteilung der gefundenen Anfärbungsgrade zeigt folgende Abbildung:

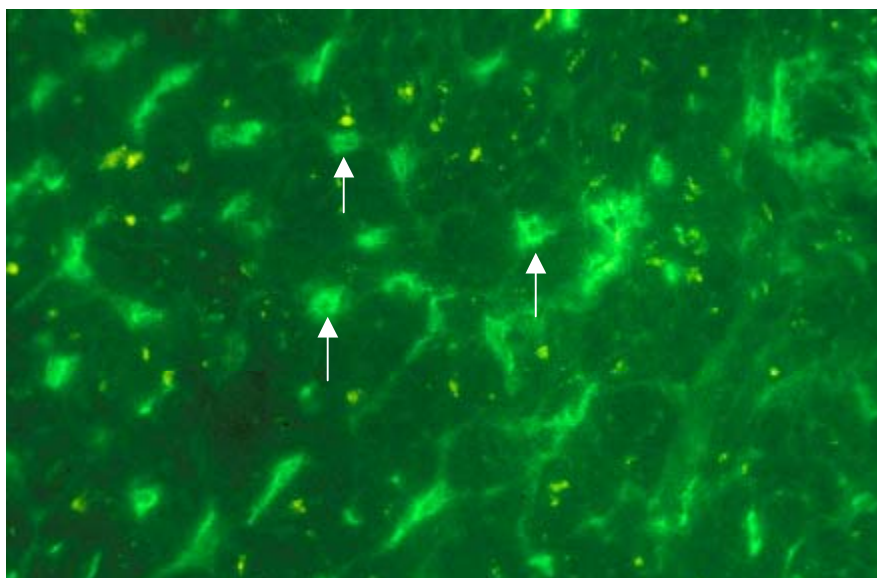
Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung der Anfärbungsgrade von ICAM-1



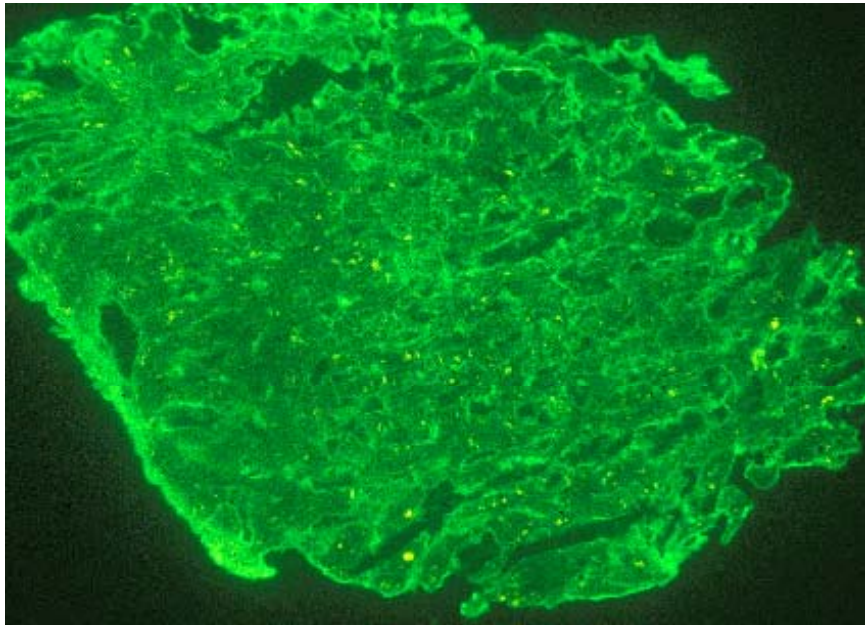
Fotoabb.3: ICAM-1, starke bis sehr starke spezifische Anfärbung (Grad 2.5),
Vergrößerung x100.



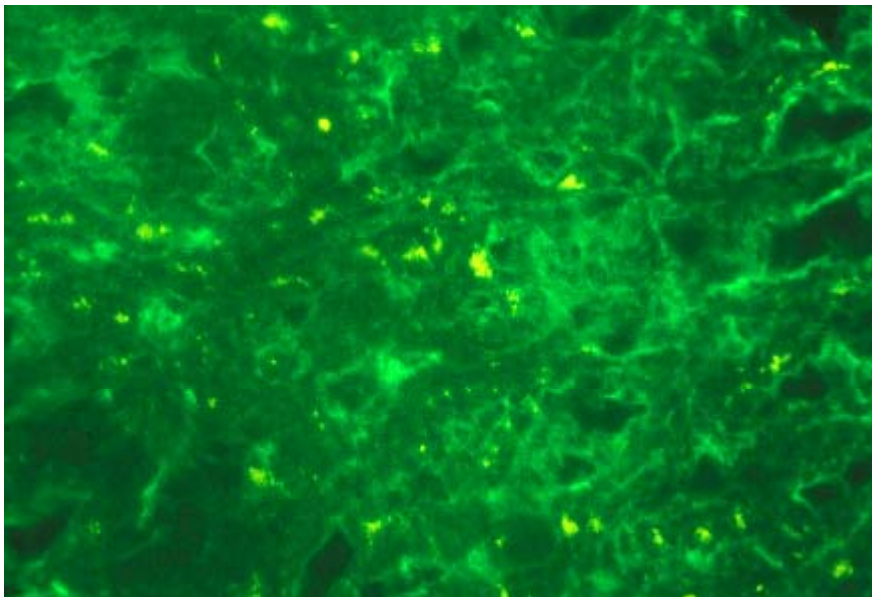
Fotoabb.4: ICAM-1, starke bis sehr starke spezifische Anfärbung (Grad 2.5),
Vergrößerung x400.
Weisse Pfeile markieren Beispiele spezifischer mikrovaskulärer Anfärbung.



Fotoabb.5: ICAM-1, keine spezifische Anfärbung (Grad 0), Vergrößerung x100.



Fotoabb.6: ICAM-1, keine spezifische Anfärbung (Grad 0), Vergrößerung x400.



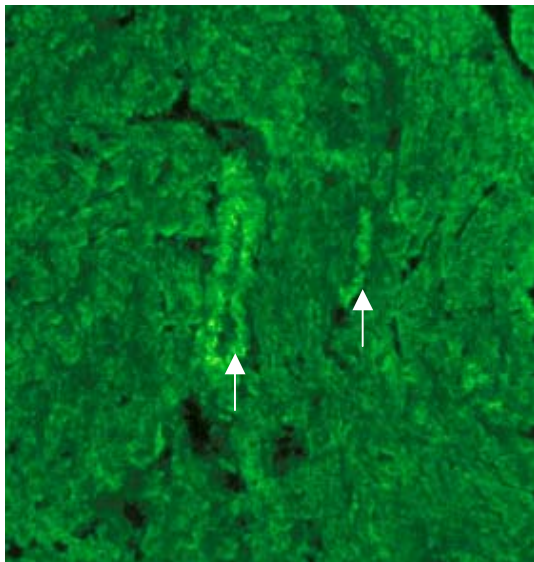
4.3.2.2 t-PA

4.3.2.2.1 Normalbefunde

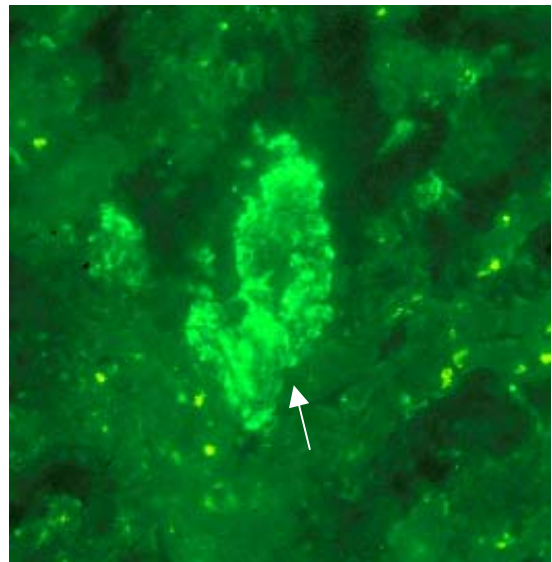
In den Referenzbiopsien der beiden herzgesunden Unfallopfer zeigte sich eine deutliche arterioläre Anfärbung des Gewebsplasminogen-Aktivators. Anfärbung von Kapillaren, Venolen oder Interstitium wurde nicht gesehen (s.Fotoabbildungen 7+8).

Fotoabb.7+8: t-PA, Normalbefund. Starke spezifische Anfärbung (Grad 2)
Weisse Pfeile markieren spezifische mikrovaskuläre Anfärbung.

7)Vergrößerung x100



8)Vergrößerung x400

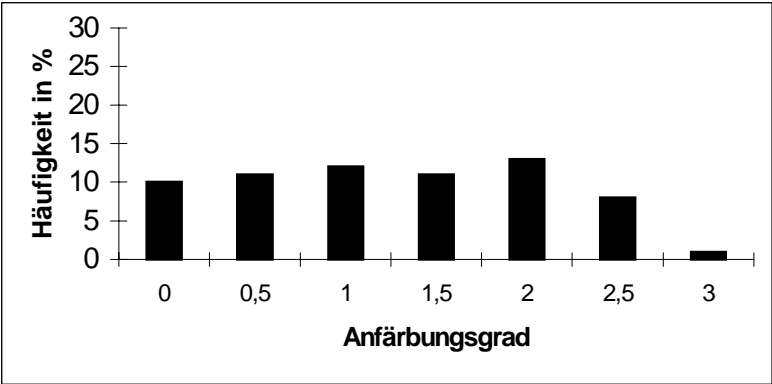


4.3.2.2.2 Biopsien der transplantierten Patienten

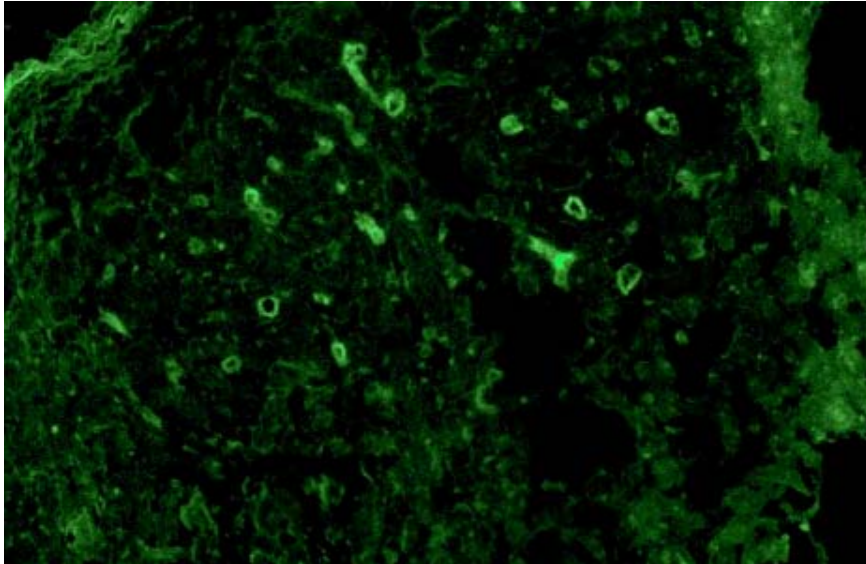
Hier standen insgesamt 66 auswertbare Biopsien zur Verfügung.

Es fand sich insgesamt eine schwächere spezifische Anfärbung als beim Normalbefund, manchmal mit diffuser kapillärer Beteiligung (s. Fotoabbildungen 9-12). Die quantitative Verteilung der Anfärbungsgrade ist folgender Abbildung zu entnehmen:

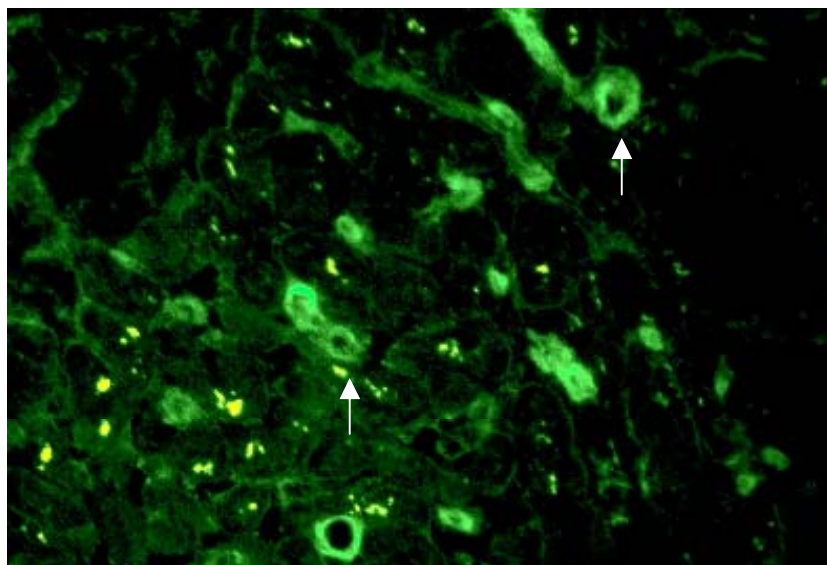
Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der Anfärbungsgrade von t-PA



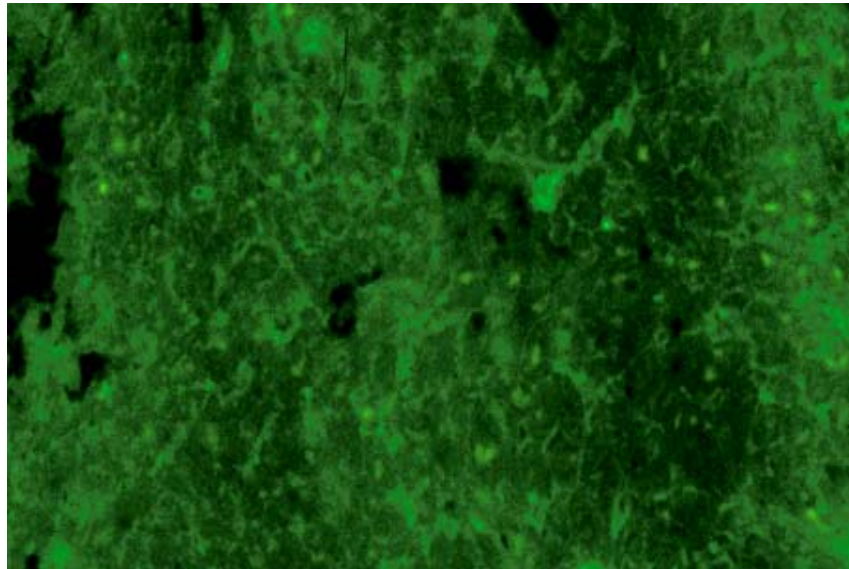
Fotoabb.9: t-PA, sehr starke spezifische Anfärbung (Grad 3), Vergrößerung x100.



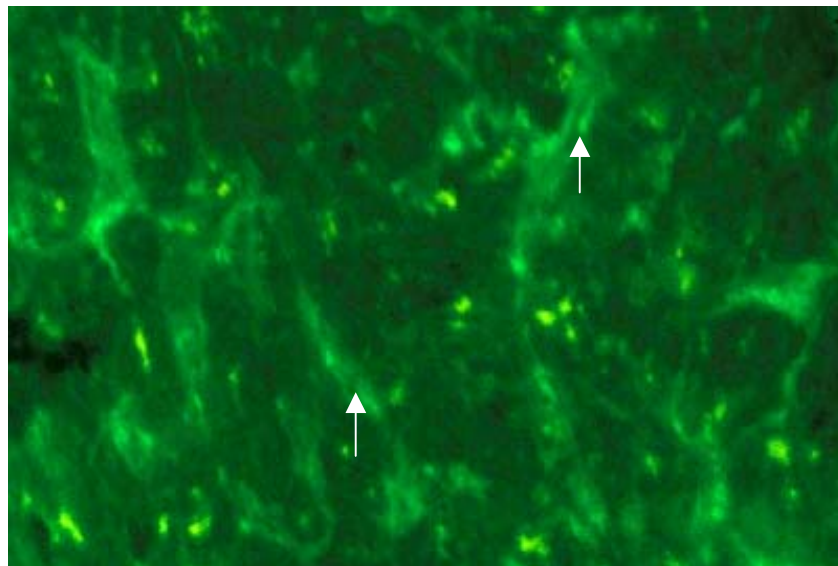
Fotoabb.10: t-PA, sehr starke spezifische Anfärbung (Grad 3), Vergrößerung x400.
Weisse Pfeile markieren Beispiele spezifischer mikrovaskulärer Anfärbung.



Fotoabb.11: t-PA, minimale spezifische Anfärbung (Grad 0.5), Vergrößerung x100.



Fotoabb.12: t-PA, minimale spezifische Anfärbung (Grad 0.5), Vergrößerung x400.
Weisse Pfeile markieren Beispiele spezifischer mikrovaskulärer Anfärbung.



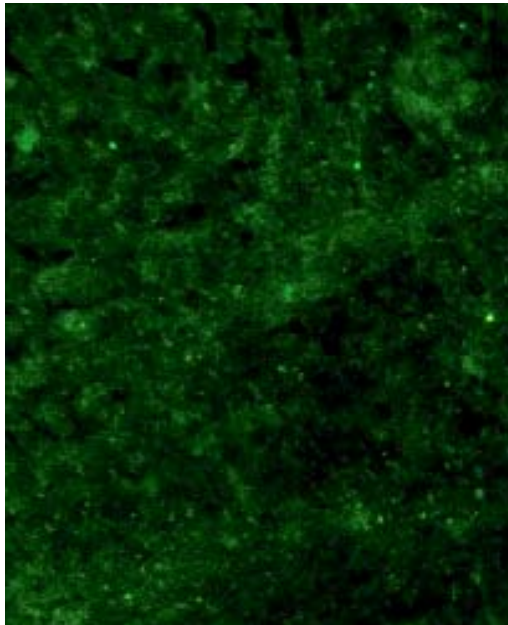
4.3.2.3 Fibrin

4.3.2.3.1 Normalbefunde

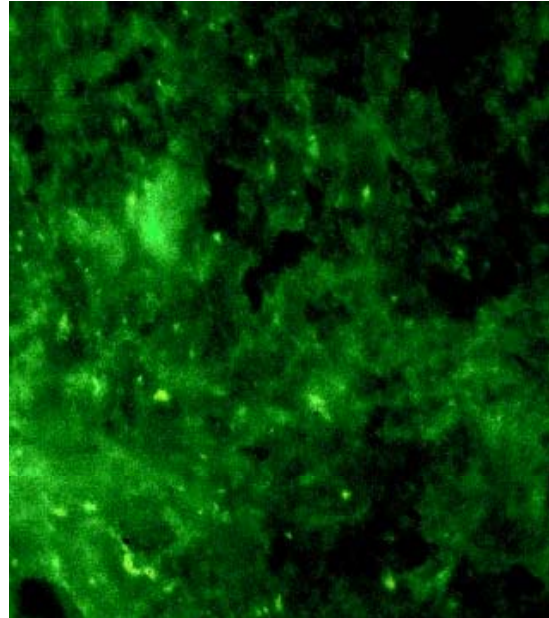
Die Referenzbiopsien wiesen lediglich minimale, unspezifische Hintergrundanfärbung, jedoch keinerlei spezifische Anfärbung von Fibrin auf (s. Fotoabbildungen 13+14).

Fotoabb. 13+14: Fibrin, Normalbefund. Keine spezifische Anfärbung (Grad 0).

13)Vergrößerung x100



14)Vergrößerung x400

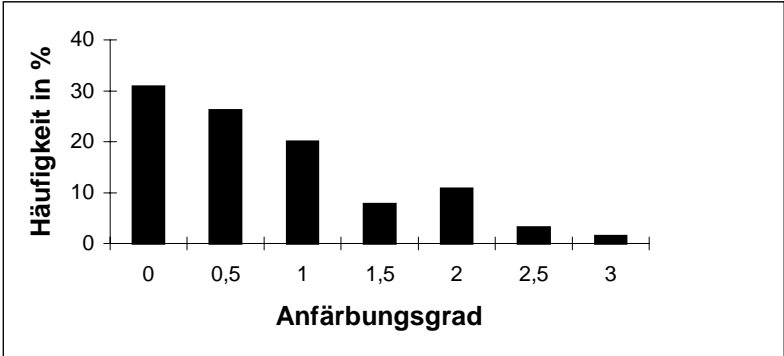


4.3.2.3.2 Biopsien der transplantierten Patienten

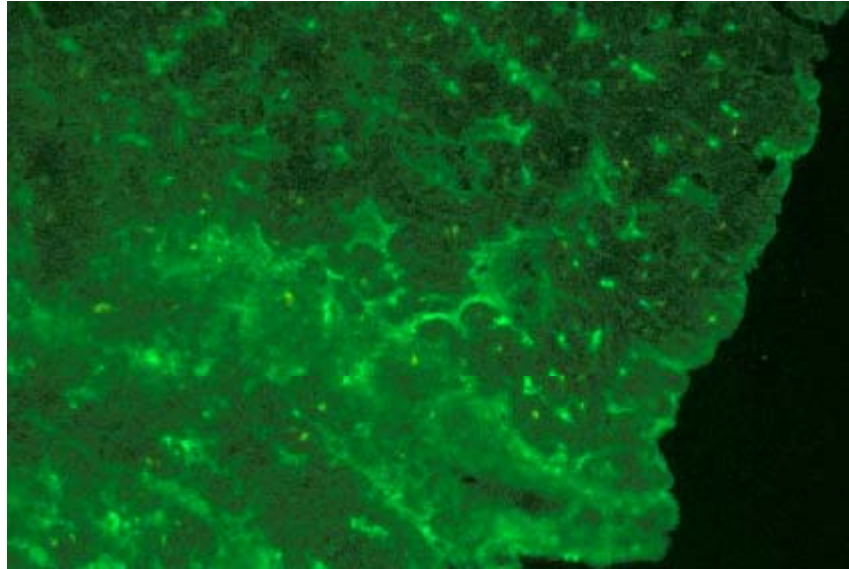
Es konnten insgesamt 65 Biopsien bezüglich Fibrin ausgewertet werden.

Biopsien mit keiner oder nur minimaler spezifischer Anfärbung überwogen zwar leicht, jedoch fand sich doch eine beträchtliche Zahl mit erheblicher Fibrindeposition, die vor allem kapillär betont war (s. Fotoabbildungen 15-18). Zunächst folgt die Darstellung der quantitativen Verteilung der Anfärbungsintensitäten:

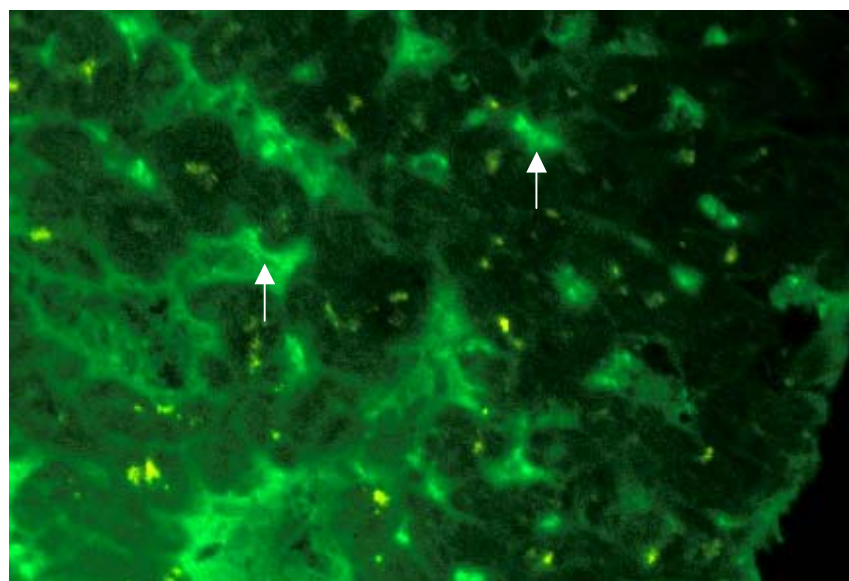
Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der Anfärbungsgrade von Fibrin



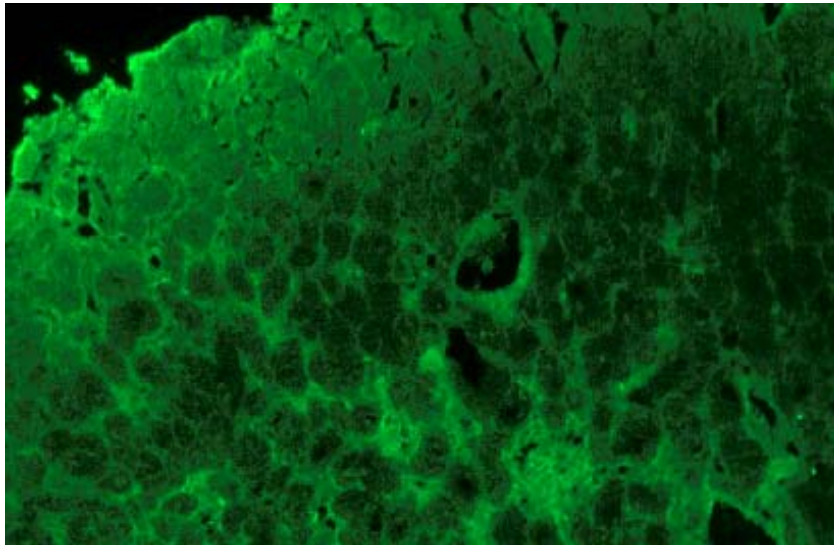
Fotoabb.15: Fibrin, starke spezifische Anfärbung (Grad 2), Vergrößerung x100.



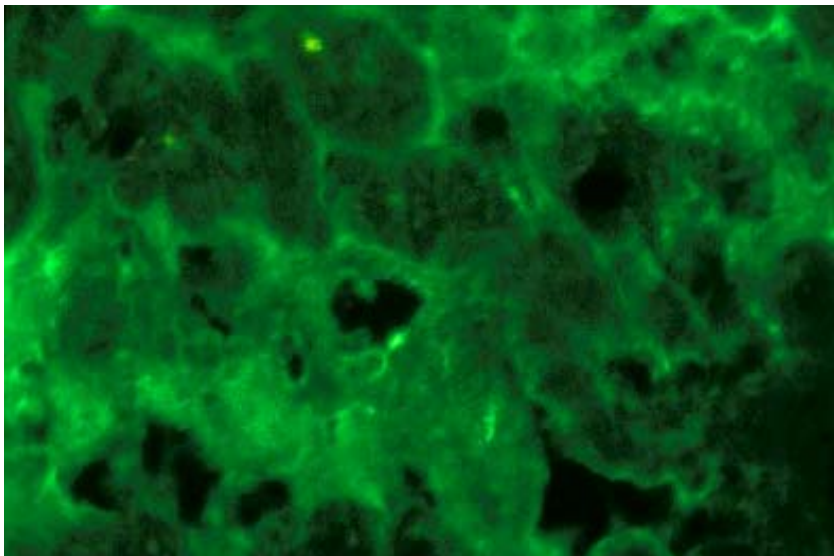
Fotoabb.16: Fibrin, starke spezifische Anfärbung (Grad 2), Vergrößerung x400.
Weisse Pfeile markieren Beispiele spezifischer mikrovaskulärer Anfärbung.



Fotoabb.17: Fibrin, keine spezifische Anfärbung (Grad 0), Vergrößerung x100.



Fotoabb.18: Fibrin, keine spezifische Anfärbung (Grad 0), Vergrößerung x400.



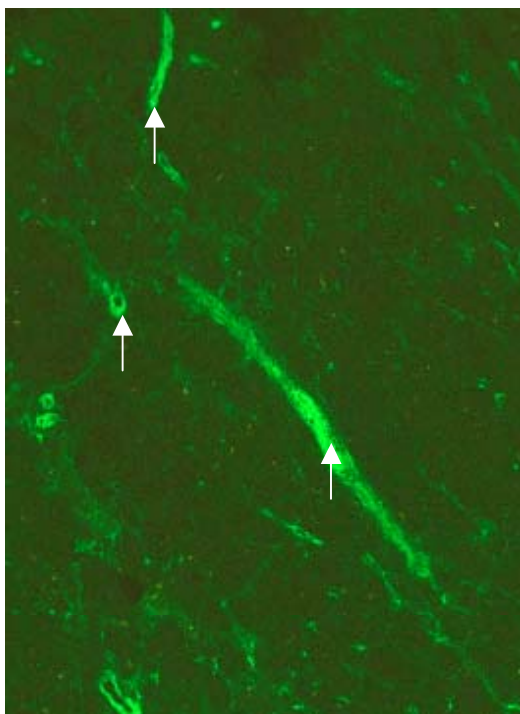
4.3.2.4 AT-III

4.3.2.4.1 Normalbefunde

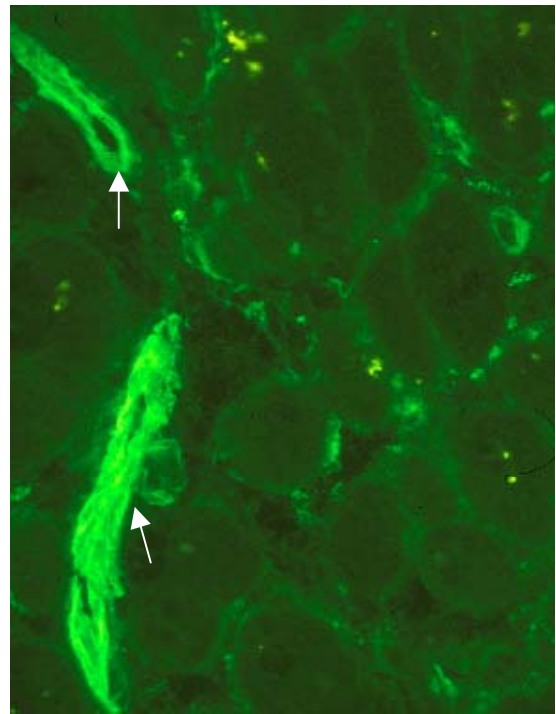
Im gesunden Herzmuskelgewebe fand sich eine markante spezifische Anfärbung von Arteriolen und Venolen, jedoch keine diffuse kapilläre Anfärbung (s. Fotoabbildungen 19+20)

Fotoabb.19+20: AT-III, Normalbefund. Sehr starke spezifische Anfärbung (Grad 3).
Weisse Pfeile markieren Beispiele spezifischer mikrovaskulärer Anfärbung.

19) Vergrößerung x100



20) Vergrößerung x400

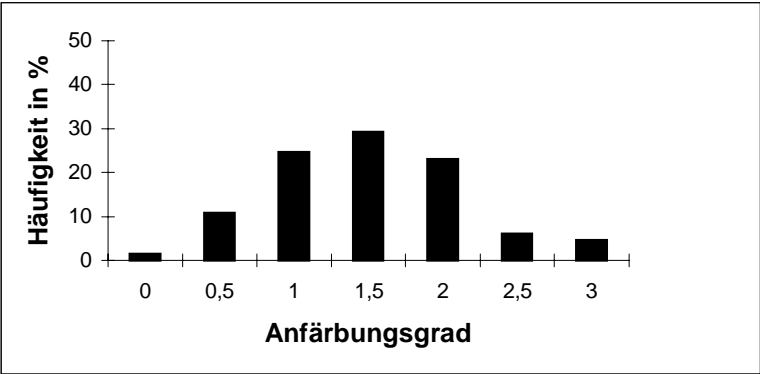


4.3.2.4.2 Biopsien der transplantierten Patienten

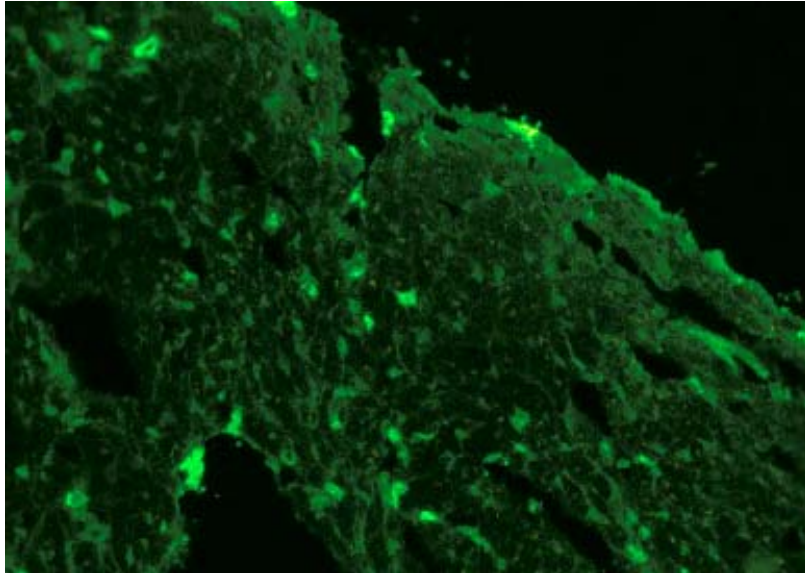
Es standen 65 Biopsien zur Auswertung zur Verfügung.

Hinsichtlich des Nachweises von Antithrombin III boten die Biopsien der transplantierten Patienten ein gemischtes Bild. In vielen Fällen war eine erhebliche AT-III-Depletion festzustellen (bei 24 Patienten betrug der Färbegrad höchstens 1.0), häufig zeigte sich aber auch eine mittelstarke bis starke Färbeintensität, oftmals mit ausgedehnter kapillärer Beteiligung (s. Fotoabbildungen 21-24).

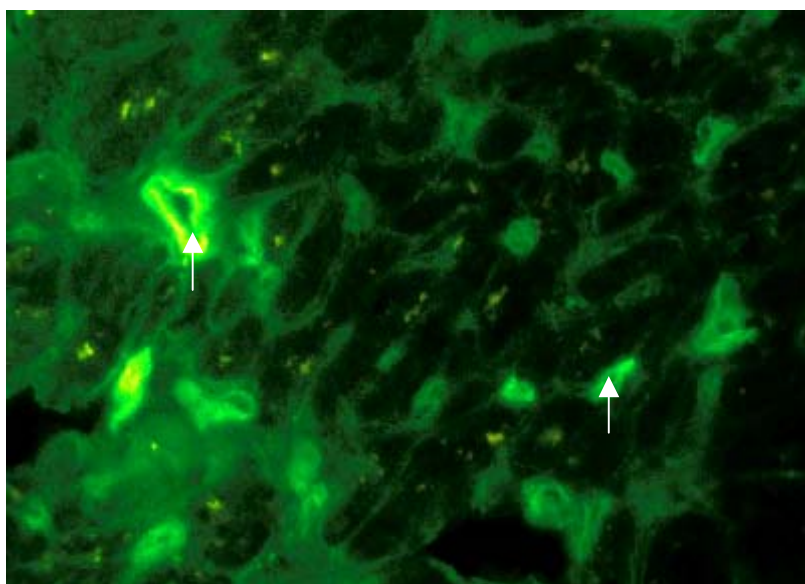
Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der Anfärbungsgrade von AT-III



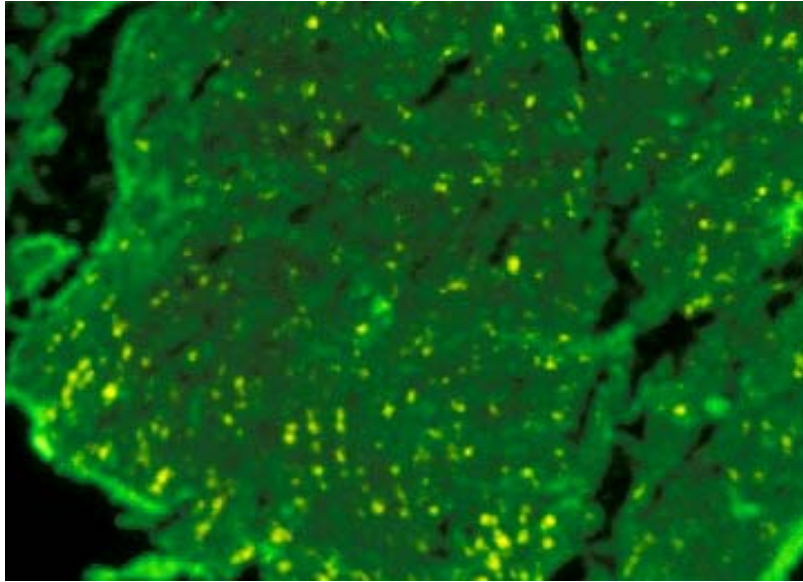
Fotoabb.21: AT-III, starke spezifische Anfärbung (Grad 2), Vergrößerung x100.



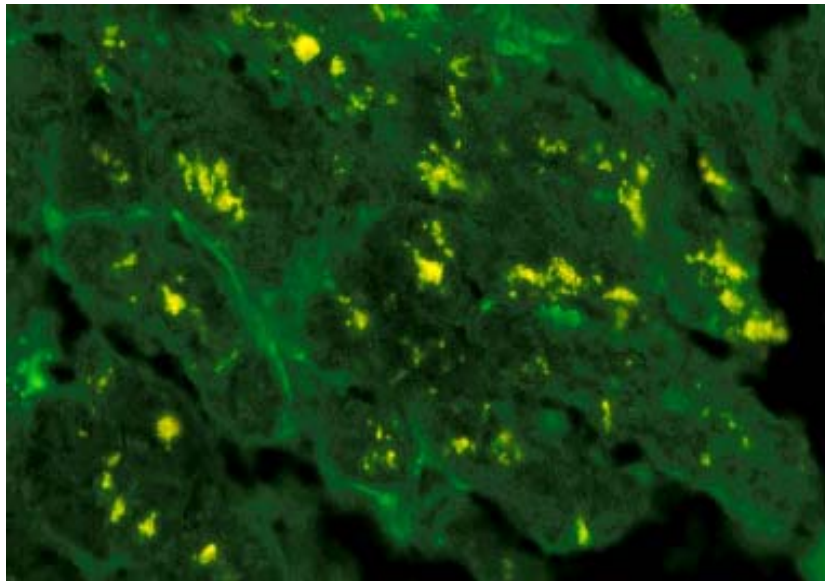
Fotoabb.22: AT-III, starke spezifische Anfärbung (Grad 2), Vergrößerung x400.
Weisse Pfeile markieren Beispiele spezifischer mikrovaskulärer Anfärbung.



Fotoabb.23: AT-III, keine spezifische Anfärbung (Grad 0), Vergrößerung x100.
Ausgeprägte Lipofuszinablagerungen.



Fotoabb.24: AT-III, keine spezifische Anfärbung (Grad 0), Vergrößerung x400.



4.3.3 Korrelationen der Marker untereinander

Von insgesamt 64 Patienten, von denen sowohl Färbeergebnisse von t-PA als auch von AT-III zur Verfügung standen, wiesen 28 eine konkordante Depletion beider Parameter auf. Bei 29 Patienten war einer der beiden Parameter vermindert und nur in 7 Fällen zeigten sowohl t-PA als auch AT-III normale Färbeintensität. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang wurde aber nur bei detaillierter Subgruppenanalyse zwischen den Patienten mit ausgeprägter Depletion (Anfärbungsgrad < 1.0) von t-PA und Antithrombin III ($p = 0.003$) gefunden.

Darüberhinaus ergab sich eine signifikant positive Korrelation der Anfärbungsintensitäten von ICAM-1 und t-PA ($p = 0.038$).

Das Ausmaß von Fibrindeposition war unabhängig von den übrigen Färbeergebnissen.

Tabelle 13: Korrelierende Immunfluoreszenzergebnisse

	t-PA < 1.0	t-PA ≥ 1.0
AT III < 1.0	6	1
AT III ≥ 1.0	14	43

$p = 0.003$ (Fisher-Exakt-Test)

	ICAM < 2.0	ICAM ≥ 2.0
t-PA < 2.0	35	8
t-PA ≥ 2.0	12	10

$p = 0.038$ (χ^2 -Test)

4.3.4 Korrelation der Immunfluoreszenzergebnisse mit klinischen Daten

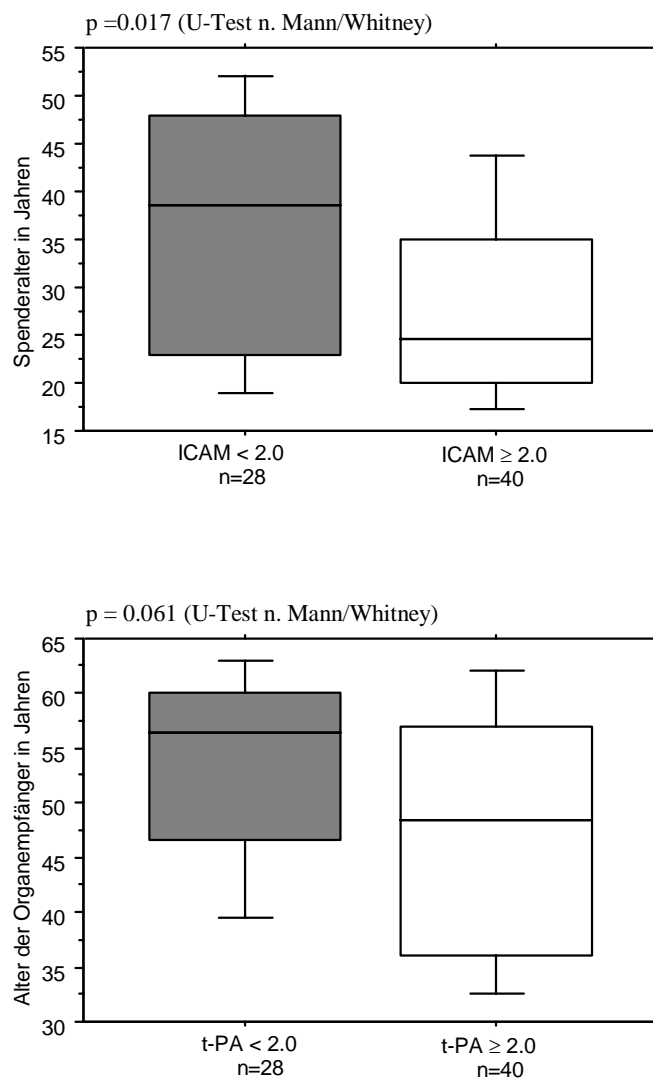
4.3.4.1 Alter der Organspender und Organempfänger

Hinsichtlich des Spenderalters ergab sich eine signifikante ($p = 0.017$) negative Korrelation mit der Anfärbungsintensität von ICAM-1, d.h. bei Herzen jüngerer Spender zeigte sich eine stärkere Expression von ICAM-1 in der koronaren Mikrozirkulation.

Das Alter der Organempfänger korrelierte im Trend mit t-PA: hier überwogen bei den jüngeren Transplantationspatienten eher höhere Anfärbungsintensitäten ($p = 0.061$).

Mit Fibrin und AT-III fanden sich keine Zusammenhänge.

Abbildung 8: Korrelation von Immunfluoreszenzergebnissen mit dem Alter der Organspender bzw. Organempfänger (Legende s. Seite 28)

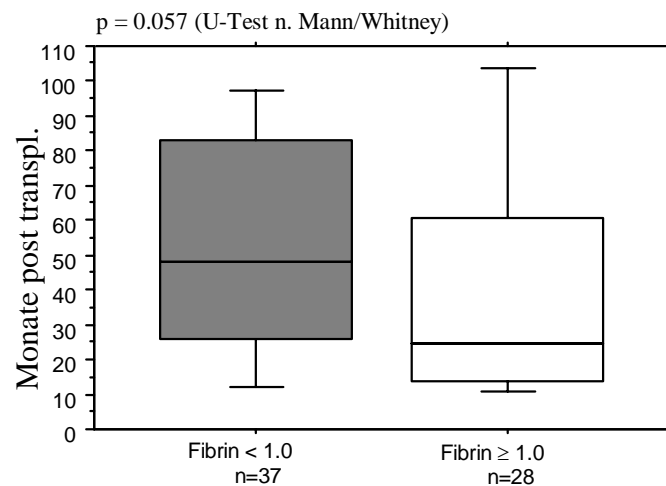


4.3.4.2 Posttransplantationszeitraum

Nur bei der Anfärbungsintensität von Fibrin konnte eine Abhängigkeit von der Zeitdauer nach der Transplantation festgestellt werden: stärkere Färbeintensitäten waren im Trend bei kürzerem Posttransplantationszeitraum zu finden ($p = 0.06$).

Bemerkenswert, aber wegen der geringen Fallzahl statistisch nicht signifikant, war eine ausgeprägte t-PA-Depletion innerhalb der ersten 18 Monate nach HTX. Von 14 Patienten wiesen 12 eine Anfärbungsintensität < 2.0 auf.

Abbildung 9: Korrelation der Fibrin-Anfärbungsintensität mit der Zeitdauer nach HTX



4.3.4.3 Kardiale Ereignisse

Bei den Patienten mit kardialen Ereignissen ergaben sich, wesentlich mitbedingt durch die sehr kleinen Fallzahlen, keine statistisch signifikanten Unterschiede der Anfärbungsintensitäten im Vergleich zu den übrigen Patienten. Auffällig war der hohe Anteil von Fibrindeposition: Von den sieben auswertbaren Biopsien der Patienten mit kardialen Komplikationen wiesen fünf nennenswerte Fibrindepositionen auf, in drei Fällen sogar in starkem bis sehr starkem Ausmaß (Anfärbungsgrad ≥ 2.0).

Tabelle 14: Häufigkeitsverteilung der Anfärbungsintensitäten bei Patienten mit kardialen Ereignissen

	ICAM < 2.0	ICAM ≥ 2.0
K. Ereignis +	3	5
K. Ereignis -	25	35

n.s. (Fisher-Exakt-Test)

	t-PA < 2.0	t-PA ≥ 2.0
K. Ereignis +	6	2
K. Ereignis -	38	20

n.s. (Fisher-Exakt-Test)

	Fibrin < 1.0	Fibrin ≥ 1.0
K. Ereignis +	2	5
K. Ereignis -	35	23

n.s. (Fisher-Exakt-Test)

	AT III < 2.0	AT III ≥ 2.0
K. Ereignis +	3	3
K. Ereignis -	40	19

n.s. (Fisher-Exakt-Test)

4.3.4.4 Zelluläre Abstoßung

Das Vorhandensein einer leichtgradigen zellulären Abstoßungsreaktion (ISHLT-Grade IA, IB) war lediglich bei Fibrin im Trend mit höherer Anfärbungsintensität verbunden ($p = 0.097$).

Tabelle 15: Fibrin-Anfärbungsintensität und leichtgradige zelluläre Abstoßung

	Fibrin < 1.0	Fibrin \geq 1.0
ISHLT: 0	26	14
ISHLT: IA, IB	9	12

$p = 0.097$ (χ^2 -Test)

4.3.5 Korrelation der Immunfluoreszenzergebnisse mit den koronarmorphologischen Untersuchungen

4.3.5.1 Angiographie

Ein Zusammenhang der Anfärbungsintensitäten mit angiographisch festgestellten Veränderungen der Koronararterien konnte nur für ICAM-1 gefunden werden: niedrige Anfärbungsintensitäten überwogen im Trend bei Patienten mit pathologischem Angiographiebefund ($p = 0.062$).

Tabelle 16: Immunfluoreszenzergebnisse und Angiographiegrad

	ICAM < 2.0	ICAM ≥ 2.0
Angiograd = 1	23	15
Angiograd > 1	24	5

$p = 0.062$ (χ^2 -Test)

	t-PA < 2.0	t-PA ≥ 2.0
Angiograd = 1	24	11
Angiograd > 1	20	10

n.s. (χ^2 -Test)

	Fibrin < 1.0	Fibrin ≥ 1.0
Angiograd = 1	19	15
Angiograd > 1	17	13

n.s. (χ^2 -Test)

	AT III < 2.0	AT III ≥ 2.0
Angiograd = 1	23	12
Angiograd > 1	20	9

n.s. (χ^2 -Test)

4.3.5.2 Intravaskulärer Ultraschall

AT-III-Depletion war signifikant mit verstärkter Intimahyperplasie verbunden ($p = 0.049$).

Die Anfärbungsintensitäten von ICAM-1, t-PA und Fibrin zeigten keine statistisch signifikante Abhängigkeit vom Nachweis einer intimalen Hyperplasie in der IVUS-Untersuchung. Allerdings war bei deutlicher t-PA-Depletion (Färbeintensität < 1.0) ein Trend zu höheren IVUS-Graden auffällig. Mit einer leichten Tendenz ergaben sich bei ausgeprägten Fibrinablagerungen eher weniger pathologische Werte für den mittleren IVUS-Grad. Allerdings kehrte sich dieser Trend für die Patienten mit höherem Posttransplantationszeitraum (> 51 Monate) um.

Tabelle 17 : Mittlere IVUS-Grade in Abhängigkeit von den Immunfluoreszenzergebnissen

	ICAM < 2.0 (n=34)	ICAM ≥ 2.0 (n=19)
IVUS-mean	4.3 \pm 1.3	4.1 \pm 1.7

n.s. (U-Test n. Mann/Whitney)

	t-PA < 1.0 (n=19)	t-PA ≥ 1.0 und < 2.0 (n=14)	t-PA ≥ 2.0 (n=18)
IVUS-mean	4.5 \pm 1.3	4.1 \pm 1.6	4.1 \pm 1.6

n.s. (U-Test n. Mann/Whitney)

	Fibrin < 1.0 (n=27)	Fibrin ≥ 1.0 (n=23)
IVUS-mean	4.6 \pm 1.2	4.0 \pm 1.8

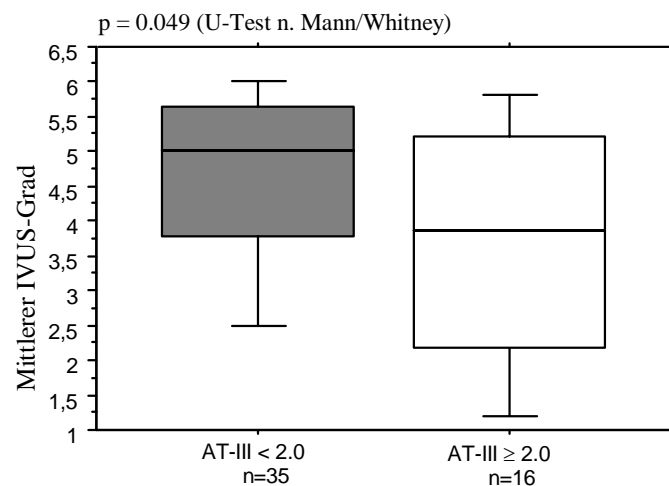
n.s. (U-Test n. Mann/Whitney)

	AT-III < 2.0 (n=35)	AT-III ≥ 2.0 (n=16)
IVUS-mean	4.6 \pm 1.3	3.7 \pm 1.8

$p = 0.049$ (U-Test n. Mann/Whitney)

Den Zusammenhang zwischen AT-III-Depletion und zunehmendem IVUS-Grad verdeutlicht folgendes Box-Plot-Diagramm:

Abbildung 10: Anfärbungsintensität von AT-III und mittlerer IVUS-Grad



Bei den Patienten mit gemeinsamer Depletion an t-PA und AT-III war der mittlere IVUS-Grad zwar nicht statistisch signifikant, aber mit einem deutlichen Trend höher (p=0.093).

Tabelle 18: Mittlerer IVUS-Grad bei kombinierter Betrachtung von t-PA und AT-III

	t-PA und AT-III < 2.0 (n=22)	t-PA oder AT-III ≥ 2.0 (n=22)	t-PA und AT-III ≥ 2.0 (n=6)
IVUS-mean	4.7 ± 1.3	3.9 ± 1.8	3.9 ± 1.7

p = 0.093 (U-Test n. Mann/Whitney)

4.3.5.3 Dobutaminbelastungsechokardiographie

ICAM-1

Für die systolische Wanddickenänderung der linksventrikulären Hinterwand ergaben sich mit grenzwertiger Signifikanz höhere Werte bei den Patienten mit starker ICAM-1-Anfärbung, und zwar sowohl in Ruhe als auch unter Dobutaminbelastung. Für das interventrikuläre Septum konnte dieser Zusammenhang nur unter Belastung nachgewiesen werden.

Die folgenden beiden Tabellen stellen die entsprechenden Daten, getrennt nach Ruhe- und Belastungsbedingungen, dar:

Tabelle 19: Verkürzungsfraktion, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore in Abhängigkeit von der Anfärbungsintensität für ICAM (Ruhebedingungen)

	ICAM < 2.0 (n=46)	ICAM ≥ 2.0 (n=19)	Signifikanzn. p
FS (%)	34.6 ± 6.6	35.4 ± 5.6	n.s. °
ΔLHW (%)	48.0 ± 14.4	55.8 ± 12.8	0.050 °
ΔIVS (%)	32.4 ± 12.7	37.0 ± 8.8	n.s. °
WBS	18.5 ± 3.7	17.7 ± 3.5	n.s. *

FS: Verkürzungsfraktion

ΔLHW: systolische Wanddickenänderung der linksventr. Hinterwand

ΔIVS: systolische Wanddickenänderung des interventr. Septums;

WBS: Wandbewegungsscore

°: t-Test für unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

Tabelle 20: Verkürzungsfraktion, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore in Abhängigkeit von der Anfärbungsintensität für ICAM (Belastungsbedingungen)

	ICAM < 2.0 (n=46)	ICAM ≥ 2.0 (n=19)	Signifikanzn. p
FS (%)	46.5 ± 7.5	50.3 ± 7.4	n.s. °
ΔLHW (%)	78.1 ± 22.1	89.3 ± 14.7	0.052 °
ΔIVS (%)	52.6 ± 16.8	64.4 ± 15.8	0.014 °
WBS	19.5 ± 4.7	17.9 ± 2.7	n.s. *

°: t-Test für unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

Folgende Box-Plot-Diagramme verdeutlichen die unterschiedliche Verteilung der oben genannten auffälligen stressechokardiographischen Parameter für die Subgruppen ICAM < 2.0 und ICAM \geq 2.0 :

Abbildung 11: Systolische Wanddickenänderungen der linksventrikulären Hinterwand unter Ruhebedingungen in Abhängigkeit von der ICAM-1-Anfärbungsintensität

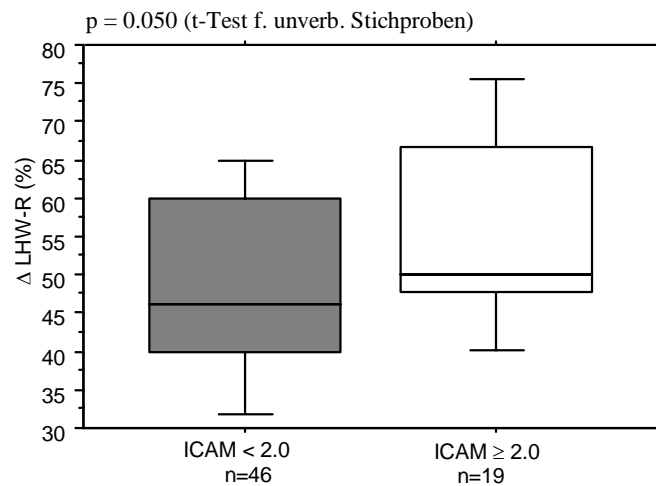


Abbildung 12: Systolische Wanddickenänderungen der linksventrikulären Hinterwand unter Dobutaminbelastung in Abhängigkeit von der ICAM-1-Anfärbungsintensität

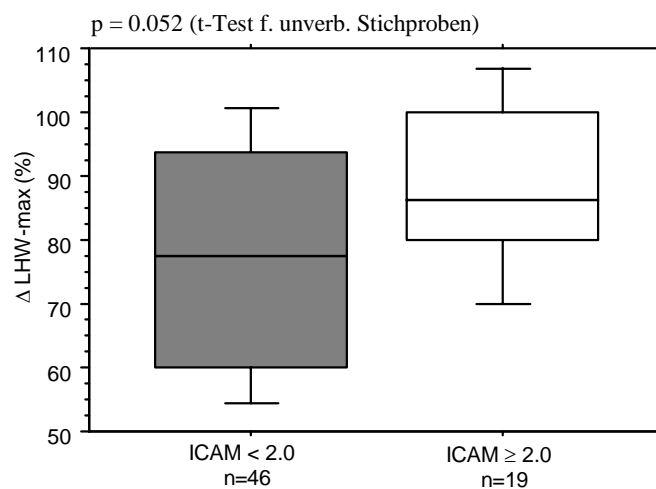
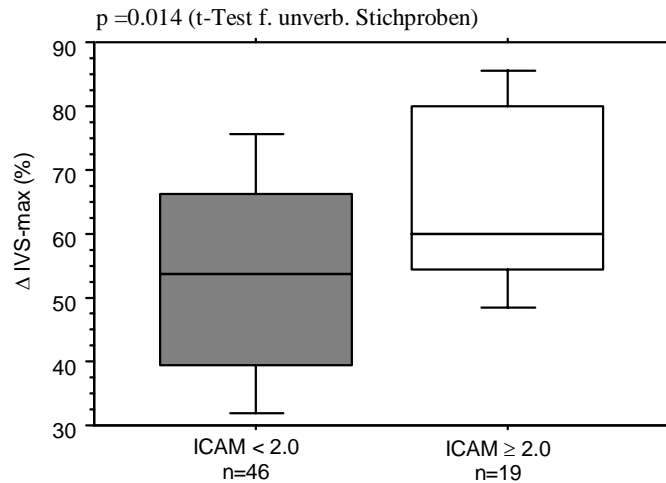


Abbildung 13: Systolische Wanddickenänderungen des interventrikulären Septums unter Dobutaminbelastung in Abhängigkeit von der ICAM-1-Anfärbungsintensität



t-PA

Es fand sich eine signifikante statistische Abhängigkeit zwischen der t-PA-Anfärbungsintensität und der systolischen Wanddickenänderung der linksventrikulären Hinterwand, und zwar sowohl in Ruhe als auch unter Dobutaminbelastung. Bei Patienten mit t-PA-Depletion war eine signifikant niedrigere Wanddickenänderung zu verzeichnen.

Für die übrigen stressechokardiographischen Parameter zeigte sich keine Abhängigkeit von der t-PA-Anfärbungsintensität.

Tabelle 21: Verkürzungsfraktion, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore in Abhängigkeit von der Anfärbungsintensität für t-PA (Ruhebedingungen)

	t-PA < 2.0 (n=40)	t-PA ≥ 2.0 (n=21)	Signifikanzn. p
FS (%)	34.0 ± 6.6	35.8 ± 5.0	n.s. °
ΔLHW (%)	47.1 ± 15.1	54.7 ± 11.1	0.047 °
ΔIVS (%)	33.1 ± 13.6	34.4 ± 8.3	n.s. °
WBS	18.7 ± 4.1	17.5 ± 2.5	n.s. *

°: t-Test f. unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann-Whitney

Tabelle 22: Verkürzungsfraktion, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore in Abhängigkeit von der Anfärbungsintensität für t-PA (Belastungsbedingungen)

	t-PA < 2.0 (n=40)	t-PA ≥ 2.0 (n=21)	Signifikanzn. p
FS (%)	46.6 ± 8.0	49.0 ± 5.7	n.s. °
ΔLHW (%)	76.1 ± 20.3	88.5 ± 19.1	0.025 °
ΔIVS (%)	54.4 ± 17.5	57.0 ± 15.1	n.s. °
WBS	19.4 ± 4.7	18.3 ± 3.6	n.s. *

°: t-Test f. unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

Die Verteilung der auffälligen stressechokardiographischen Parameter für die Subgruppen t-PA < 2.0 und t-PA ≥ 2.0 veranschaulichen folgende Box-Plot-Diagramme:

Abbildung 14: Systolische Wanddickenänderungen der linksventrikulären Hinterwand unter Ruhebedingungen in Abhängigkeit von der t-PA-Anfärbungsintensität

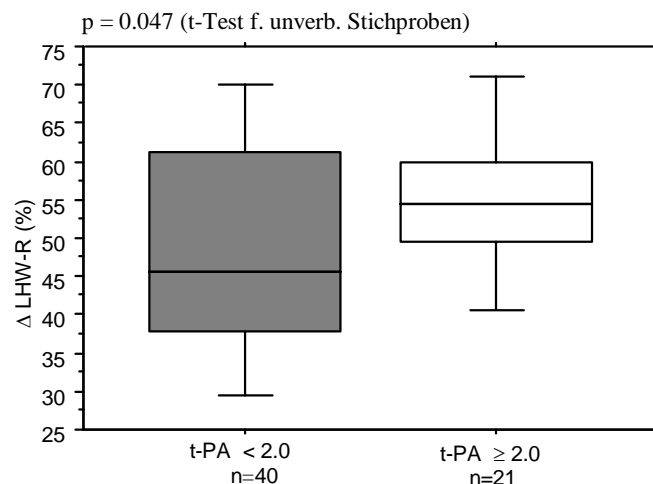
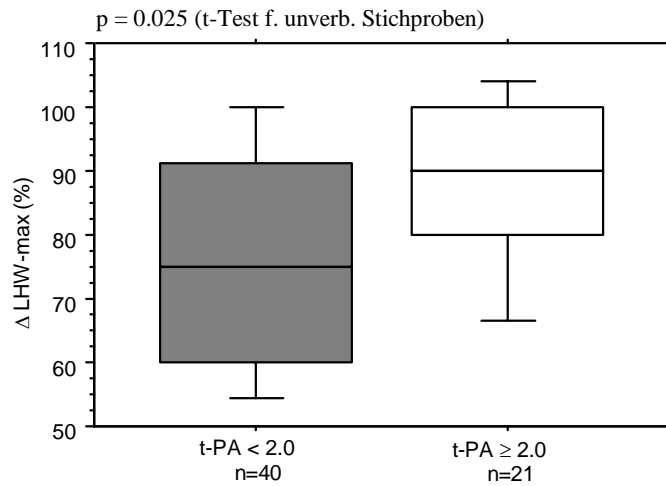


Abbildung 15: Systolische Wanddickenänderungen der linksventrikulären Hinterwand unter Dobutaminbelastung in Abhängigkeit von der t-PA-Anfärbungsintensität



Fibrin

Für alle untersuchten stresschokardiographischen Parameter konnte kein relevanter Zusammenhang mit der Fibrin-Anfärbungsintensität gefunden werden.

Tabelle 23: Verkürzungsfraction, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore in Abhängigkeit von der Anfärbungsintensität für Fibrin (Ruhebedingungen)

	Fibrin < 1.0 (n=36)	Fibrin ≥ 1.0 (n=24)	Signifikanzn. p
FS (%)	35.6 ± 5.8	34.4 ± 6.5	n.s. °
Δ LHW (%)	50.3 ± 13.8	52.1 ± 14.9	n.s. °
Δ IVS (%)	34.2 ± 10.1	34.0 ± 13.6	n.s. °
WBS	17.9 ± 3.0	18.4 ± 4.3	n.s. *

°: t-Test f. unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

Tabelle 24: Verkürzungsfraction, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore in Abhängigkeit von der Anfärbungsintensität für Fibrin (Belastungsbedingungen)

	Fibrin < 1.0 (n=36)	Fibrin ≥ 1.0 (n=24)	Signifikanzn. p
FS (%)	48.5 ± 7.0	46.8 ± 8.5	n.s. °
Δ LHW (%)	81.4 ± 22.9	82.1 ± 19.0	n.s. °
Δ IVS (%)	57.8 ± 16.3	54.4 ± 17.5	n.s. °
WBS	18.9 ± 4.3	18.5 ± 3.9	n.s. *

°: t-Test f. unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

Antithrombin-III

Wie den folgenden beiden Tabellen zu entnehmen ist, war bei Patienten mit AT-III-Depletion ein leichter Trend zu niedrigeren systolischen Wanddickenänderungen und höheren Wandbewegungsscores erkennbar. Dies galt sowohl für Ruhe- als auch Belastungsbedingungen. Die Unterschiede waren allerdings für keinen der untersuchten Parameter signifikant.

Tabelle 25: Verkürzungsfraction, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore in Abhängigkeit von der AT-III-Anfärbungsintensität (Ruhebedingungen)

	AT III < 2.0 (n=41)	AT III ≥ 2.0 (n=20)	Signifikanzn. p
FS (%)	34.3 ± 6.4	36.0 ± 4.4	n.s. °
Δ LHW (%)	49.2 ± 14.6	53.7 ± 14.0	n.s. °
Δ IVS (%)	33.3 ± 12.0	37.2 ± 9.0	n.s. °
WBS	18.4 ± 4.0	17.7 ± 2.9	n.s. *

°: t-Test f. unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

Tabelle 26: Verkürzungsfraktion, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore in Abhängigkeit von der AT-III-Anfärbungsintensität (Belastungsbedingungen)

	AT III < 2.0 (n=41)	AT III ≥ 2.0 (n=20)	Signifikanzn. p
FS (%)	47.4 ± 7.6	48.5 ± 7.3	n.s. °
ΔLHW (%)	80.1 ± 20.6	83.6 ± 23.4	n.s. °
ΔIVS (%)	56.8 ± 18.2	58.0 ± 12.8	n.s. °
WBS	19.0 ± 4.2	18.2 ± 4.0	n.s. *

°: t-Test f. unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

Kombinierte Analyse von t-PA und AT-III

Für die Wanddickenänderungen der linksventrikulären Hinterwand ergaben sich mit grenzwertiger Signifikanz sowohl unter Ruhe- als auch Belastungsbedingungen schlechtere Werte bei den Patienten mit konkordanter Depletion an t-PA und AT-III. Im Bereich des interventrikulären Septums fand sich diesbezüglich lediglich ein leichter Trend zu schlechteren Werten.

Tabelle 27: Verkürzungsfraktion, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore bei kombinierter Analyse von t-PA und AT-III (Ruhebedingungen)

	t-PA und AT III < 2.0 (n=24)	t-PA oder AT III ≥ 2.0 (n=30)	t-PA und AT-III ≥ 2.0 (n=6)	Signifikanzn. p
FS (%)	33.8 ± 7.1	35.4 ± 5.6	37.1 ± 5.4	n.s. °
ΔLHW (%)	46.0 ± 15.9	52.8 ± 12.6	59.4 ± 16.8	0.063 °
ΔIVS (%)	32.4 ± 14.2	34.5 ± 9.9	38.4 ± 5.0	n.s. °
WBS	19.4 ± 4.6	17.5 ± 2.4	18.9 ± 3.8	n.s. *

°: t-Test f. unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

Tabelle 28 : Verkürzungsfraction, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscore bei kombinierter Analyse von t-PA und AT-III (Belastungsbedingungen)

	t-PA und AT III < 2.0 (n=24)	t-PA oder AT III ≥ 2.0 (n=30)	t-PA und AT-III ≥ 2.0 (n=6)	Signifikanzn. p
FS (%)	45.6 ± 8.1	48.9 ± 7.0	46.7 ± 7.2	n.s. °
ΔLHW (%)	74.9 ± 21.3	85.1 ± 19.7	92.0 ± 30.6	0.054 °
ΔIVS (%)	54.1 ± 18.0	57.2 ± 16.6	58.3 ± 10.6	n.s. °
WBS	20.0 ± 4.8	18.3 ± 3.7	19.4 ± 4.4	n.s. *

°: t-Test f. unverbundene Stichproben; *: U-Test n. Mann/Whitney

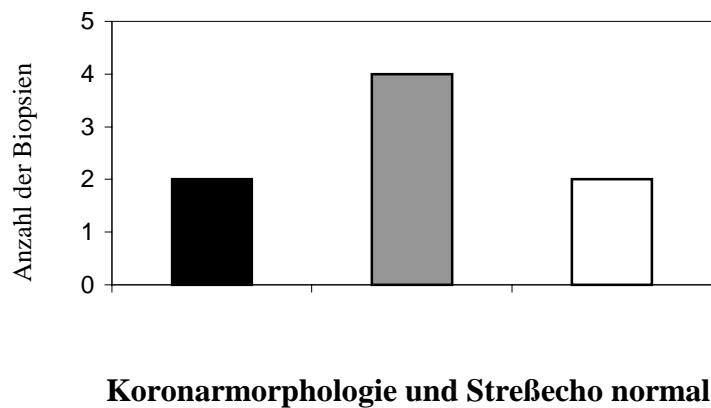
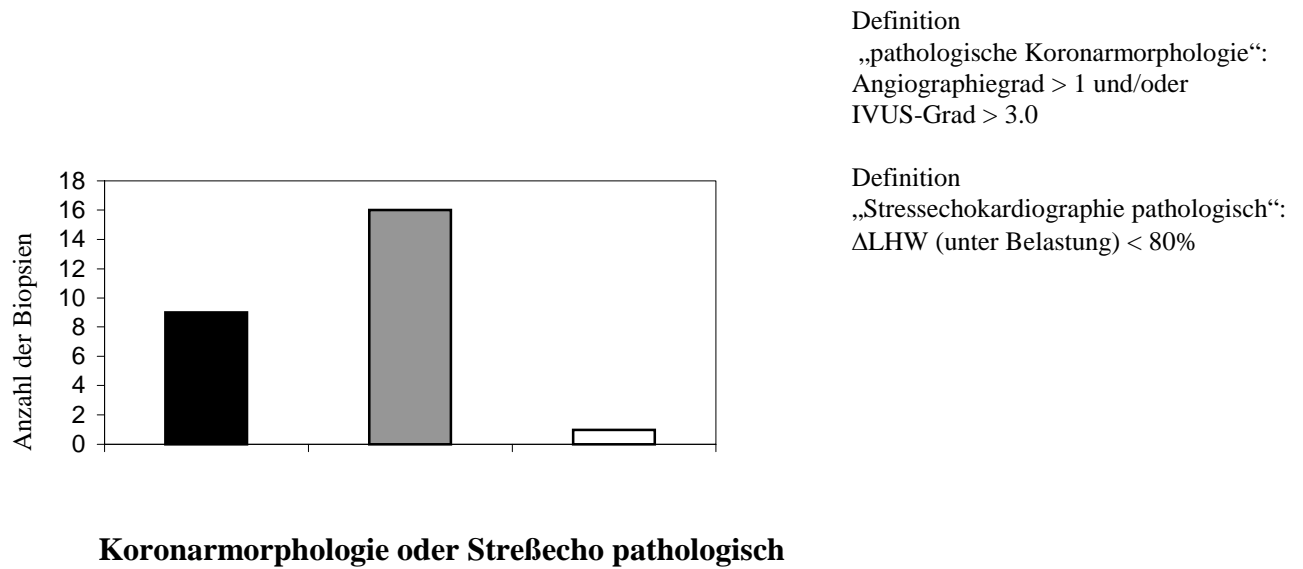
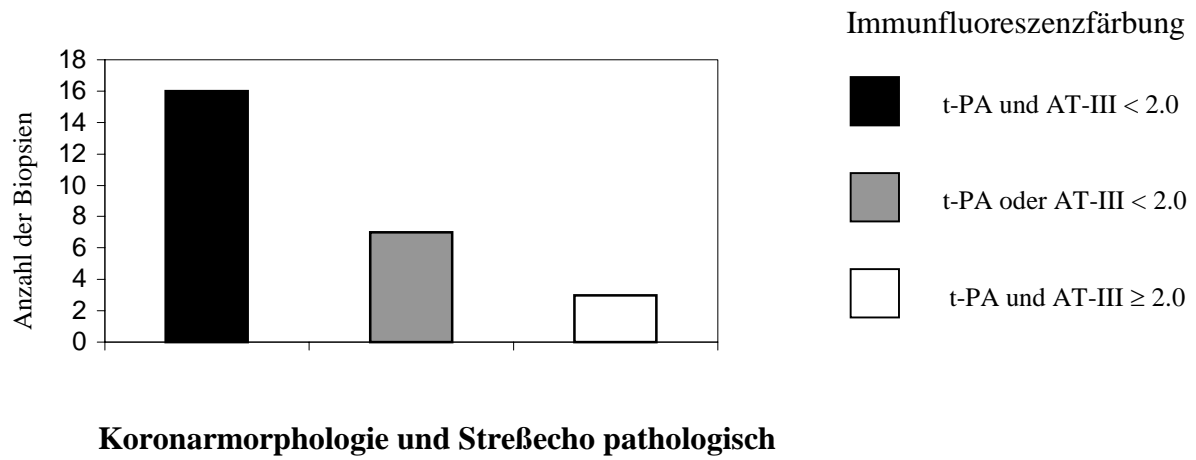
t-PA und AT-III im Vergleich zur Kombination von Koronarmorphologie und Stressechokardiographie

Der Vergleich der Färbeintensitäten von t-PA und AT-III mit der Kombination der Ergebnisse der morphologischen und funktionellen Untersuchungsmethoden verdeutlichte den Einfluß der Depletion dieser hämostaseologischen Parameter: Bei Patienten, die in einer der koronarmorphologischen Untersuchungsmethoden und in der Stressechokardiographie pathologische Veränderungen aufwiesen, war eine konkordante Depletion von t-PA und AT-III anteilmäßig mit Abstand am häufigsten (62%) nachzuweisen. War nur die Morphologie oder die Stressechokardiographie pathologisch, betrug dieser Anteil lediglich 35%. Patienten mit unauffälligen morphologischen und funktionellen Befunden zeigten nur in 25% der Fälle eine Depletion von t-PA und AT-III.

Als Kriterium für die Bewertung des DSE-Befundes wurde die prozentuale systolische Wanddickenänderung der linksventrikulären Hinterwand unter Belastungsbedingungen herangezogen. Als pathologisch wurden die Befunde gewertet, bei denen die ΔLHW unter dem Mittelwert des gesamten Patientenkollektivs (80%) lag.

Abbildung 16 veranschaulicht die beschriebenen Zusammenhänge (s.nächste Seite).

Abbildung 16: t-PA und AT-III in Abhängigkeit von Koronarmorphologie und DSE



5 Diskussion

5.1 Stellenwert von Endomyokardbiopsien nach Herztransplantation

Nach wie vor stellen regelmäßige histopathologische Untersuchungen von rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien den Goldstandard in der Diagnostik der akuten Transplantatabstoßung nach HTX dar (71); dies gilt auch für Patienten, deren Transplantation bereits viele Jahre zurückliegt (37). Nichtinvasive Methoden konnten bisher keine ausreichende Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der Diagnose einer therapiepflichtigen akuten Abstoßung erbringen (2, 71). Das Risiko schwerwiegender Komplikationen bei der Biopsie wie z.B. der Myokardruptur ist sehr gering (71).

Im Rahmen dieser routinemäßigen Diagnostik entnommene Biopsien können immunhistochemisch untersucht werden, um Informationen über pathologische Veränderungen der koronaren Mikrozirkulation zu gewinnen, die bei der Entstehung der Transplantatvaskulopathie (TVP) eine wesentliche Rolle spielen (21, 103).

Vor der Besprechung der Immunfluoreszenzerggebnisse soll zunächst eine kurze Bewertung der Ergebnisse der verwendeten Referenzmethoden erfolgen.

5.2 Referenzuntersuchungen

Bei einem mittleren Posttransplantationszeitraum von 50 Monaten im untersuchten Patientengut ergab sich bei 44% der Patienten ein pathologisches Koronarangiogramm und bei 83% ein pathologischer Befund im intravaskulären Ultraschall. Dies bestätigt die deutlich geringere Sensitivität der Koronarangiographie in der Diagnostik der TVP, die v.a. auf das histomorphologische Erscheinungsbild der TVP zurückzuführen ist: Besonders langstreckige, diffuse, konzentrische Lumenreduktionen infolge Intimaschwellung sind angiographisch oft nicht zu erkennen (94). Falsch negative Befunde ergeben sich auch häufig bei von der TVP betroffenen Gefäßabschnitten, deren Lumen durch kompensatorische Umbauprozesse, wie dem „vascular remodeling“ (80), noch normal ist (103). Allerdings ist auch die Aussagekraft des intravaskulären Ultraschalls beschränkt; Clausell et al. konnten zeigen, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen histopathologischen Veränderungen im Sinne einer

TVP von kleinen, intramyokardialen, und epikardialen, durch den IVUS beurteilbaren, Gefäßen besteht, wodurch Patienten mit hauptsächlichlicher Beteiligung der intramyokardialen Gefäßabschnitte fälschlicherweise als TVP-negativ diagnostiziert werden können (18).

Die 51 Patienten, die in dieser Studie in den koronarmorphologischen Untersuchungen pathologische Befunde aufwiesen, hatten in der Dobutaminstressechokardiographie (DSE) eine signifikant niedrigere systolische Wanddickenzunahme der linksventrikulären Hinterwand und eine signifikant niedrigere Verkürzungsfraction unter Belastungsbedingungen. Sowohl unter Ruhe- als auch unter Belastungsbedingungen zeigte diese Patientengruppe mit hoher Signifikanz ausgeprägtere Wandbewegungsstörungen. Von den 51 Patienten mit pathologischer Koronarmorphologie wiesen unter Dobutaminbelastung 34 Wandbewegungsstörungen auf; daraus ergibt sich in dieser Studie eine Sensitivität der DSE von 67% gegenüber der Kombination aus Angiographie und IVUS; von den 14 TVP-negativen Patienten fand sich bei 11 ein unauffälliger Stressechobefund und damit eine Spezifität von 79%. Die ermittelten Werte für Sensitivität und Spezifität liegen damit im Bereich vergleichbarer Untersuchungen (89).

Grundsätzliche Einschränkungen der Spezifität der DSE in der Diagnostik der Transplantatvaskulopathie sind zum einen durch hauptsächlichlichen Befall der Mikrozirkulation zu erklären, die der Angiographie- und auch der IVUS-Diagnostik entgehen (18); zum anderen gibt es klare Hinweise darauf, dass bei manchen Patienten Endotheldysfunktion mit beeinträchtigter koronarer Flussreserve einer im IVUS darstellbaren Intimahyperplasie auch vorausgehen kann (27).

Der hohe prädiktive Wert der DSE bezüglich klinischer Komplikationen (89) wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Wandbewegungsanalyse der Patienten mit Komplikationen bestätigt: Verkürzungsfractionen, Wanddickenänderungen und Wandbewegungsscores waren allesamt in Ruhe und unter Belastung bei dieser Patientengruppe signifikant schlechter als bei Patienten ohne kardialen Ereignis.

5.3 Immunfluoreszenz

5.3.1 ICAM-1

5.3.1.1 Färbeergebnisse und Zusammenhang mit klinischen Daten

Die, gegenüber den Normalbefunden, insgesamt deutlich höhere Anfärbungsintensität für das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 in den Biopsien transplantierte Patienten konnte auch in zahlreichen vorangegangenen Studien beobachtet werden (3, 92, 97). Es gibt Hinweise darauf, dass eine dauerhafte Aktivierung endothelialer Adhäsionsmoleküle bereits unmittelbar nach der Transplantation einsetzt (63). Als wesentlicher Auslösemechanismus hierfür wird die Ischämiephase nach der Organentnahme diskutiert, durch die u.a. immunologisch bedeutsame Vorgänge wie Komplementaktivierung, vermehrte Expression von Antigenen des Haupthistokompatibilitätskomplexes und Freisetzung von endothelialen Antigenen mit konsekutiver Bildung antiendothelialer Antikörper initiiert werden (22).

Vielfach wurde eine maximal gesteigerte Expression von ICAM-1 bei manifesten zellulären Abstoßungsreaktionen nachgewiesen (3, 13, 45, 92); innerhalb dieser Arbeit war ein deutliches Abstoßungsgeschehen jedoch ein Ausschlusskriterium. Die Prävalenz von minimalen lymphozytären Infiltraten (ISHLT IA und IB) hatte keinen Einfluß auf die ICAM-1-Anfärbungsintensität.

Betrachtet man die Untergruppe der acht Patienten mit kardialen Komplikationen, muß grundsätzlich die niedrige statistische Aussagefähigkeit aufgrund der geringen Fallzahl beachtet werden. Mit dieser Einschränkung weisen die vom gesamten Patientenkollektiv nicht unterschiedlichen Ergebnisse für ICAM-1 auf eine fehlende klinische Relevanz der ICAM-1-Expression in der koronaren Mikrozirkulation hin, sofern kein akutes zelluläres Abstoßungsgeschehen vorliegt.

5.3.1.2 Zusammenhang mit den koronarmorphologischen Untersuchungen

Eine wesentliche Abhängigkeit zwischen der Anfärbungsintensität von ICAM-1 und dem morphologischen Nachweis einer Transplantatvaskulopathie konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden; es zeigte sich sogar ein tendenzielles Überwiegen von niedrigen Anfärbungsintensitäten bei Patienten mit angiographischen Veränderungen; mit den Ergebnissen des intravaskulären Ultraschalls ergaben sich keine Zusammenhänge.

Die Literaturdaten bezüglich einer Verbindung zwischen der TVP und der Expression von ICAM-1 sind insgesamt uneinheitlich. Tierversuche mit Mäuseklonen mit einem Gendefekt für ICAM-1 lieferten widersprüchliche Ergebnisse (26, 77, 85), ließen jedoch eine wesentliche Rolle von arterieller und arteriolärer ICAM-1-Expression bei der Entstehung einer TVP vermuten. Die Gabe von Antikörpern gegen ICAM-1 führte im Tierexperiment zu einer deutlich geringeren Intimaproliferation in Transplantatherzen (96).

Labarrere et al. konnten zeigen, dass ein Nachweis von ICAM-1 auf koronaren Arterien und Arteriolen innerhalb der ersten drei Monate nach der Transplantation mit einem erhöhten Risiko für das spätere Auftreten einer TVP und einem erhöhten Risiko für kardiale Komplikationen verbunden ist (58); darüber hinaus konnte eine Assoziation dieser gesteigerten ICAM-1-Expression mit vermehrten Fibrinablagerungen und einer Abnahme von t-PA und AT-III in der Mikrozirkulation im Sinne einer prothrombotischen Wirkung aktivierten Endothels gefunden werden; zur Lokalisation von ICAM-1 auf Arterien und Arteriolen verwendete die Arbeitsgruppe von Labarrere spezielle Doppel- und Dreifachantikörper, die in der vorliegenden Studie nicht zur Anwendung kamen. Eine Differenzierung zwischen venöser, kapillärer oder arterieller Anfärbung war hiermit nur bedingt möglich und wurde insbesondere bei der Quantifizierung der Anfärbungsintensität nicht berücksichtigt, da ja auch die TVP einen Krankheitsprozeß darstellt, der sowohl das arterielle als auch das venöse Gefäßbett betrifft (106). Dies ist eine mögliche Erklärung für den fehlenden Zusammenhang der ICAM-1-Anfärbungsintensität mit den IVUS-Befunden und für die nicht vorhandene Korrelation mit den Anfärbungsintensitäten von Antithrombin und Fibrin in dieser Arbeit.

Eine Untersuchung der Arbeitsgruppe von Deng, die in ihrer Immunfluoreszenz-Methodik mit der vorliegenden Studie sehr gut vergleichbar ist, fand ebenfalls keinerlei Zusammenhang zwischen der Expression von ICAM-1 in der koronaren Mikrozirkulation und dem Grad der im IVUS nachgewiesenen Intimahyperplasie (24); außerdem bestätigte sie die eigenen Ergebnisse hinsichtlich einer Unabhängigkeit der ICAM-1-Expression vom Posttransplantationszeitraum, wobei bei Deng nur Patienten eingeschlossen wurden, deren

Transplantation mindestens ein Jahr zurücklag. Patienten mit diagnostizierter TVP wiesen in einer Studie von Campana et al. aus dem Jahr 2000 gegenüber TVP-negativen Patienten keine erhöhten Blutkonzentrationen an zirkulierendem ICAM-1 auf (15).

Das tendenzielle Überwiegen von niedrigen Anfärbungsintensitäten bei den Patienten mit angiographischen Veränderungen und die positive Korrelation mit der t-PA-Färbeintensität sprechen ebenfalls gegen eine Aussagefähigkeit der ICAM-1-Expression im gesamten koronaren Gefäßbett hinsichtlich einer TVP. Ähnlich ist auch das Überwiegen von höheren ICAM-1-Anfärbungsintensitäten bei Herzen jüngerer Organspender zu werten, da jüngere Spenderorgane eher mit einer geringeren Ausprägung einer TVP verbunden sind (46), wobei hier berücksichtigt werden muß, dass bei älteren Spenderorganen schon zum Zeitpunkt der Transplantation in einem nicht unerheblichen Ausmaß atherosklerotische Koronarveränderungen bestehen (20).

5.3.1.3 Zusammenhang mit der Stressechokardiographie

Stressechokardiographische Daten herztransplantierter Patienten wurden in dieser Arbeit erstmalig mit einem Marker endothelialer Aktivierung in der koronaren Mikrozirkulation verglichen.

Wie bereits eingangs erwähnt wurde, ist eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer unphysiologischen Antwort der Koronargefäße auf Acetylcholin bei herztransplantierten Patienten häufig zu finden, teilweise schon kurze Zeit nach der Transplantation (21, 32). Davis et al. konnten 1996 zeigen, dass koronare Gefäßabschnitte, die wenige Wochen nach der Transplantation Zeichen endothelialer Dysfunktion aufwiesen, nach einem Jahr stärkere Intimaverdickungen entwickelten als Gefäße mit physiologischer Vasomotion (21).

Die hämodynamische Folge der endothelialen Dysfunktion schlägt sich in der Abnahme der koronaren Flussreserve unter körperlicher Belastung nieder, die bereits wenige Monate nach der Transplantation einsetzt und im weiteren Zeitverlauf zunimmt (102).

Bis zu diesem Zeitpunkt existieren keine Untersuchungen, die einen Zusammenhang endothelialer Dysfunktion mit Markern endothelialer Aktivierung, insbesondere mit ICAM-1, zum Thema haben. Ebenso wenig sind stressechokardiographische Daten in Abhängigkeit endothelialer Dysfunktion bei herztransplantierten Patienten vorhanden.

Unter der Vorstellung, dass sowohl die vermehrte Expression von ICAM-1 als auch die endotheliale Dysfunktion gemeinsamer Ausdruck eines endothelialen „Alarmzustandes“ sind,

wäre letztendlich eine Verschlechterung der koronaren Durchblutungssituation unter Belastungsbedingungen bei zunehmender ICAM-1-Anfärbungsintensität zu postulieren.

Diese Überlegung wird durch die eigenen Ergebnisse allerdings nicht bestätigt. Eine Einschränkung myokardialer Funktionsparameter bei höheren Anfärbungsintensitäten wurde nicht beobachtet. Dies steht im Einklang zu den übrigen gefundenen Daten, die ebenfalls gegen eine klinische und funktionelle Relevanz der ICAM-1-Expression in der koronaren Mikrozirkulation sprechen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die isolierte Betrachtung der arteriellen und arteriolären ICAM-1-Expression, deren klinische Bedeutung hinsichtlich der TVP bereits diskutiert wurde (58).

Die besseren Werte für die systolischen Wanddickenänderungen bei den Patienten mit höheren Anfärbungsintensitäten für ICAM-1 dürften sich zumindest teilweise durch das Überwiegen jüngerer Spenderherzen bei den hohen Anfärbungsintensitäten für ICAM-1 erklären lassen, da bei diesen tendenziell größere systolische Wanddickenänderungen nachzuweisen waren.

5.3.2 t-PA, Fibrin und AT-III als Marker der lokalen Blutgerinnung, Fibrinolyse und Antikoagulation

Wegen ihres engen funktionellen Zusammenhanges sollen die Ergebnisse der untersuchten hämostaseologischen Parameter gemeinsam diskutiert werden.

5.3.2.1 Färbeergebnisse und Zusammenhang mit klinischen Daten

Die prinzipiellen Veränderungen der Anfärbungsmuster von t-PA, Fibrin und AT-III gegenüber den Normalbefunden decken sich mit den Beobachtungen anderer Autoren (7, 30, 31), wobei vergleichbare immunfluoreszenzmikroskopische Daten im Wesentlichen nur von der Arbeitsgruppe um Labarrere und Faulk existieren.

Deren umfassende prospektive Studien mit einer sehr hohen Anzahl an untersuchten Endomyokardbiopsien wiesen auf eine enge Beziehung der drei Marker hin: Sowohl die Depletion von t-PA, als auch die Depletion von AT-III waren mit dem Vorhandensein von Fibrindepositionen in der koronaren Mikrozirkulation assoziiert (30, 31, 56, 59). Dieser Zusammenhang ist durch die enge funktionelle Verbundenheit von antikoagulatorischem und fibrinolytischen System erklärbar: Eine verminderte AT-III-Expression führt über eine verstärkte Thrombinbildung zu zunehmender Fibrindeposition; Thrombin wiederum

stimuliert die Freisetzung von t-PA (108) und löst damit eine Depletion der zellulären t-PA-Reservoirs aus (59). Für die Lokalisation von Antithrombin-III im gesunden Herzen fanden Faulk und Labarrere ein charakteristisches Verteilungsmuster (30): In kleinen Arterien und Arteriolen ist AT-III an glatten Gefäßmuskelzellen und in der Gefäßintima nachzuweisen, in Venen und Venolen ist es an Endothelzellen gebunden. Im Bereich der Kapillaren konnte kein AT-III nachgewiesen werden. An transplantierten Herzen konnten vier verschiedene Verteilungstypen für AT-III identifiziert werden (30): Typ 1 entsprach der Verteilung im gesunden Herzen, beim zweiten Typ fehlte AT-III-Reaktivität im Bereich der Venolen und Venen. Typ 3 wies eine starke Verminderung bzw. völliges Fehlen von AT-III im Bereich aller Gefäßkomponenten auf und beim vierten Verteilungstyp konnte neben den im gesunden Herzen reaktiven Gebieten auch noch AT-III-Reaktivität am Kapillarendothel gefunden werden. Klinisch stabile Transplantatherzen zeigten eine eindeutige Korrelation mit der Typ-1-Verteilung, wohingegen die Typ-3-Verteilung mit einem schlechten klinischen Verlauf und häufigem Transplantatversagen assoziiert war (30). Bezüglich des zweiten Verteilungstyps konnte keine Korrelation mit dem klinischen Verlauf gefunden werden. Die Entwicklung von kapillarer AT-III-Reaktivität nahm häufig von einer insgesamt stark verminderten Reaktivität (Typ 3) ihren Ausgang und war eindeutig mit einem Überlebensvorteil im Vergleich zu den Patienten mit definitiver Typ-3-Verteilung assoziiert.

Betrachtet man die Korrelationen der einzelnen hämostaseologischen Parameter in der vorliegenden Arbeit, so bestätigte sich lediglich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Untergruppen mit deutlicher Depletion von t-PA und AT-III (Färbintensität < 1.0). Fibrin korrelierte mit keinem dieser beiden Parameter. Mögliche Ursachen für diese Abweichungen von den Ergebnissen von Labarrere et al. sind zum einen die bei diesem erheblich höhere Anzahl untersuchter Endomyokardbiopsien (s. auch 59); pro Patient wurden dort im Verlauf durchschnittlich 15 Biopsien gefärbt. Zu jedem Patienten stand darüber hinaus eine Endomyokardbiopsie unmittelbar vor der Transplantation zur Verfügung, deren Anfärbungsintensität den Ausgangswert bzw. Normalbefund darstellte. Damit war sicherlich eine individuellere Beurteilung von Anfärbungsintensitäten und vor allem auch von deren Veränderungen im zeitlichen Verlauf möglich. Zum anderen berücksichtigte Labarrere bei der Quantifizierung der t-PA-Expression nur die Reaktivität glatter Muskelzellen von Arteriolen, die durch Ko-Färbung mit α -Aktin selektiv beurteilt werden konnten (59, 60). Kapilläre und endotheliale Reaktivität flossen somit, im Gegensatz zur vorliegenden Studie, in keiner Weise in die Bewertung mit ein.

Bezüglich einer zeitlichen Abhängigkeit der Anfärbungsintensitäten nach HTX ergab sich in der Tendenz eine Abnahme von Fibrin mit steigendem Posttransplantationszeitraum, wobei in den ersten achtzehn Monaten post HTX besonders starke Fibrindepositionen, verbunden mit einer, in diesem Zeitraum, tendenziell ausgeprägteren t-PA-Depletion, beobachtet wurden. Für AT-III konnten keine statistisch auffälligen Veränderungen mit dem zeitlichen Verlauf nach HTX gefunden werden. Labarrere stellte in seinen Untersuchungen fest, dass sowohl die Depletion von arteriolärem t-PA als auch die Deposition von Fibrin in den meisten Fällen bereits in den ersten Wochen nach der Transplantation ablaufen, und sich im weiteren Verlauf die Anfärbungsintensitäten für arterioläres t-PA und für Fibrin bei den betroffenen Patienten häufig nicht mehr wesentlich ändern; in manchen Fällen wurde jedoch eine Restitution von arteriolärem t-PA bzw. die Ausbildung t-PA-reaktiver Endothelzellen von Kapillaren und Venolen beobachtet (56, 59). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte keinen Zusammenhang zwischen Fibrindeposition und Zeitdauer post HTX feststellen (7). Bei allen verglichenen Studien war der durchschnittliche Posttransplantationszeitraum aber deutlich kürzer als in dieser Untersuchung. Der Verlust an vaskulärem Antithrombin scheint ebenfalls sehr schnell nach der Transplantation stattzufinden; die Entwicklung von antithrombin-reaktiven Kapillaren erwies sich jedoch als langsamer Prozeß, der bei manchen Patienten mehrere Jahre in Anspruch nehmen kann (30).

Minimale zelluläre Abstoßung (Grad IA, IB nach ISHLT) war im Trend mit stärkerer Fibrindeposition assoziiert. Diese Beobachtung wird durch Literaturdaten bestätigt, die eine Zunahme von Fibrinablagerungen bei akuter zellulärer Abstoßung gezeigt haben (6, 40, 82). Ursächlich hierfür soll die bei Abstoßungsreaktionen vorhandene Komplementaktivierung sein (6).

Die Färbeergebnisse von AT-III und t-PA blieben vom Vorhandensein einer minimalen zellulären Abstoßung unbeeinflusst. Labarrere erwähnt in einer Arbeit eine signifikant höhere Depletion an t-PA mit steigender Anzahl durchgemachter schwerer Abstoßungsreaktionen (61); eine seiner früheren Untersuchungen erbrachte allerdings keinen Zusammenhang (59). Eine neuere Studie einer australischen Arbeitsgruppe konnte eine vermehrte Depletion von Antithrombin III bei zellulärer Abstoßung nachweisen (82).

Die insgesamt uneinheitliche Datenlage lässt zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen den Schluß zu, dass die untersuchten hämostaseologischen Parameter, und hier vor allen Dingen Fibrin, auch schon von leichtgradigen zellulären Abstoßungsreaktionen beeinflusst werden können, wodurch deren Bewertung für die TVP-Diagnostik erschwert werden kann.

Bei den Patienten, die im Beobachtungszeitraum interventionspflichtige Komplikationen (PTCA, Retransplantation, dekompensierte Herzinsuffizienz) aufgrund einer ausgeprägten Transplantatvaskulopathie entwickelten, konnten zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede in deren Färbeintensitäten beobachtet werden; ausgeprägte Fibrindepositionen und t-PA-Depletion ließen sich aber überdurchschnittlich häufig feststellen. Die Sinnhaftigkeit statistischer Aussagen ist bei der sehr kleinen Fallzahl – Antithrombin-Anfärbung konnte sogar nur bei sechs der acht Patienten ausgewertet werden – aber sehr fragwürdig. In seinen großen Verlaufsuntersuchungen konnte Labarrere für die Patienten, die innerhalb der ersten drei Monate post HTX Fibrindepositionen oder Depletion von t-PA oder AT-III aufwiesen, auch ein erhöhtes Risiko für spätere klinische Komplikationen, wie Retransplantation oder Tod, zeigen.

5.3.2.2 Zusammenhang mit den koronarmorphologischen Untersuchungen

Beim Vergleich der Färbeergebnisse von t-PA, Fibrin und AT-III mit den Befunden der koronarmorphologischen Untersuchungsmethoden zeigte sich eine völlige Unabhängigkeit dieser drei Marker von den Angiographieergebnissen. Dies steht zunächst im Gegensatz zu den Resultaten von Labarrere et al., der einen klaren Zusammenhang zwischen Fibrindeposition, Depletion von t-PA und AT-III, und dem Ausmaß von angiographischen Veränderungen feststellen konnte. Labarrere setzte aber in der Regel nur immunhistochemische Befunde aus den ersten drei Monaten post HTX mit später auftretenden pathologischen Angiographiebefunden in Beziehung (30, 56, 59, 61) und konnte damit nachweisen, dass frühzeitige Veränderungen der besagten Parameter mit einem erhöhten Risiko für das spätere Auftreten einer TVP verbunden sind. Er verglich aber nicht Biopsieuntersuchungen der Spätphase nach HTX mit zeitgleichen Koronarangiographien.

Wie bereits oben erwähnt, kann es Monate bis Jahre nach der Transplantation zu neuer kapillärer t-PA- und AT-III-Reaktivität und Restitution arteriolärer t-PA-Reaktivität mit konsekutiver Abnahme von Fibrinablagerungen kommen (30, 59). Letztgenannter Mechanismus könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit die Färbeintensitäten für Fibrin mit steigendem Posttransplantationszeitraum eher ab-, und für t-PA eher zunahm. Dies spricht insgesamt dafür, dass bei bereits angiographisch nachweisbaren, im Zeitablauf also eher später auftretenden Manifestationen der TVP, t-PA und AT-III keine wegweisenden diagnostischen Hinweise liefern.

Die Untersuchungsbefunde des intravaskulären Ultraschall wurden in dieser Studie erstmals mit dem immunhistochemischen Nachweis von t-PA, Fibrin und AT-III verglichen: Hier konnte eine signifikant stärkere Intimahyperplasie bei den Patienten mit AT-III-Depletion festgestellt werden; bei den Färberegebnissen von t-PA ergab sich ein Trend in dieselbe Richtung, der bei ausgeprägter Depletion am stärksten war. Ein entsprechender Zusammenhang zwischen Intimaverdickung und Fibrindepositionen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden; hohe Anfärbungsintensitäten für Fibrin waren tendenziell sogar eher mit weniger pathologischen Werten im IVUS verbunden. Dies lässt sich aber durch das Überwiegen kurzer Posttransplantationszeiten bei den Patienten mit starken Fibrindepositionen erklären, da der IVUS-Grad eng mit der Zeit post HTX assoziiert ist (110). Die Interpretation dieser Befunde soll weiter unten erfolgen.

5.3.2.3 Zusammenhang mit der Stressechokardiographie

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Korrelation von Daten einer funktionellen kardiologischen Untersuchungsmethode mit dem immunhistochemischen Nachweis von t-PA, Fibrin und AT-III in der koronaren Mikrozirkulation durchgeführt.

Ein wesentlicher Zusammenhang streßechokardiographischer Parameter mit dem Ausmaß von Fibrinablagerungen in der Mikrozirkulation konnte nicht ermittelt werden.

Die aussagefähigsten Ergebnisse ergaben sich bei t-PA: Hier konnten bei den Patienten mit t-PA-Depletion signifikant schlechtere systolische Wanddickenänderungen im Bereich der linken Hinterwand nachgewiesen werden, und zwar sowohl unter Ruhe- als auch Belastungsbedingungen.

AT-III-Depletion hatte ebenfalls eine tendenzielle Verschlechterung vieler streßechokardiographischer Parameter zur Folge, allerdings wurde hier keine Signifikanz erreicht, auch nicht bei der Untergruppe mit ausgeprägter Verminderung der Färbeintensität. Bei der Patientengruppe mit konkordanter Depletion von t-PA und AT-III fand sich, insbesondere im Bereich der linksventrikulären Hinterwand, ein ausgeprägter Trend zu pathologischen Wanddickenänderungen.

Diese Befunde sprechen insgesamt für eine negative Beeinflussung der myokardialen Leistungsfähigkeit durch ein eingeschränktes fibrinolytisches und antikoagulatorisches Potenzial in der koronaren Mikrozirkulation.

5.4 Kritische Interpretation der gefundenen Zusammenhänge, Limitationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass eine Verminderung von t-PA und AT-III in der koronaren Mikrozirkulation sowohl mit morphologischen als auch funktionellen Zeichen einer Transplantatvaskulopathie assoziiert sein kann.

Zunächst sollen methodologische Unsicherheiten diskutiert werden, die möglicherweise eine stärkere statistische Signifikanz der untersuchten Parameter verhindert haben.

Als erheblich limitierend ist in diesem Zusammenhang sicherlich die vergleichsweise niedrige Zahl untersuchter Patienten anzuführen; darüber hinaus waren nicht zu jedem Patienten Daten von allen Referenzuntersuchungen und allen Immunfluoreszenzfärbungen verfügbar, da beispielsweise Artefaktbildung bei der Immunfluoreszenztechnik nicht immer vermeidbar war.

Weiterhin muß die nicht zwischen Anfärbung von Endothelzellen und von glatten Gefäßmuskelzellen differenzierende Immunfluoreszenzmethode als problematisch angesehen werden, besonders im Hinblick auf t-PA. Ausbildung endothelialer t-PA-Reaktivität post HTX scheint nicht Zeichen einer Regeneration von Fibrinolysepotential, sondern eher von aktuell stattfindender Fibrinolyse zu sein (59, 61). Die Mitbewertung von endotheliale t-PA, wie sie in der vorliegenden Arbeit stattgefunden hat, kann also in manchen Fällen zu einer sinngemäß falsch hohen Anfärbungsintensität geführt haben.

Vergleichbares könnte für Biopsien gelten, die sekundär ausgedehnte kapilläre Reaktivität für AT-III entwickelt haben- entsprechend der Typ-IV-Distribution, die Labarrere beschrieben hat (30). Mit der verwendeten Methode der Quantifizierung der Anfärbungsintensität für AT-III ist denkbar, dass bei diesen Biopsien höhere Anfärbungsgrade erreicht wurden als bei den Patienten mit Typ-1-Distribution, für die der positivste klinische Verlauf beschrieben wurde (30).

Fibrin erwies sich in dieser Arbeit in keiner Weise diagnostisch hilfreich. Neben der bereits oben erwähnten Beeinflussung der Färbeergebnisse durch minimale zelluläre Abstoßungsreaktionen muß betont werden, dass sich die quantitative Beurteilung des Anfärbungsgrades von Fibrin mit Abstand am Schwierigsten gestaltete, da die Differenzierung spezifischer Anfärbung und unspezifischer Hintergrundanfärbung bei dem insgesamt diffusen Verteilungsmuster sehr oft problematisch war. Möglicherweise ist die akkurate Beurteilung von Fibrin in der koronaren Mikrozirkulation des Transplantationspatienten nur mit der Verwendung von Mehrfach-Antikörper-Färbungen sinnvoll, die eine prozentuale Quantifizierung reaktiver Kapillaren erlauben (s. auch (59)).

Der fehlende Zusammenhang zwischen der Depletion von AT-III und t-PA mit ausgeprägten angiographischen Veränderungen untermauert Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die gegen einen zwingenden und vor allem zeitgleichen Zusammenhang zwischen morphologischen Veränderungen großer epikardialer Gefäße und Störungen der koronaren Mikrozirkulation sprechen (18, 44, 105); in ähnlicher Hinsicht ist auch die Beobachtung zu werten, dass endotheliale Dysfunktion im Sinne pathologischer Vasomotorik in der koronaren Mikro- und Makrozirkulation nicht konkordant ausgeprägt ist (44). Letztlich scheint es durchaus berechtigt, die Transplantatvaskulopathie der Mikro- und Makrozirkulation als zwei Krankheitsentitäten zu begreifen, die keineswegs parallel ablaufen müssen (105). Ein großer wissenschaftlicher Klärungsbedarf besteht im Hinblick auf pathophysiologische und eventuelle kausale Zusammenhänge zwischen diesen beiden Entitäten (18, 105).

Bei Patienten mit fehlenden angiographischen Veränderungen besteht eine diagnostische Grauzone, insbesondere, wenn keine IVUS-Diagnostik zur Verfügung steht. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass eine modifizierte immunhistochemische Evaluation von t-PA und AT-III im Rahmen der routinemäßig zur Abstoßungsdiagnostik entnommenen rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien ohne jegliche Zusatzbelastung für die Patienten wertvolle Informationen hinsichtlich pathologischer Veränderungen der koronaren Mikrozirkulation liefern könnte, und dass diese Veränderungen auch mit einer Einschränkung der myokardialen Leistungsfähigkeit verbunden sind.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung des Themas und der wesentlichen Ergebnisse

Die Transplantatvaskulopathie (TVP) stellt den wichtigsten Faktor für Morbidität und Mortalität der herztransplantierten Patienten dar, die das erste Jahr nach der Transplantation überleben. Fünf Jahre nach der Transplantation weist beinahe jeder Patient histopathologische Merkmale einer TVP auf.

Als diagnostischer Goldstandard für die TVP wurde die Koronarangiographie weitgehend vom intravaskulären Ultraschall (IVUS) abgelöst, der eine wesentlich höhere Sensitivität hinsichtlich intimaler Veränderungen besitzt (46). Auf der Suche nach weniger invasiven diagnostischen Verfahren erwies sich die Stressechokardiographie mit Dobutamin als gut geeignet, TVP-Patienten mit hoher Spezifität und Sensitivität zu identifizieren (1).

Häufig betrifft die TVP zunächst die koronare Mikrozirkulation, was mit Störungen der lokalen Fibrinolyse und Antikoagulation einhergehen kann: Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Abnahme antithrombotischer Faktoren wie t-PA und AT-III in der koronaren Mikrozirkulation unmittelbar nach HTX mit einem erhöhten Risiko für das spätere Auftreten einer TVP verbunden sein kann (30, 59). Für die Spätphase nach Herztransplantation existieren allerdings bis jetzt noch keine Studien, die entsprechende Veränderungen auf der Ebene der Mikrozirkulation mit zeitgleich erhobenen morphologischen und insbesondere funktionellen Zeichen der TVP vergleichen.

Vor diesem Hintergrund befasste sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Inhalten:

- immunhistochemische Untersuchung von Markern endothelialer Aktivierung, der Fibrinolyse und Antikoagulation bei meist langzeittransplantierten Patienten nach HTX (durchschnittlicher Posttransplantationszeitraum: 50 Monate).
- Korrelation der ermittelten Daten mit Befunden koronarmorphologischer Untersuchungen (Angiographie, IVUS) und der Dobutaminstressechokardiographie.
- Beurteilung, ob routinemäßig entnommene Herzmuskelbiopsien nach HTX neben der Abstoßungsdiagnostik zusätzliche Informationen über ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer TVP liefern können.

In dieser Arbeit wurden Endomyokardbiopsien von 69 Transplantationspatienten mit den Methoden der Immunfluoreszenz angefärbt, fotografiert und ausgewertet. Als Referenz wurde Herzmuskelgewebe von zwei jungen weiblichen Personen untersucht, die bei einem Verkehrsunfall ums Leben kamen und bei denen keine Herzerkrankungen bekannt waren. Es mussten insgesamt deutlich mehr als 1000 Färbepreparate befundet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einem hohen Anteil der HTX-Patienten eine Verminderung von t-PA, AT-III, oder von beiden Parametern in der koronaren Mikrozirkulation besteht. Eine Abhängigkeit zwischen t-PA/AT-III-Depletion und den Befunden der Koronarangiographie konnte nicht ermittelt werden, es ergaben sich jedoch Zusammenhänge mit den Ergebnissen des IVUS und der Stressechokardiographie. T-PA-Depletion korrelierte besonders stark mit einer Verminderung der systolischen Wanddickenänderungen der linksventrikulären Hinterwand, wohingegen herabgesetzte AT-III-Anfärbungsintensität insbesondere mit vermehrter Intimaverdickung im IVUS assoziiert war.

Für die Beurteilung der prognostischen Wertigkeit dieser Befunde wären Untersuchungen mit größerer Fallzahl sinnvoll; sollten sich hiermit die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, könnte eine Evaluierung von t-PA und AT-III im Rahmen der für die Abstoßungsdiagnostik routinemäßig durchgeführten Biopsieentnahmen wertvolle Hinweise bezüglich einer sich entwickelnden TVP liefern, insbesondere, wenn die Koronarangiographie unauffällig ist. In Kombination mit den Befunden aus der Stressechokardiographie (s. auch (89)) wäre auch eine entsprechend modifizierte Verwendung von invasiver koronarmorphologischer Diagnostik denkbar.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung des interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) fand sich insgesamt, im Vergleich zu den Normalbefunden, eine deutlich gesteigerte Anfärbung bei den Transplantationspatienten. Ein Zusammenhang mit Zeichen der Transplantatvaskulopathie ergab sich jedoch nicht; vermehrte Expression von ICAM-1 in der Spätphase nach HTX scheint ein unspezifisches Zeichen endothelialer Aktivierung darzustellen.

6.2 Ausblick

Die Pathogenese der Transplantatvaskulopathie stellt einen komplexen, vielschichtigen Prozeß dar, bei dem insbesondere kausale Beziehungen endothel-assoziiierter Mechanismen noch weitgehend unklar sind.

Die immunhistochemische Evaluierung von t-PA und AT-III in routinemäßig entnommenen Endomyokardbiopsien könnte dazu beitragen, wertvolle Hinweise auf das Vorliegen von pathologischen Vorgängen auf der Ebene der koronaren Mikrozirkulation zu gewinnen, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer TVP verbunden sind. Im Zusammenhang mit funktionellen und morphologischen Untersuchungen wäre hiermit eventuell eine bessere Prognosebeurteilung und eine entsprechende Modifikation von invasiven Screening-Untersuchungen möglich.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmstoff
AT-III	Antithrombin III
Aza	Azathioprin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calciumantagonist
CyA	Cyclosporin A
Diu	Diuretikum
DSE	Dobutaminstressechokardiographie
Δ IVS	Systolische Wanddickenänderung des interventrikulären Septums
Δ LHW	Systolische Wanddickenänderung der linksventrikulären Hinterwand
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EKG	Elektrokardiogramm
ELAM	Endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FS	Systolische Verkürzungsfraction
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HTX	Herztransplantation
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IgG	Immunglobulin der Klasse G
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
IVSed	Enddiastolische Dicke des interventrikulären Septums
IVSes	Endsystolische Dicke des interventrikulären Septums
LVED	Enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels
LVes	Endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHz	Megahertz
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PLA	Parasternale Längsachse
Pred	Methylprednisolon
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
Tacro	Tacrolimus
TVP	Transplantatvaskulopathie
t-PA	Gewebs-Plasminogen-Aktivator
UKG	Ultraschalluntersuchung des Herzens
WBS	Wandbewegungsscore
WBW	Wandbewegungswerte
ZNS	Zentralnervensystem

7.2 Literaturverzeichnis

1. Akosah K.O., Mohanty P.K., Funai J.T., Jesse R.L., Minisi A.J., Crandall C.W., Kirchberg D., Guerraty A., Salter D.
Noninvasive detection of transplant artery disease by dobutamine stress echocardiography.
J Heart Lung Transplant: 1994; 13: 1024-1038
2. Alexis J.D., Lao C.D., Selter J.G., Courtney M.C., Correa D.K., Lansman S.L., Kushawa S.S., Gass A.L.
Cardiac Troponin T: a noninvasive marker for heart transplant rejection?
J Heart Lung Transplant: 1998; 17: 395-398
3. Allen M.D., McDonald T.O., Carlos T., Himes V., Fishbein D., Aziz S., Gordon D.
Endothelial adhesion molecules in heart transplantation.
J Heart Lung Transplant: 1992; 11(suppl.): 8-13
4. Anderson T.J., Meredith I.T., Uehata A., Mudge G.H., Selwyn A.P., Ganz P., Yeung A.C.
Functional significance of intimal thickening as detected by intravascular ultrasound early and late after cardiac transplantation.
Circulation: 1993; 88: 1093-1100
5. Bach D.S., Hepner A., Marcovitz P.A., Armstrong W.F.
Dobutamine stress echocardiography: prevalence of a nonischemic response in a low risk population.
Am Heart J: 1993; 125: 1257-1261
6. Baldwin I., William M.
Complement in organ transplantation.
Transplantation: 1995; 59: 797-808

7. Behr T.M., Feucht H.E., Richter K., Spes C.H., Pongratz D., Überfuhr P., Meiser B., Theisen K., Angermann C.E.
Detection of humoral rejection in human cardiac allografts by assessing the capillary deposition of complement fragment C4d in endomyocardial biopsies.
J Heart Lung Transplant 1999; 18: 904-912
8. Berwing K., Friedl A., Huth C., Schwarz T., Klövekorn W.-P., Schlepper M.
Doppler-und echokardiographische Parameter zum Nachweis akuter Abstossungen nach Herztransplantation.
Z Kardiol: 1994; 83: 225-233
9. Billingham M.E.
Histopathology of graft coronary disease.
J Heart Lung Transplant: 1992; 11: 38-44
10. Billingham M.E.
A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: heart rejection study group.
The Journal of Heart Transplantation: 1990; 9: 587-593
11. Böck P. (Hrsg.)
Romeis: Mikroskopische Technik.
17. neubearbeitete Auflage, 1989
12. Bonnaud E.N., Lewis N.P., Masek M.A., Billingham M.E.
Reliability and usefulness of immunofluorescence in heart transplantation.
J Heart Lung Transplant: 1995; 14: 163-171
13. Briscoe D.M., Schoen F.J., Rice G.E., Bevilacqua M.P., Ganz P., Pober J.S.
Induced expression of endothelial-leukocyte adhesion molecules in human cardiac allografts.
Transplantation: 1991; 51: 537-547

14. Brutsaert D.L., de Keulenaer G.W., Fransen P., Mohan P., Kaluza G.L., Andries L.J., Rouleau J.-L., Sys S.U.
The cardiac endothelium : Functional morphology, development, and physiology.
Prog Cardiovasc Dis: 1996; 39: 239-262
15. Campana E., Parlapiano C., Borgia M.C., Papalia U., Laurenti A., Pantone P., Giovanniello T., Marangi M., Sanguigni S.
Are elevated levels of soluble ICAM-1 a marker of chronic graft disease in heart transplant recipients?
Atherosclerosis: 2000; 148: 293-295
16. Carlos T., Kovach N., Schwartz B., Rosa M., Newman B., Wayner E., Benjamin C., Osborn L., Lobb R., Harlan J.
Human monocyte bind to two cytokine-induced adhesive ligands on cultured human endothelial cells: endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1.
Blood: 1991; 77: 2266-2271
17. Ciliberto G.R., Mascarello M., Gronda E., Bonancina E., Anjos M.C., Alberti A., de Vita C.
Acute rejection after heart transplantation : noninvasive echocardiographic evaluation.
J Am Coll Cardiol: 1994; 23: 1156-1161
18. Clausell N., Butany J., Molossi S., Lonn E., Gladstone P., Rabinovitch M., Daly P.
Abnormalities in intramyocardial arteries in cardiac transplant biopsy specimens and lack of correlation with abnormal intracoronary ultrasound or endothelial dysfunction in large epicardial coronary arteries.
J Am Coll Cardiol: 1995; 26: 110-119
19. Cohn J.M., Wilensky R.L., O'Donnell J.A., Bourdillon P.D., Dillon J.C., Feigenbaum H.
Exercise echocardiography, angiography, and intracoronary ultrasound after cardiac transplantation.
Am J Cardiol: 1996; 77: 1216-1219

20. Costanzo M.R., Naftel D.C., Pritzker M.R., Heilman J.K.^{3rd}, Boehmer J.P., Brozena S.C., Dec G.W., Ventura H.O., Kirklin J.K., Bourge R.C., Miller L.W.
Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors.
J Heart Lung Transplant: 1998; 17: 744-753

21. Davis S.F., Yeung A.C., Meredith I.T., Charbonneau F., Ganz P., Selwyn A.P., Anderson T.J.
Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant.
Circulation: 1996; 93: 457-462

22. Day J.D., Rayburn B.K., Gaudin P.B., Baldwin W.M., Lowenstein C.J., Kasper E.K., Baughman K.L., Baumgartner W.A., Grover M.H., Hruban R.H.
Cardiac allograft vasculopathy: The central pathogenetic role of ischemia-induced endothelial cell injury.
J Heart Lung Transplant: 1995; 14: S142-149

23. Deetjen P., Speckmann E.-J.
Physiologie.
Verlag Urban und Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore: 1992

24. Deng M.C., Bell S., Huie P., Fausto P., Hunt S.A., Stinson E.B., Sibley R., Hall B.M., Valantine H.A.
Cardiac allograft vascular disease: Relationship to microvascular cell surface markers and inflammatory cell phenotypes on endomyocardial biopsy.
Circulation: 1995; 91: 1647-1654

25. Derumeaux G., Redonnet M., Soyer R., Cribier A., Letac B.
Assesment of the progression of cardiac allograft vasculopathy by dobutamine stress echocardiography.
J Heart Lung Transplant: 1998; 17: 259-267

26. Dietrich H., Hu Y., Zou Y., Dirnhofer S., Kleindienst R., Wick G., Xu Q.
Mouse model of transplant arteriosclerosis: Role of intercellular adhesion molecule-1.
Arterioscler Thromb Vasc Biol: 2000; 20: 343-352

27. Drexler H.
Endothelial dysfunction: clinical implications
Prog Cardiovasc Dis: 1997; 39: 287-324

28. Ensley R.D., Hunt S., Taylor D.O., Renlund D.G., Menlove R.L., Karwande S.V.,
O'Connell J.B., Barr M.L., Michler R.E., Copeland J.G., et al.
Predictors of survival after repeat heart transplantation. The registry of the International
Society for heart and lung transplantation, and contributing investigators.
J Heart Lung Transplant: 1992; 11(suppl.): 142-158

29. Everett J.P., Hershberger R.E., Norman D.J., Chou S., Ratkovec R.M., Cobanoglu A.
Ott G.Y., Hosenpud J.D.
Prolonged cytomegalovirus infection with viremia is associated with development of
cardiac allograft vasculopathy.
J Heart Lung Transplant: 1992; 11(suppl.): 133-137

30. Faulk W.P., Labarrere C.A.
Modulation of vascular antithrombin III in human cardiac allografts.
Haemostasis: 1993; 23 (suppl.1): 194-201

31. Faulk W.P., Labarrere C.A., Nelson D.R., Pitts D.
Hemostasis, fibrinolysis, and natural anticoagulation in transplant vascular sclerosis.
J Heart Lung Transplant: 1995; 14: S158-164

32. Fish R.D., Nabel E.G., Selwyn A.P., Ludmer P.L., Mudge G.H., Kirshenbaum J.M.,
Schoen F.J., Alexander R.W., Ganz P.
Responses of coronary arteries of cardiac transplant patients to acetylcholine.
J Clin Invest: 1988; 81: 21-31

33. Fletcher G.F., Froelicher V., Hartley L.H., Haskell W.L., Pollock M.L.
Exercise standards.
Circulation: 1990; 82: 2286-2319
34. Frenette P.S., Wagner D.D.
Molecular medicine: adhesion molecules-part 1
N Engl J Med: 1996; 334: 1526-1529
35. Gao S.-Z., Alderman E.L., Schroeder J.S., Hunt S.A., Wiederhold V., Stinson E.B.
Progressive coronary luminal narrowing after cardiac transplantation.
Circulation: 1990; 82 (suppl.IV): 269-275
36. Gao S.Z., Schroeder J.S., Alderman E.L., Hunt S.A., Silverman J.F., Wiederhold V.,
Stinson E.B.
Clinical and laboratory correlates of accelerated coronary artery disease in the cardiac
transplant patient.
Circulation: 1987; 76(suppl. V): 56-61
37. Gradek W.Q., D'Amico C., Smith A.L., Vega D., Book W.M.
Routine surveillance endomyocardial biopsy continues to detect significant rejection late
after heart transplantation.
J Heart Lung Transplant: 2001; 20: 497-502
38. Guggenmoos-Holzmann I., Wernecke K.-D.
Medizinische Statistik.
Blackwell Wissenschafts-Verlag; Berlin, Wien: 1996
39. Halle A.A. 3rd, Di Sciascio G., Massin E.K., Wilson R.F., Johnson M.R., Sullivan H.J.,
Bourge R.C., Kleiman N.S., Miller L.W., Aversano T.R.
Coronary angioplasty, atherectomy and bypass surgery in cardiac transplant recipients.
J Am Coll Cardiol: 1995; 26: 120-128

40. Hammond E.H., Hansen J.K., Spencer L.S., Jensen A., Yowell R.L.
Immunofluorescence of endomyocardial biopsies specimens: Methods and interpretation.
J Heart Lung Transplant: 1993; 12: S113-124

41. Hertz M.I., Taylor D.O., Trulock E.P., Boucek M.M., Muhacsi P.J., Edwards L.B., Keck B.M.
The registry of the International Society for heart and lung transplantation: Nineteenth official report 2002.
J Heart Lung Transplant: 2002; 21: 950-969

42. Hoffmann R., Lethen H., Kleinhans E., Weiss M., Flachskamp F.A., Hanrath P.
Comparative evaluation of bicycle and dobutamine stress echocardiography with perfusion scintigraphy and bicycle electrocardiogram for identification of coronary artery disease.
Am J Cardiol: 1993; 72: 555-559

43. Hoffmeister H.M., Jur M., Ruf-Lehmann M., Helber U., Heller W., Seipel L.
Endothelial tissue-type plasminogen activator release in coronary heart disease.
J Am Coll Cardiol: 1998; 31: 547-551

44. Hollenberg S.M., Tamburro P., Klein L.W., Burns D., Easington C., Costanzo M.R., Parrillo J.E., Johnson M.R.
Discordant epicardial and microvascular endothelial responses in heart transplant recipients early after transplantation.
J Heart Lung Transplant: 1998; 17: 487-494

45. Jang Y., Lincoff A.M., Plow E.F., Topol E.J.
Cell adhesion molecules in coronary artery disease.
J Am Coll Cardiol: 1994; 24: 1591-1601

46. Juanda M.A., Hill J.
Cardiac transplant vasculopathy.
Chest: 2000; 118: 1792-1800

47. Klauss V., Ackermann K., Spes C., Zeitlmann T., Henneke K-H., Werner F., Regar E., Überfuhr P., Theisen K.
Coronary plaque morphologic characteristics early and late after heart transplantation:
In vivo analysis with intravascular ultrasonography.
Am Heart J: 1997; 133: 29-35
48. Klauss V., Henneke K.H., Rieber J., Spes C., Meiser B., Siebert U., Angermann C.E.,
Theisen K., Mudra H.
Prospektive Untersuchung von Häufigkeit und Ausmaß spenderbedingter koronarer
Herzkrankheit nach Herztransplantation mit intravaskulärem Ultraschall.
Dtsch Med Wschr: 1997; 122: 1235-1243
49. Klauss V., Mudra H., Überfuhr P., Theisen K.
Intraindividual variability of cardiac allograft vasculopathy as assessed by
intravascular ultrasound.
Am J Cardiol: 1995; 76: 463-466
50. Kofoed K.F., Czernin J., Johnson J., Kobashigawa J., Phelps M.E., Laks H.,
Schelbert H.R.
Effects of cardiac allograft vasculopathy on myocardial blood flow, vasodilatory
capacity, and coronary vasomotion.
Circulation: 1997; 95: 600-606
51. Kooistra T., Schrauwen Y., Arts J, Emeis J.J.
Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release.
Int J Hematol: 1994; 59: 233-255
52. Krahwinkel W., Ketteler T., Gódke J., Wolfertz J., Ulbricht L.J., Krakau I., Gülker H.
Dobutamine stress echocardiography.
Eur Heart J: 1997; 18 (suppl. D): 9-15
53. Kristensen P., Larsson L.I., Nielsen L.S., Grondahl-Hansen J., Andreasen P.A., Dano K.
Human endothelial cells contain one type of plasminogen activator.
FEBS Lett: 1984; 168: 33-37

54. Krivokapich A., Huang S.C., Scheibert H.R.
Assessment of the effects of dobutamine on myocardial blood flow and oxidative metabolism in normal human subjects using nitrogen-13 ammonia and carbon-11 acetate.
Am J Cardiol: 1993; 71: 1351-1356

55. Kuschinsky G., Lüllmann H., Mohr K.
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.
Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York: 1993

56. Labarrere C.A.
Relationship of fibrin deposition in microvasculature to outcomes in cardiac transplantation.
Curr Opin Cardiol: 1999; 14: 133-139

57. Labarrere C.A., Lee J.B., Nelson D.R., Al-Hassani M., Miller S.J., Pitts D.E.
C-reactive protein, arterial endothelial activation, and development of transplant coronary artery disease : a prospective study.
Lancet: 2002; 360: 1462-1467

58. Labarrere C.A., Nelson D.R., Faulk W.P.
Endothelial activation and development of coronary artery disease in transplanted human hearts.
JAMA: 1997; 278: 1169-1175

59. Labarrere C.A., Pitts D., Halbrook H., Faulk W.P.
Tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and Fibrin as indexes of clinical course in cardiac allograft recipients.
Circulation: 1994; 89: 1599-1608

60. Labarrere C.A., Pitts D., Halbrook H., Faulk W.P.
Tissue plasminogen activator in human cardiac allografts.
Transplantation: 1993; 55: 1056-1060

61. Labarrere C.A., Pitts D., Nelson D.R., Faulk W.P.
Vascular tissue plasminogen activator and the development of coronary artery disease in heart transplant recipients.
N Engl J Med: 1995; 333: 1111-1116

62. Larsson A., Astedt B.
Immunohistochemical localization of tissue plasminogen activator and urokinase in the vessel wall.
J Clin Pathol: 1985; 38: 140-145

63. Lee J.R., Huh J.H., Seo J.W., Suk C.J., Jeong H.M., Kim E.K.
Time dependent expression of ICAM-1 and VCAM-1 on coronaries of the heterotopically transplanted mouse heart.
J Korean Med Sci :1999; 14: 245-252

64. Lijnen H.R., Collen D.
Endothelium in hemostasis and thrombosis.
Prog Cardiovasc Dis: 1997; 39: 343-350

65. Ludmer P.L., Selwyn A.P., Shook T.L., Wayne R.R., Mudge G.H., Alexander R.W., Ganz P.
Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries.
N Engl J Med: 1986; 315: 1046-1051

66. Lupu F., Heim D.A., Bachmann F., Hurni M., Kakkar V.V., Kruithof E.K.O.
Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions.
Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology: 1995; 15: 1444-1455

67. Marino P.L.
Das ICU-Buch: Praktische Intensivmedizin.
Verlag Urban und Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore: 1994

68. Markus B.H., Blaheta R., Scholz M.
Die Immunologie der Endothelzelle und ihre Bedeutung für die Organtransplantation.
Aspekte: 1/1995: 19-23; Herausgeber: Biotest Pharma GmbH, Dreieich, Deutschland
69. Martin T.W., Gaucher J., Pupa L.E., Seaworth J.F.
Response to upright exercise after cardiac transplantation.
Clin Cardiol: 1994; 17: 292-300
70. Mazeika P.K., Nadazdin A., Oakley C.M.
Dobutamine stress echocardiography for detection and assessment of coronary artery disease.
J Am Coll Cardiol: 1992; 19: 1203-1211
71. Mehra M.R., Uber P.A. Uber W.E., Park M.H., Scott R.L.
Anything but a biopsy: noninvasive monitoring for cardiac allograft rejection.
Curr Opin Cardiol: 2002; 17: 131-136
72. Michaels P.J., Espejo M.L., Kobashigawa J., Alejos J.C., Burch C., Takemoto S.,
Reed E.F., Fishbein M.C.
Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences
and relationship to transplant coronary artery disease.
J Heart Lung Transplant: 2003; 22: 58-69
73. Miller L.W.
Allograft vascular disease: a disease not limited to hearts.
J Heart Lung Transplant: 1992; 11: S32-37
74. Oppenheimer-Marks N., Davis L.S., Lipsky P.E.
Human T lymphocyte adhesion to endothelial cells and transendothelial migration.
Alteration of receptor use relates to the activation status of both the T cell and the
endothelial cell.
J Immunol: 1990; 145: 140-148

75. Pethig K., Heublein B., Maaß C., Wahlers T., Haverich A.
Intravaskulärer Ultraschall nach Herztransplantation. Diagnostik und Quantifizierung der Transplantatvaskulopathie.
Transplantationsmedizin: 1997; 9: 33-37
76. Picano E.
Stress echocardiography.
Springer-Verlag; Berlin: 1992
77. Raisky O., Morrison K.J., Obadia J.F., McGregor J., Yacoub M.H., Rose M.L.
Acute rejection and cardiac graft vasculopathy in the absence of donor-derived ICAM-1 or P-selectin.
J Heart Lung Transplant: 2001; 20: 340-349
78. Rickenbacher P.R., Pinto F.J., Lewis N.P., Hunt S.A., Alderman E.L., Schroeder J.S., Stinson E.B., Brown B.W., Valentine H.A.
Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation.
Circulation: 1995; 92: 3445-3452.
79. Rosenberg R.D., Rosenberg J.S.
Natural anticoagulant mechanisms.
J Clin Invest: 1984; 74: 1-6
80. Rudic R.D., Shesely E.G., Nobuyo M., Smithies O., Segal S.S., Sessa W.C.
Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling.
J Clin Invest: 1998; 101: 731-36
81. Ryan T, Feigenbaum H.
Exercise echocardiography.
Am J Cardiol: 1992; 69(suppl. H): 82-89

82. Salom R.N., Maguire J.A., Hancock W.W.
Endothelial activation and cytokine expression in human acute cardiac allograft rejection.
Pathology: 1998; 30: 24-29
83. Salustri A., Fioretti P.M., Pozzoli M.M., McNeill A.J., Roelandt J.R.
Dobutamine stress echocardiography: its role in the diagnosis of coronary artery disease.
Eur Heart J: 1992; 13: 70-77
84. Segar D.S., Brown S.E., Sawada S.G., Ryan T., Feigenbaum H.
Dobutamine stress echocardiography: Correlation with coronary lesion severity as
determined by quantitative angiography.
J Am Coll Cardiol: 1992; 19: 1197-1202
85. Shi C., Feinberg M.W., Zhang D., Patel A., Sim C.U., Dong Z.M., Chapman S.M.,
Gutierrez-Ramos J.C., Wagner D.D., Sibinga N.E., Haber E.
Donor MHC and adhesion molecules in transplant arteriosclerosis.
J Clin Invest: 1999; 103: 469-474
86. Smart F.W., Ballantyne C.M., Cocanougher B., Farmer J.A., Sekela M.E., Noon G.P.
Young J.B.
Insensitivity of noninvasive tests to detect coronary artery vasculopathy after heart
transplant.
Am J Cardiol: 1991; 67: 243-247
87. Sonnenblick E.H., Frishman W.H., Le Jemtel T.H.
Dobutamine: a new synthetic cardioactive sympathetic amine.
N Engl J Med: 1979; 300: 17-22
88. Spes C.H., Angermann C.E.
Stress echocardiography for assesment of cardiac allograft vasculopathy.
Z Kardiol: 2000; 89 (suppl. 9): 50-53

89. Spes C.H., Klauss V., Mudra H., Schnaack S.D., Tammen A.R., Rieber J., Siebert U., Henneke K-H., Überfuhr P., Reichart B., Theisen K., Angermann C.E.
Diagnostic and prognostic value of serial dobutamine stress echocardiography for noninvasive assesment of cardiac allograft vasculopathy.
Circulation : 1999; 100: 509-515
90. Spes C.H., Mudra H., Schnaack S.D., Klauss V., Reichle F.M., Überfuhr P., Theisen K., Angermann C.E.
Dobutamine stress echocardiography for noninvasive diagnosis of cardiac allograft vasculopathy: a comparison with angiography and intravascular ultrasound.
Am J Cardiol: 1996; 78: 168-174
91. Srivastava R., Keck B.M., Bennett L.E., Hosenpud J.D.
The results of cardiac retransplantation: an analysis of the Joint International Society for Heart and Lung Transplantation/United Network for Organ Sharing Thoracic Registry.
Transplantation: 2000; 70: 606-612
92. Steinhoff G., Behrend M., Richter N., Haverich A.
Endothelial adhesion molecules in human heart and lung transplants.
Transpl Proc: 1995; 27:1274-1278
93. Steuernagel C.
Die Aktivierbarkeit des Kapillarendothels – Regulation der Perfusion, Blutgerinnung und Entzündungsantwort.
Aspekte: 1/1995: 9-14; Herausgeber: Biotest Pharma GmbH, Dreieich, Deutschland
94. St.Goar F.G., Pinto F.J., Alderman E.L., Valantine H.A., Schroeder J.S., Gao S.-Z. Stinson E.B., Popp R.L.
Intracoronary ultrasound in cardiac transplant recipients. In vivo evidence of “angiographically silent” intimal thickening.
Circulation: 1992; 85: 979-987

95. Stoica S.C., Goddard M., Large S.R.
The endothelium in clinical cardiac transplantation.
Ann Thorac Surg: 2002; 73: 1002-1008
96. Suzuki J., Isobe M., Yamazaki S., Horie S., Okubo Y., Sekiguchi M.
Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with short-term blockade of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 in a heterotopic murine model of heart transplantation.
J Heart Lung Transplant: 1997; 16: 1141-1148
97. Tanio J.W., Basu C.B., Albelda S.M., Eisen H.J.
Differential expression of the cell adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin in normal and posttransplantation myocardium. Cell adhesion molecule expression in human cardiac allografts.
Circulation: 1994; 89: 1760-1768
98. Treasure C.B., Vita J.A., Ganz P., Ryan T.J., Schoen F.J., Vekshtein V.I., Yeung A.C. Mudge G.H., Alexander R.W., Selwyn A.P.
Loss of the coronary microvascular response to acetylcholine in cardiac transplant recipients.
Circulation: 1992; 86: 1156-1164
99. Vanoverschelde J.L., Wijns W., Essamri B., Bol A., Robert A., Labar D., Cogneau M., Michel C., Melin J.A.
Hemodynamic and mechanical determinants of myocardial O₂ consumption in normal human heart: effects of dobutamine.
Am J Physiol: 1993; 265 (suppl. H): 1884-1892
100. van Ruge F.P., van der Wall E.E., Bruschke A.V.
New developments in pharmacologic stress imaging.
Am Heart J: 1992; 124: 468-485

101. Vassali G., Gallino A.
Endothelial dysfunction and accelerated coronary artery disease in cardiac transplant recipients.
Eur Heart J : 1997; 18: 1712-1717
102. Vassali G., Gallino A., Kiowski W., Jiang Z., Turina M., Hess O.M.
Reduced coronary flow reserve during exercise in cardiac transplant recipients.
Circulation: 1997; 95: 607-613
103. von Scheidt W.
The clinical dilemma of cardiac allograft vasculopathy-an introduction to the clinical session.
Z Kardiol : 2000; 89 (Suppl. 9): 40-44
104. Weill D.
Role of cytomegalovirus in cardiac allograft vasculopathy.
Transpl Infect Dis: 2001; 3 (Suppl 2): 44-48
105. Weis M., Pehlivanli S., von Scheidt W.
Heart allograft endothelial dysfunction. Cause, course and consequences.
Z Kardiol : 2000; 89 (suppl.9): 58-62
106. Weis M., v. Scheidt W.
Cardiac allograft vasculopathy. A review.
Circulation: 1997; 96: 2069-2077
107. Willerson J.T., Hutton I., Watson J.T., Platt M.R., Templeton G.H.
Influence of dobutamine on regional myocardial blood flow and ventricular performance during acute and chronic myocardial ischemia in dogs.
Circulation: 1976; 53: 828-833

108. Wojta J., Gallichio M., Zoellner H., Hufnagl P., Last K., Filonzi E.L., Binder B.R., Hamilton J.A., McGrath K.
Thrombin stimulates expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured human vascular smooth muscle cells.
Thromb Haemost: 1993; 70: 469-474
109. Yeung A.C., Anderson T., Meredith I., Uehata A., Ryan T.J., Selwyn A.P., Mudge G.H. Ganz P.
Endothelial dysfunction in the development and detection of transplant coronary artery disease.
J Heart Lung Transplant: 1992; 11 (suppl.): 69-73
110. Yeung A.C., Davis S.F., Hauptman P.J., Kobashigawa J.A., Miller L.W., Valentine H.A., Ventura H.O., Wiedermann J., Wilensky R.
Incidence and progression of transplant coronary artery disease over 1 year: Results of a multicenter trial with use of intravascular ultrasound.
J Heart Lung Transplant: 1995; 14: 215-220

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. Christoph H. Spes für die Überlassung des Themas, für seine stets geduldige Betreuung und für seine pragmatischen Hilfestellungen bedanken. Er hat mich jederzeit bei der Fertigstellung dieser Arbeit ermutigt.

Frau Professor Dr. Christiane E. Angermann und allen Mitarbeitern der Transplantationsambulanz und des Herzkatheterlabors der Medizinischen Klinik der Universität danke ich für ihre freundliche Unterstützung.

Herrn Professor D. Pongratz gilt mein Dank für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen des Friedrich-Baur-Instituts; insbesondere bin ich Frau E. Wiens und Frau S. Galuschka zu großem Dank verpflichtet, die mir bei allen Labortätigkeiten mit ausnehmender Freundlichkeit behilflich waren.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Dr. Thomas M. Behr herzlich bedanken, der mich hervorragend in die Methodik der Immunfluoreszenzfärbung eingeführt hat und mir bis zuletzt mit Rat und Tat zur Seite stand.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinem Mit-Doktoranden und Freund Dr. K. Richter, dessen wertvolle praktische Tipps meine Bemühungen im Labor erheblich erleichtert haben.

Lebenslauf

Familienname:	Birk	
Vorname:	Michael Harald Erich	
Geburtsdatum:	13.04.1970	
Geburtsort:	München	
Wohnort:	München	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Eltern:	Renate Birk, geb. Ziereis Erich Birk	
Geschwister:	ein Bruder	
Schulbildung:	1976-1980	Grundschule an der Plinganserstr., München
	1980-1989	Klenze-Gymnasium München (mathematisch-naturwissenschaftlich)
	1989	Abschluß mit der Allg. Hochschulreife
Zivildienst:	1989- 1990	Rettungsdiensthelfer beim BRK Weilheim
Hochschulausbildung:	1990-1991	Studium der Biologie an der Technischen Universität München
	1991-1998	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Nebentätigkeiten während des Studiums:	Regelmäßige Tätigkeiten als Rettungssanitäter beim BRK Weilheim und als studentische Aushilfskraft auf der gefäß/neurochirurgischen Intensivstation im Klinikum rechts der Isar	
Berufstätigkeit:	7/98-12/99	Arzt im Praktikum in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin am Städt. Krankenhaus München-Harlaching
	seit 1/00	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin am Städt. Krankenhaus München-Harlaching
	seit 2/00	Regelmäßige Nebentätigkeit als Notarzt am Standort Weilheim