

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin

DISSERTATION

*Veränderungen des Interstitiums des Myokards nach
Herztransplantation
(Computerbasierte Mikroskopbildanalyse des interstitiellen
Gewebes von Kontrollendomyokardbiopsien nach
Herztransplantation)*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Boni
aus Wuppertal

Datum der Promotion: 12.09.2014

Inhaltsverzeichnis:	
I. Abkürzungsverzeichnis	3
II. Tabellenverzeichnis	4
III. Abbildungsverzeichnis	5
Abstrakt	7
1. Einleitung	11
1.1. Hintergrund	11
1.2. Das myokardiale Interstitium	12
1.3. Die myokardiale Fibrose	13
1.3.1. Reaktive Fibrose	14
1.3.2. Reparative Fibrose	15
1.4. Fibrose nach Herztransplantation	16
1.5. Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation	18
2. Aufgabenstellung	23
3. Material und Methoden	25
3.1. Material	25
3.2. Methoden	26
3.2.1. Fibrosemessung	26
3.2.2. Codierung innerhalb der Microsoft-Access™ Datenbank	35
4. Ergebnisse	37
4.1. Ergebnisse der histomorphometrischen Fibrosemessungen	37
4.2. Ergebnisse der histomorphometrischen Narbenmessungen	56
5. Diskussion	64
5.1. Diskussion von Material und Methodik	64
5.2. Diskussion der Ergebnisse	69
6. Zusammenfassung	86
7. Literaturverzeichnis	87
8. Eidesstattliche Versicherung	95
9. Lebenslauf	96
10. Danksagung	97

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
DHZB	Deutsches Herzzentrum in Berlin
EI	Erhebungsintervall
EMB	Endomyokardbiopsie
HE	Hämatoxylin-Eosin
HTx	Herztransplantation
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
MHC	Major Histocompatibility Complex
MW	Mittelwert
IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin-2
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
N	Anzahl
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
vH	vom Hundert

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1a:	Fibrosemittelwerte der Nullbiopsiegruppe (aus Mittelwerten)	37
Tabelle 1b:	Fibrosemittelwerte der Nullbiopsiegruppe (aus Einzelmessdaten)	37
Tabelle 2:	Deskriptive Statistik der Fibrosemittelwerte	39
Tabelle 3:	Tests auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk)	39
Tabelle 4:	Biopsien pro Alterskohorte und Zeitpunkt nach HTx	41
Tabelle 5a	Korrelationen der Fibrosemittelwerte mit dem Alter bei HTx	51
Tabelle 5b:	Korrelationen der Fibrosemittelwerte mit dem Zeitpunkt der Biopsie	52
Tabelle 6:	Regressionsmodell	53
Tabelle 7:	Koeffizienten	54
Tabelle 8a:	Narbenmittelwerte der Nullbiopsiegruppe (aus Mittelwerten)	56
Tabelle 8b:	Narbenmittelwerte der Nullbiopsiegruppe (aus Einzelmessdaten)	56
Tabelle 9:	Biopsien je Untersuchungsintervall	65
Tabelle 10a:	Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier (nach Geschlecht)	70
Tabelle 10b:	Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit (in Jahren)	70
Tabelle 11a:	Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier nach ISHLT-Erstdiagnose	73
Tabelle 11b:	Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit (in Jahren)	74
Tabelle 11c:	Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen je ISHLT-Erstdiagnose	74
Tabelle 12 a:	Fibroseanteile in % (Erstbiopsie nach HTx)	76
Tabelle 12 b:	Fibroseanteile in % (Gesamtbiopsien)	76
Tabelle 12 c:	Fibroseanteile in % – gruppiert	76
Tabelle 13a:	Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier nach Fibroseanteilen	78
Tabelle 13 b:	Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit (in Jahren)	79
Tabelle 13 c:	Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen nach Fibroseanteilen	79

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die häufigsten Herzerkrankungen, die zu einer Herztransplantation bei Erwachsenen führen (Zeitraum Januar 2005 – Juni 2010)	11
Abbildung 2:	Geschlechterverteilung der untersuchten herztransplantierten Patienten des DHZB	25
Abbildung 3:	Screenshot 1	27
Abbildung 4:	Screenshot 2	28
Abbildung 5:	Screenshot 3	29
Abbildung 6:	Screenshot 4	30
Abbildung 7:	Screenshot 5	31
Abbildung 8:	Screenshot 6	32
Abbildung 9:	Befundbericht Fibrose	33
Abbildung 10:	Histogramm und Normalverteilung der Fibrosemittelwerte	38
Abbildung 11:	Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose in μm^2 nach HTx (Gesamtbiopsien)	40
Abbildung 12:	Fibrosemittelwerte nach Alterskohorten	42
Abbildung 13:	Biopsie-Mittelwerte der Fibrose nach HTx in μm^2 (Alterskohorten)	43
Abbildung 14:	Fibrosemittelwerte und Geschlecht	44
Abbildung 15:	Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose in μm^2 nach HTx (Frauen)	45
Abbildung 16:	Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose in μm^2 nach HTx (Männer)	46
Abbildung 17:	Fibrosemittelwerte und Rejektion	47
Abbildung 18:	Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose in μm^2 nach HTx (Rejektion negativ)	48
Abbildung 19:	Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose in μm^2 nach HTx (Rejektion positiv)	49
Abbildung 20:	Vergleich der Mittelwerte: Fibrose nach HTx in μm^2	50
Abbildung 21:	Streudiagramm Biopsie nach HTx in Tagen und Fibrose in μm^2	55
Abbildung 22:	Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in % (Gesamtbiopsien)	57
Abbildung 23:	Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in % (Alterskohorten)	58
Abbildung 24:	Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in % (Frauen)	59
Abbildung 25:	Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in % (Männer)	60

Abbildung 26: Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in % (Rejektion negativ)	61
Abbildung 27: Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in % (Rejektion positiv)	62
Abbildung 28: Vergleich der Mittelwerte: Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in %	63
Abbildung 29: Überlebensfunktionen insgesamt (nach Kaplan-Meier) (in Jahren)	71
Abbildung 30: Überlebensfunktionen der Geschlechter (nach Kaplan-Meier) (in Jahren)	72
Abbildung 31: Fibroseanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in % (Gesamtbiopsien: N = 2551)	77

Abstrakt

Morphologische Befunde nach Herztransplantation

Einleitung

Die Studie untersucht die Daten von rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien, die im Rahmen der postoperativen Kontrollen nach HTx entnommen wurden. Die Untersuchungen konzentrieren sich auf die quantitativen Veränderungen der Fibrose und des anteiligen Narbengewebes an der Biopsie im postoperativen Verlauf nach HTx. Die histomorphometrischen Daten der Biopsien wurden im Zusammenhang mit den Daten der untersuchten Patienten, ihrem Geschlecht und ihrem Alter sowie zeitgleichen und vorangegangenen Rejektionsepisoden statistisch präsentiert, analysiert und bewertet.

Methodik

Zwischen Januar 1998 bis Dezember 2009 wurden im Durchschnitt 3,3 Endomyokardbiopsien (EMB) je Patient über einen Zeitraum von einem Monat bis zu 5 Jahren nach HTx vorgenommen. In der vorliegenden Arbeit wurden 2551 EMB von 855 herztransplantierten Patienten untersucht (M=672, W=183, Durchschnittsalter 43 Jahre, Medianalter 48 Jahre). Mittels Lichtmikroskop wurden in der histomorphometrischen Analyse aus jeweils 12 Messwerten Mittelwerte und Standardabweichungen der Fibrose und des Narbengewebes dokumentiert und die zelluläre Abstoßung nach den Kriterien der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) klassifiziert. Die erhobenen Daten wurden mittels deskriptiver Statistik dargestellt und in einem Regressionsmodell analysiert.

Ergebnisse

Innerhalb der ersten fünf Monate nach HTx kommt es zu einem Anstieg der Fibrosemittelwerte. Der Mittelwert der Fibrose steigt von $7.913,86 \mu\text{m}^2$ (9,76 %) im ersten Monat nach HTx auf $11.548,56 \mu\text{m}^2$ (14,23 %) fünf Monate nach HTx an. Im weiteren postoperativen Verlauf nimmt die Gesamtfläche der Fibrosemenge wieder ab. Im Regressionsmodell zeigt sich ein signifikanter ($p < 0,5$), aber schwacher negativer Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Fibrosemittelwertes und dem Zeitpunkt der Biopsieentnahme. 94,7% (N=2416) der Biopsien wurden in der ISHLT Gruppe 0-1B betrachtet, 5,3% (N=135) in der ISHLT Gruppe von 2 bis einschließlich 4. Die Gruppe der Patienten von 2 bis einschließlich 4 zeigte einen Maximalwert von $14.085,50 \mu\text{m}^2$ (17,50%). Dieser Wert wurde von der anderen ISHLT Gruppe zu keinem Zeitpunkt erreicht. Das Narbengewebe steigt innerhalb der ersten fünf Monate nach HTx ebenfalls an. Im Gegensatz zur Fibrose setzt sich diese Entwicklung jedoch im weiteren postoperativen Verlauf fort. Signifikante statistische Zusammenhänge zwischen der Fibrose- und

Narbenentwicklung und der postoperativen Zeit, dem Rejektionsgeschehen, Geschlecht oder dem Alter der Patienten konnten nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach HTx ein Prozess der Fibrosierung einsetzt. In der Literatur sind verschiedene Ursachen für die Fibroseentstehung beschrieben worden. Lineare, statistisch signifikante Abhängigkeiten zwischen der Fibrose- und Narbenentwicklung im transplantierten Herzen und den erhobenen Variablen konnten nicht nachgewiesen werden.

Abstract

Pathomorphological findings after heart transplantation

Aims

This study analyses quantitative changes in fibrosis and scar tissue of right ventricular biopsies in the postoperative course after HTx. The research concentrates on differences in the morphometric changes between patients with moderate to severe rejection episodes versus patients with no or mild ones according to the rejection grading of the ISHLT. Furthermore we looked for differences between sex and age.

Methods

A total number of 2551 right ventricular endomyocardial biopsies were taken from 855 patients (mean age 43 yrs, median 48 yrs, male=672, female=183) undergoing HTx between 01/98 and 12/09. The biopsies were evaluated by light microscopy for rejection grading (according to ISHLT). Morphometric and quantitative analysis was done for fibrosis and scar tissue of heart muscle cells obtained from 1 month up to 5 years following HTx. All data were presented by descriptive statistics and analysed by linear regression.

Results

Fibrosis increased continuously during the first five postoperative months after HTx. The mean number of fibrosis increased from 7.913,86 μm^2 (9,76 %) one month after HTx to 11.548,56 μm^2 (14,23 %) five months after HTx. In the following time fibrosis decreased slowly. Linear regression analysis showed a slightly significant negative correlation between the amount of fibrosis and the post transplant time ($p < 0,5$). 94,7% (N=2416) of biopsies were in ISHLT grade 0 - 1B, and 5,3% (N=135) in ISHLT grade 2 - 4. The group of patients with an ISHLT grade 2 - 4 showed a maximum of 14.085,50 μm^2 (17,50%), a value the other group of patients with no or mild rejection never reached. The extent of scar tissue also increased within the five months after HTx. In contrast to fibrosis this process continued in the following post transplant course. Age, sex or rejection episodes of the patients and the postoperative course showed no statistically significant differences.

Conclusions

In summary this study showed that the early phase following HTx is characterised by the increase of right ventricular myocardial fibrosis. Scientific literature describes the development of early postoperative increasing fibrosis and possible causes. The results do not show a

significant linear correlation of myocardial fibrosis with age, sex, rejection episodes and the postoperative course. This study confirms fibrosis as a multifactorial phenomenon, which cannot be reduced to one single factor of the collected data.

1. Einleitung

1.1. Hintergrund

Die beiden häufigsten Herzerkrankungen, die zu einer Herztransplantation bei Erwachsenen führen, sind die nicht-ischämische Kardiomyopathie und die koronare Herzerkrankung [4][19][23].

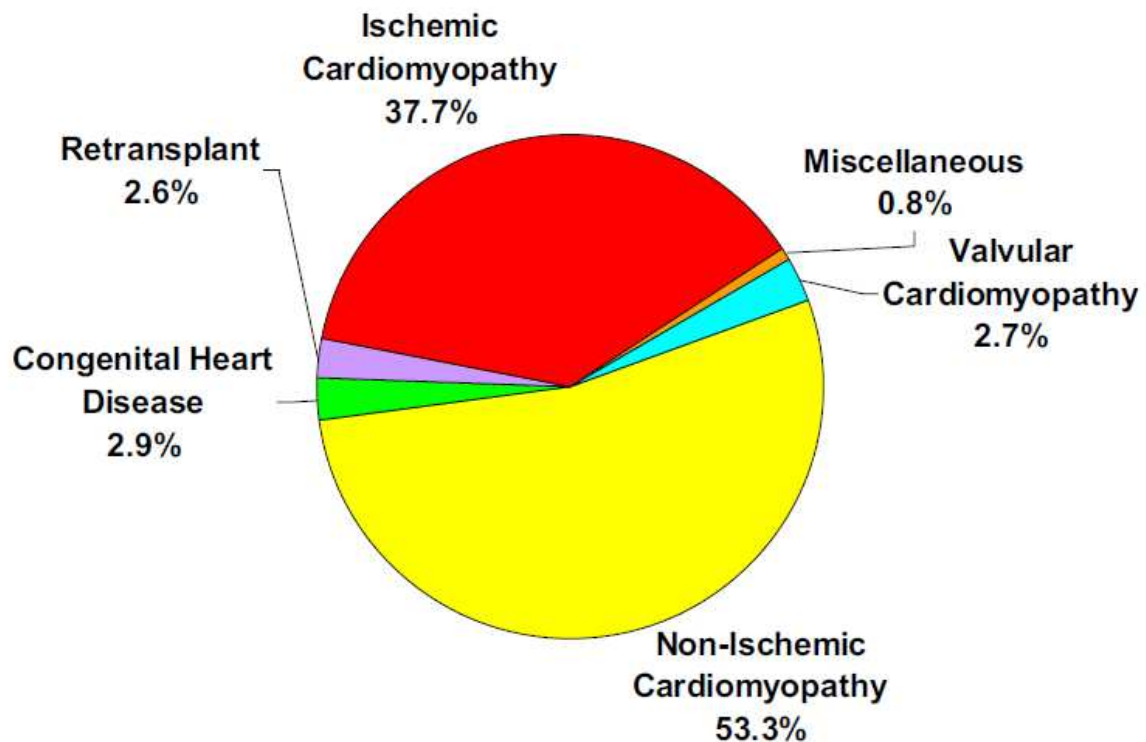


Abb. 1 Die häufigsten Herzerkrankungen, die zu einer Herztransplantation bei Erwachsenen führen (Zeitraum Januar 2005 – Juni 2010) [66]

1972 wurde die Entnahme von Endomykardbiopsien zur Diagnostik von Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation eingeführt. Erfreulicherweise hat das Langzeitüberleben durch die Einführung der histologischen Diagnostik in das Behandlungsmanagement zusammen mit der Einführung des Cyclosporins in den frühen 80er Jahren zugenommen [8].

Die Nachsorge herztransplantierte Patienten ist für den Erfolg einer Herztransplantation von entscheidender Bedeutung. Die mediane Überlebenszeit nach HTx liegt zurzeit bei 10-11 Jahren. Das größte Sterblichkeitsrisiko liegt mit 71% innerhalb des ersten Jahres nach HTx [23]. Zu den Haupttodesursachen zählen Transplantatversagen, Infektionen, Multiorganversagen und Abstoßungsreaktionen. Für Patienten, die das erste Jahr nach HTx überlebt haben, liegt die

mediane Überlebenszeit bei 13-14 Jahren [4][66]. Im Zeitraum von einem bis drei Jahre nach HTx ist die akute Abstoßungsreaktion für 9% der Todesfälle verantwortlich [66]. Akute Rejektionen treten gewöhnlich innerhalb der ersten 3 Monate nach HTx auf, können aber auch später bei Langzeitüberlebenden beobachtet werden [9].

Die Endomyokardbiopsie ist derzeit die einzige zuverlässige diagnostische Methode zum Nachweis einer akuten Abstoßung [9][14][32][45][60][63]. Die statistische Analyse nach Tazelaar et al. [63] zeigt, dass akute Abstoßungsreaktionen mit einer Sensitivität von > 90% festgestellt werden können.

1.2. Das myokardiale Interstitium

Die Herzkammerwand besteht aus mehreren Schichten. Die innere Schicht wird innen vom glatten Endokard überzogen. Nach außen schließen zwei Schichten – Epi- und Perikard - das Herz gegen das Mediastinum ab. Das Herz besteht hauptsächlich aus Myokard. Im Interstitium des Herzens (Zwischenraum zwischen den Herzmuskelzellen) ist das Kapillarssystem gelegen, das für die Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur verantwortlich ist. Die Kapillaren liegen netzartig um jede einzelne Muskelzelle herum (numerisches Verhältnis Kapillare/Myozyt 1:1). Im Interstitium sind histologisch noch zusätzlich afferente und efferente Fasern des vegetativen Nervensystems in unmittelbarer Nachbarschaft der Kapillaren nachweisbar [10]. Das myokardiale Interstitium stellt 12-15% des Myokardvolumens dar. Kapillargefäße nehmen mit 10% den größten Anteil im interstitiellen Raum des Myokards ein, während der nicht-vaskuläre Anteil nur 3-5 % ausmacht [1][35][36].

Der nicht-vaskuläre Anteil am Myokardvolumen setzt sich aus 1/3 extrazellulärem und 2/3 zellulärem Bestandteil zusammen. Die Zellen des Interstitiums bestehen aus glatten Muskelzellen, Plasmazellen, Lymphozyten, Monozyten und Fibroblasten bzw. Fibrozyten (Fibroblasten mit niedriger Stoffwechselaktivität). Fibroblasten vertreten mit ca. 60% den größten Anteil der nicht-vaskulären Zellen im interstitiellen Raum [70]. Die kardialen Fibroblasten unterscheiden sich in ihrer Morphologie von Fibroblasten in anderen Organen. Sie bilden ein funktionelles Synzytium, d.h. die Zellen sind morphologisch voneinander getrennt, jedoch ist ihr Zytoplasma über Gap Junctions miteinander verbunden. Die Hauptaufgabe der Fibroblasten besteht in der Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix z.B. des Bindegewebsproteins Kollagen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unter physiologischen und pathologischen Bedingungen bestimmt die physikalischen Eigenschaften wie Konsistenz, Reißfestigkeit und Druckbelastung des Herzens [10]. Da die

Fibroblasten den Großteil der extrazellulären Matrix synthetisieren, aber auch Proteasen zum Abbau bereitstellen, obliegt ihnen die Kontrolle über die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix sowie des allgemeinen Protein-Turnovers.

Kollagen und Elastin sind die wesentlichen Komponenten der extrazellulären Matrix. Im Herzen besteht die extrazelluläre Matrix hauptsächlich aus Kollagen Typ I (80%) und Kollagen Typ III (11%) [70]. Der Kollagentyp I ist besonders reißfest [15]. Er hält Zugbelastungen stand und verhindert somit eine Verformung oder Ruptur des Myokards. Die Fasern der extrazellulären Matrix umhüllen die einzelnen Kardiomyozyten und werden aufgeteilt in endomysiale-, perimysiale- und epimysiale Anteile. Das Endomysium verbindet einzelne Kardiomyozyten sowohl untereinander als auch mit den Kapillaren. Es besteht vor allem aus retikulären Fasern (Kollagen Typ III) und wenig Kollagen Typ I [12][13]. Das Perimysium fasst die einzelnen Myozyten zu funktionellen Bündeln zusammen. Die Fasern liegen hier spiralig angeordnet quer zur Muskelfaser und enthalten Kollagen Typ I und wenig Kollagen Typ III.

Elastin ist ein Bestandteil elastischer Fasern. Diese sind bis zu 100% ihrer Ruhelänge reversibel dehnbar. Sie führen nach dem Aufheben der Zugkraft das Gewebe wieder in die Ausgangslage zurück. Die elastischen und die kollagenen Fasern bilden ein Netzwerk und bestimmen somit die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der extrazellulären Matrix. Die Fasern sind in eine Grundsubstanz eingelagert. Diese besteht aus extravaskulären Plasmaproteinen, Hyaluronsäure, Proteoglykanen und anderen Glykoproteinen, wie z.B. Fibronectin.

1.3. Die myokardiale Fibrose

Wenn sich kollagenes Bindegewebe in einem Organ übermäßig vermehrt spricht man von Fibrose. Die myokardiale Fibrose beschreibt eine abnorme Ablagerung von kollagenem Bindegewebe im Myokard. Kommt es zu einer Vermehrung bzw. einer Verdickung der Kollagenfasern des Perimysiums und Endomysiums, entsteht eine interstitielle, reaktive Myokardfibrose, die von der reparativen Fibrose, d.h. dem narbigen Ersatz nekrotischer Myozyten abgegrenzt werden muss.

Fibroblasten gelten als die bedeutendsten zellulären Mediatoren bei der verstärkten Produktion des Bindegewebsproteins Kollagen. Jedoch ist der Ursprung dieser interstitiellen Zellen unklar.

Pichler et al. diskutieren in ihrer Studie einige Theorien zum Ursprung der Fibroblasten. Einige Theorien gehen davon aus, dass die Fibroblasten ihren Ursprung im Herzen selbst haben.

Dabei könnte es sich um ruhende kardiale Fibroblasten handeln, die aus der Embryonalzeit stammen. Andere Autoren bevorzugen die Hypothese, es sich um extrakardiale Zellen handelt. Einerseits können sich epitheliale Zellen in bindegewebsproduzierende Fibroblasten umwandeln. Dieser Prozess wird als epithelial-mesenchymale Transition verstanden. Andererseits könnte es sich bei den Zellen auch um undifferenzierte Stammzellen handeln, die aus dem Knochenmark oder anderem extrakardialen Gewebe stammen, oder um Endothelzellen, die sich im Rahmen eines komplizierten Prozesses in Bindegewebszellen umwandeln. Die Autoren Pichler et al. [48] haben nun Hinweise gefunden, dass die Herzfibrose in transplantierten menschlichen Herzen überwiegend von herzeigenen Fibroblasten produziert wird und nicht über das Blut eingewanderte Zellen die Quelle der Bindegewebsvermehrung sind. In der Konsequenz lässt sich aus dieser Aussage vermuten, dass die Spenderfibroblasten die Fibroseentwicklung nach HTx hervorrufen.

1.3.1 Reaktive Fibrose

Fibrose wird von vielen Autoren [11][21][22][67] durch einen erhöhten Anteil an kollagenem Bindegewebe in einem Gewebe beschrieben. Die Ursachen liegen in einer Mehrproduktion durch eine gesteigerte Kollagensynthese oder in einem reduzierten Abbau. Es lässt sich zusammenfassend also von einer gestörten Selbstregulation sprechen [69].

Anfangs überwiegt meist die Produktion von Kollagen Typ III, während später Kollagen Typ I den Hauptanteil bildet [9][22]. Ursächlich für die vermehrte Produktion können chronische Ödeme, chronische Entzündungen oder ischämiebedingte Nekrosen, z.B. nach einem Herzinfarkt verantwortlich sein [9][11][21][67].

Ein erhöhter Kollagenanteil im Herzen kann über eine Verschiebung des Myozyten/Nicht-Myozytenverhältnisses zu einer verschlechterten kardialen Funktion führen [61]. Die übermäßige Vermehrung von extrazellulärer Matrix beeinträchtigt sowohl die systolische als auch die diastolische Herzfunktion. Zhuang et al. [73] beschreiben, dass histologische Veränderungen in Herztransplantaten, die durch Fibrose oder akute Abstoßungsreaktionen entstanden sind, die ventrikuläre diastolische Funktion und die Ventrikelfüllung verändern können. In ihrer Studien untersuchen sie die rechts- und linksventrikuläre Füllungszeit mittels Color-M-mode Doppler Echokardiographie. Die Autoren zeigen eine Zunahme der rechtsventrikulären Füllungszeit, die positiv mit dem Fibrosegehalt korreliert. Armstrong et al. [2] machen ebenfalls die Beobachtung, dass strukturelle Veränderungen (Hypertrophie von Kardiomyozyten und myokardiale Fibrose), die in der Zeit nach Herztransplantation auftreten, zu

hämodynamischen und kardialen Funktionseinschränkungen führen. Pereira et al. [47] weisen darauf hin, dass es meist frühzeitig nach einer Herztransplantation bei einigen Patienten zu der Entwicklung einer Herzinsuffizienz kommt. Diese ist meistens mit einer normalen linksventrikulären Auswurfraction verbunden, jedoch ist die diastolische Funktion gestört. Es werden ein erhöhter diastolischer Füllungsdruck sowie ein reduzierter transmitraler Einstrom mittels Doppler gemessen. Diese Funktionseinschränkung führen die Autoren auf die steigende diastolische linksventrikuläre Starre zurück, die in der Folge der histologischen Umbauvorgänge entstanden ist. Schnabel et al. [56] stellen fest, dass ein Jahr nach HTx das sinkende Myozytenvolumen, welches in Folge der Fibroseentwicklung zu Stande gekommen ist, teilweise durch eine Hypertrophie der Myozyten kompensiert wird. Somit ist die rechtsventrikuläre Funktion nur leicht komprimiert, obwohl es innerhalb des ersten Jahres nach HTx zu einer signifikanten interstitiellen Fibroseentwicklung gekommen ist. Die Autoren betonen, dass weitere Untersuchungen im Langzeitverlauf durchgeführt werden müssen, um zu prüfen, ob es sich um einen progressiven Prozess handelt, der zu einer Reduktion der Funktion führt. Nach Schnabel et al. [55] kann eine interstitielle Myokardfibrose die Pumpfunktion des Herzens beeinträchtigen, das Auftreten von Arrhythmien begünstigen und somit die Prognose nach HTx negativ beeinflussen. Die Autoren vermuten, dass die perimysiale Fibrose überwiegend die mechanische Funktion beeinträchtigt, in dem die Myozytenkontinuität unterbrochen und somit die elektrische Leitfähigkeit gestört wird. Durch die endomysiale Fibrose sehen sie vorrangig über Kapillarisation die Sauerstoffversorgung der Myozyten beeinträchtigt. Die Bindegewebiszunahme trägt zu einer zunehmenden myokardialen Starre bei. Dadurch wird die Entwicklung einer Funktionseinschränkung vorangetrieben [29]. Tazelaar et al. [63] sehen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Fibrosemenge gemessen in einer Endomyokardbiopsie und der Funktionsminderung des Herzens.

1.3.2 Reparative Fibrose

Von der reaktiven Fibrose ist die reparative Fibrose als Heilungsprozess abzugrenzen. Nekrotisches Gewebe wird durch eingewanderte Granulozyten und Makrophagen phagozytiert und durch deren lysosomale Enzyme abgebaut. Auf den Abbau und die Resorption des nekrotischen Materials folgt die Reparatur des Schadens. Hierbei gibt es nun zwei Möglichkeiten, die zu verschiedenen Endzuständen führen: 1. die vollständige Regeneration, bei der die zugrunde gegangenen Zellen durch gleichartige organspezifische Zellen ersetzt werden. Diese ist an zwei Voraussetzungen gebunden: Erstens darf es sich nicht um permanent postmitotische Zellen handeln, d.h. nicht um solche Zellen, die sich infolge ihres hohen

Differenzierungsgrades nicht mehr teilen können, wie es zum Beispiel bei Herzmuskelzellen der Fall ist. Zweitens muss das organspezifische interstitielle Bindegewebsgerüst im Wesentlichen erhalten geblieben sein. Dies ist im Allgemeinen nur dann der Fall, wenn die Nekrose nicht sehr groß ist. Sind die oben genannten Bedingungen nicht erfüllt, besteht 2. die Möglichkeit der Narbenbildung. Von einigen Autoren [9][21][22] wird dieser Prozess auch als unvollständige Regeneration bezeichnet. Der Körper kann das zugrunde gegangene organspezifische Gewebe nur durch Bindegewebe ersetzen. Nach dem Abraum der Nekrose sprießen von unversehrten, benachbarten Gewebsbereichen Kapillaren und Bindegewebe in den Defekt ein. Dieses junge, zellreiche Bindegewebe (Granulationsgewebe), das aufgrund seines hohen Gehaltes an Kapillaren rötlich erscheint, wächst vom Rand her immer weiter in das Zentrum des Defektes und füllt diesen schließlich vollständig. Bald ändert sich durch verstärkte Synthese von Interzellulärsubstanz sowie retikulären und kollagenen Fasern die Zusammensetzung des Granulationsgewebes. Die Anzahl der Kapillaren nimmt allmählich wieder ab. Das zellreiche Granulationsgewebe wandelt sich allmählich in ein zell- und kapillararmes, aber faserreiches Bindegewebe (Narbengewebe) um. Dieses Narbengewebe garantiert zwar den mechanischen Zusammenhalt im Gewebsverband, ist aber ansonsten funktionell minderwertig, d.h. es kann die spezifischen Leistungen der nekrotisch gewordenen Parenchymzellen nicht übernehmen.

1.4. Fibrose nach Herztransplantation

Die Beobachtung, dass es nach einer Herztransplantation zu einer Zunahme des Bindegewebes im Herzmuskel kommt, ist in der Vergangenheit häufiger beschrieben worden [49][63]. Jedoch ist die Ätiologie der Herzfibrose nach HTx bislang noch nicht ausreichend geklärt. In der Literatur werden verschiedene Ursachen, die zu einer Fibroseentwicklung führen, kontrovers diskutiert.

Die interstitielle Fibrose trat insbesondere auf, als Cyclosporin in den frühen 80er Jahren zu der immunsuppressiven Therapie hinzugefügt wurde [6][20]. Als die renalen Nebenwirkungen auftraten, wurde die Cyclosporin-Dosis reduziert und die Häufigkeit der Entstehung einer interstitiellen Fibrose, die mittels Endomyokardbiopsien kontrolliert wurde, reduzierte sich. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass die Fibroseentstehung möglicherweise ein dosisabhängiges Problem sein könnte [64].

Billingham [7] verweist 1985 darauf, dass Unterschiede zwischen der Abstoßungsreaktion unter Cyclosporin-Therapie und unter konventioneller immunsuppressiver Therapie mit Azathioprin und Kortikosteroiden bestehen. Die Nebenwirkungen von Cyclosporin

führen u.a. zu einer Entwicklung endokardialer Infiltrate und einer dosisabhängigen Herzfibrose [64].

Tazelaar et al. [64] sehen auch eine positive Korrelation zwischen der Cyclosporin-Dosis und der Entwicklung von Kollagen Typ III, IV und V. Je höher die Cyclosporin-Dosis ist, desto mehr Kollagen Typ III, IV und V wird abgelagert. Dieser Trend ist jedoch statistisch gesehen nicht signifikant. Die Autoren sehen diesen Mangel möglicherweise in der relativ kleinen Anzahl an analysierten Biopsien (N=30) begründet. Um signifikante Zusammenhänge aufdecken zu können, hier am Beispiel des Kollagengehaltes, sind bestimmte Mindestgrößen der Stichprobe für valide statistische Tests unabdingbar. Die vorliegende Arbeit stützt sich auf 2551 Biopsien, die Gegenstand der Untersuchungen sind. Diese Grundgesamtheit ist für die Durchführung valider statistischer Tests repräsentativ.

Myles et al. [41] beobachten ebenfalls die Entstehung einer myokardialen Fibrose unter Cyclosporin. Dagegen können Rowan et al. [53] nach ihren Studienergebnissen unter Cyclosporin-Behandlung keinen signifikanten Anstieg des Kollagengehaltes verzeichnen.

Von einigen Autoren [34][49][54][64][72] wird ein signifikanter Einfluss der Dauer der Ischämie auf die spätere Entwicklung einer Myokardfibrose beschrieben. Die Ischämie des Spenderorgans nach der Transplantatentnahme wird erst beendet, wenn es durch den Blutkreislauf des Empfängers reperfundiert wird. Tazelaar et al. [64] zeigen eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Ausbildung von Kollagen Typ I und längerer Ischämiezeit. Sie stellen fest, dass Patienten, die Herzen mit einer mittleren Ischämiezeit von 154 Minuten transplantiert bekamen, mehr Kollagen Typ I aufwiesen als Patienten, deren transplantierte Herzen eine mittlere Ischämiezeit von 59 Minuten ausgesetzt waren.

Magener et al. [34] schlussfolgern, dass es bei Patienten mit langen Ischämiezeiten (229 Min) erst nach Ablauf der zweiten Woche nach orthotoper Herztransplantation sowohl peri- als auch endomysial zu einer relevanten Bindegewebsvermehrung kommt. Bei kürzeren Ischämiezeiten (99 Min) zeigt sich lediglich eine tendenzielle Bindegewebszunahme. Auch Pickering et al. [49] stellen fest, dass Biopsien aus Herzen mit Ischämiezeiten von 121-240 Minuten und von über 240 Minuten signifikant mehr Kollagen aufweisen als Biopsien von Herzen mit kürzeren Ischämiezeiten. Nach ihren Untersuchungen korreliert die Stärke der Fibrose somit eindeutig mit der Ischämiezeit. Sack et al. [54] vertreten ebenfalls die Ansicht, dass das Ausmaß an interstitieller Fibrose nach HTx abhängig von der Dauer der Ischämie ist. Yamani et al. [72] sehen ebenfalls den Zusammenhang zwischen Ischämiezeiten und

Fibroseentwicklung. Armstrong et al. [2] sehen hingegen in ihrer Studie keine Korrelationen zwischen der Ischämiezeit und der Fibroseentwicklung. Eine von Rowan et al. [53] durchgeführte morphometrische Studie zeigt ebenfalls keinen signifikanten Einfluss der Dauer der Ischämiezeit auf die spätere Entwicklung einer Myokardfibrose.

Nach der kurzfristigen Ischämie des Spenderorgans entsteht nach Reperfusion des Organs durch den Blutkreislauf des Empfängers der so genannte Ischämie-Reperfusionsschaden. Dieser Schaden kann bei einem perioperativen Bedarf des Spenders an hohen Dosen von Katecholaminen oder bei einer Notfallbehandlung mit blutdrucksteigernden Medikamenten noch verstärkt werden [4]. Histologisch zeigt sich der ischämische Schaden kurz nach der Transplantation in einer Myozytennekrose, die in keinem Verhältnis zum zellulären Infiltrat steht, welches vorherrschend polymorphkernig ist [18]. Das Entzündungszellinfiltrat mit neutrophilen Granulozyten kann bis zu sechs Wochen nach Transplantation nachgewiesen werden [4].

Nach einer Endomyokardbiopsie unterliegt die Biopsieentnahmestelle einer progressiven Reorganisation [65]. Tan et al. [60] und Kottke-Marchant et al. [32] beschreiben, dass an der Stelle der Endomyokardbiopsie Granulationsgewebe entsteht. Später kommt es als Zeichen des regenerativen Gewebeumbaus zur Ausbildung von Fibrose, die Entzündungszellen enthalten kann [60]. Tazelaar et al. [63] machen ebenfalls diese Beobachtungen.

1.5. Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation

Die Früherkennung akuter Abstoßungsreaktionen ist entscheidend für den Erfolg der Herztransplantation. Grundlage für die Diagnose einer akuten zellulären Abstoßung ist das histologisch gesicherte Auftreten und die Quantifizierung von Entzündungszellinfiltraten und Kardiomyozytenschädigungen. Das Entzündungszellinfiltrat besteht überwiegend aus Lymphozyten, wobei auch Makrophagen nachweisbar sind. Histologisch zeigen sich die Myozytenschädigungen in einer Eosinophilie des Zytoplasmas. Die lymphozytären Infiltrate bestehen überwiegend aus T-Lymphozyten. Das Auftreten von neutrophilen Granulozyten findet man bei einer schweren zellulären Abstoßung, jedoch selten bei moderater oder milder Abstoßung [4]. Es gibt verschiedene andere Prozesse wie beispielsweise Heilungsprozesse oder Infektionen, die ebenfalls ein zelluläres Infiltrat erzeugen. Diese müssen differentialdiagnostisch von der akuten Abstoßung abgegrenzt werden [59].

Die vaskuläre Rejektion (heute gebräuchlicher als humorale bzw. antikörpervermittelte Abstoßung bezeichnet) kann innerhalb der ersten Monate nach Herztransplantation auftreten. Die Prävalenz der akuten humoralen Abstoßung beträgt 10-40% und die Mortalitätsrate wird nach

Baba et al. [4] auf 21% geschätzt. Ihr liegt ätiologisch meist die Entwicklung von Antikörpern gegen das Transplantat zugrunde. Liegen beim Empfänger bereits präformierte Antikörper vor, z.B. nach Erhalt zahlreicher Blutkonserven, können diese Antikörper bereits innerhalb der ersten zwei bis sieben Tage, bis hin zu Monaten bis Jahren nach HTx eine Abstoßung auslösen. Zu einer Funktionsstörung des Transplantates kommt es in 2/3 der Fälle bei einer frühzeitig auftretenden Abstoßungsreaktion. Bei der Hälfte der Patienten kommt es als Folge zu hämodynamischen Konsequenzen wie z.B. Hypotension und verminderte kardiale Auswurfleistung [51][62]. Die ISHLT fordert für die Diagnose der humoralen Rejektion den Nachweis von einer endokapillären Ablagerung der Immunglobuline (IgG, IgM und oder IgA), der Komplementfaktoren C4d, C3d und/oder C1q, zusammen mit dem intravaskulären Nachweis von CD 68 positiven Makrophagen. Fakultativ können interstitielle Ödeme, Hämorrhagien, intravaskuläre Thromben, sowie ein perivaskuläres Infiltrat bestehend aus Neutrophilen auftreten. Ebenso fakultativ ist neben den genannten histopathologischen Befunden der serologische Nachweis spenderspezifischer HLA-Antikörper der Klassen I bzw. II [4][51][59].

Die Graduierung der zellulären Abstoßung erfolgt nach dem ISHLT-Schema [14][32][33][42][45][63]. Die seit 1990 geltende histologische ISHLT-Klassifikation der akuten Transplantatabstoßung wurde ab dem Jahr 2005 durch eine revidierte Fassung ersetzt. Das Grading-System unterscheidet 4 Grade. „R“ beschreibt die revidierte Fassung, um Verwechslungen mit dem alten Schema zu vermeiden. Die Abwesenheit von akuter Abstoßung wird als Grad 0R bezeichnet. Die früheren Grade 1A, 1B und 2 werden als 1R („milde Abstoßung“) zusammengefasst. Der frühere Grad 3A wird nun als 2R („moderate Abstoßung“) bezeichnet, während die früheren Grade 3B und 4 zu 3R („schwere Abstoßung“) zusammengefasst werden [59].

ISHLT Grad 0R (= „keine Abstoßung“)

Keine Abstoßung.

ISHLT Grad 1R (= „milde Abstoßung“)

Interstitielle und/oder perivaskuläre Infiltrate; höchstens ein Fokus mit Myozytenschaden.

ISHLT Grad 2R (= „moderate Abstoßung“)

Zwei oder mehr Infiltrate mit Myozytenschaden.

ISHLT Grad 3R (= „schwere Abstoßung“)

Diffuses Infiltrat mit Myozytenschaden ± Ödem, ± Einblutung, ±Vaskulitis.

Am Deutschen Herzzentrum in Berlin wurde die ISHLT-Klassifikation um die Klasse 01A ergänzt, die von Prof. Dr. R. Meyer zusätzlich eingeführt wurde. Sie ist definiert als minimale beginnende Rejektion, die von perivasalen und/oder interstitiellen Lymphozyteninfiltrationen begleitet wird.

Neben den akuten Abstoßungsreaktionen gibt es die chronische Abstoßungsreaktion. Unter dem Begriff der chronischen Abstoßung versteht man die progressive Lumeneinengung der Koronargefäße im transplantierten Herzen. Da die Ursachen der chronischen Abstoßung bisher nicht eindeutig geklärt sind, wurde der Begriff „Transplantatvaskulopathie“ eingeführt [3][60]. Die Transplantatvaskulopathie stellt nach wie vor ein ungelöstes Langzeitproblem nach HTx dar [23]. Mehra et al. [38] bezeichnen die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie als „Achillesferse“ der Herztransplantation. Diese Erkrankung ist die dritthäufigste Todesursache nach Infektionen und akuten Abstoßungen im ersten Jahr nach Herztransplantation. Im Langzeitverlauf stellt sie die Haupttodesursache dar [68]. Die Mechanismen, die zur chronischen Rejektion führen, gliedern die Autoren in immunologische und nicht-immunologische Faktoren. Ramzy et al. [50] nennen als immunologische Faktoren: Histokompatibilitätsdifferenzen, akute Abstoßungsreaktionen und chronische Entzündungen. Als nicht-immunologische Ursachen betrachten sie z.B. CMV- Infektionen, Alter und Geschlecht sowie allgemeine kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes, Hypertonie, Rauchen und die Dyslipidämie. Eine besondere Bedeutung kommt der Hyperlipidämie und der Insulinresistenz zu, da sie bei 50-80% der Fälle bei herztransplantierten Patienten vorliegen.

Es werden sowohl zelluläre Reaktionen (vorwiegende Beteiligung von T-Lymphozyten und Makrophagen) als auch humorale Antikörper beobachtet [60]. Einige Autoren [45][60] sehen vor allem den T-Zell vermittelten Prozess als ursächlich für die chronische Rejektion an. Endothelzellen exprimieren MHC Klasse I und II auf ihrer Oberfläche. Diese MHC-Moleküle sind Zielscheiben der zell- und immunvermittelten Antwort. T-Lymphozyten wandern ein und sezernieren Zytokine – vor allem IL-2, IFN γ und TNF α –, die zur Entwicklung der vaskulären Prozesse führen [14][38][50]. Es kommt zu einer lumenobliterierenden Intimaverbreiterung, vor allem der größeren Arterien [3][50][63]. Außerdem finden sich innerhalb der verbreiterten Intima vor allem Fibroblasten und Makrophagen. Makrophagen sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren für die glatten Muskelzellen der Gefäße. Somit kommt es zur Proliferation von glatten Muskelzellen [60]. Histologische Veränderungen sind schaumzellig transformierte Makrophagen in der konzentrischen Intimaverdickung, subendotheliale Ansammlungen von Lymphozyten und perivaskuläre Fibrose [32][44][60]. Die Lumeneinengung führt zu

ischämischem Herzschaden mit nachfolgender Myokardfibrosierung sowie zu einem kontinuierlichen Funktionsverlust [9].

Hiemann et al. [27] heben die Bedeutung hervor, die der Erkennung von Veränderungen im Rahmen der Entstehung einer Transplantatvaskulopathie zukommt. Nach ihren Untersuchungen zeigen mehr als 40% der Empfänger im ersten Jahr nach HTx Zeichen der stenosierenden Mikrovaskulopathie. Patienten, die in mehr als 60% ihrer Biopsien morphologische Veränderungen in der Mikrostrombahn aufweisen, haben ein verkürztes Langzeitüberleben nach HTx. [26] Um frühzeitig morphologische Veränderungen feststellen zu können, hat das Deutsche Herzzentrum in Berlin bei der Beurteilung von Endomyokardbiopsien deswegen eine weitere gesonderte Klassifikation eingeführt.

Bei der vaskulären Reaktion wird die Morphologie der Endothelzellen und der Blutgefäßwände nach folgendem Schema beurteilt:

Grad 0 = Endothelzellen unauffällig, Blutgefäßwand nicht verdickt, keine Proliferation

Grad 1 = Endothelzellen gering geschwollen, Wand geringgradig verdickt durch Proliferation

Grad 2 = Endothelzellen stark geschwollen, Wand stark verdickt durch Proliferation.

Morphologische Veränderungen der terminalen Strombahn ohne Lumeneinengungen werden als Hinweise auf eine Transplantatvaskulopathie bewertet. Die Darstellung einer Lumeneinengung wird als morphologisches Zeichen einer Transplantatvaskulopathie graduiert. Morphologische Zeichen einer Transplantatvaskulopathie weisen 10% der Biopsien auf, bei 37% bestehen morphologische Hinweise auf das Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie. [23]

Außerdem wird zu dieser modifizierten Form der Rejektionsdiagnostik das histologische Material auf das Vorhandensein des Quilty-Effekts untersucht. Dieses Phänomen auch als Quilty-Läsion oder Quilty-Phänomen bezeichnet, ist nach dem ersten Patienten benannt, bei dem diese Veränderung beobachtet wurde [45]. Die klinische und pathogenetische Bedeutung der Quilty-Läsion ist unklar [45][52][59][71]. Der Quilty-Effekt tritt in 10-20% der Fälle bei Endomyokardbiopsien nach HTx auf [59][71]. Das Entzündungszellinfiltrat besteht aus B-Lymphozyten, Plasmazellen und T-Lymphozyten. Im Vergleich zur zellulären Abstoßung liegt ein größerer Anteil an B-Lymphozyten vor. Am DHZB werden bei der Beurteilung des histologischen Materials drei Effekte unterschieden:

0 = kein Quilty-Effekt

1 = Quilty-Effekt ohne Myokardbeteiligung

2 = Quilty-Effekt mit Myokardbeteiligung

Hiemann et al. zeigen, dass das Vorhandensein des Quilty-Effektes im ersten Jahr nach HTx mit einem erhöhtem Risiko für die Entwicklung von stenosierenden Prozessen in der Mikrostrombahn assoziiert ist. Beide Phänomene sind in der Folge Risikofaktoren für einen Transplantatverlust [23][25].

Mehra et al. [38] kritisieren, dass die histologischen Korrelate der Transplantatvaskulopathie durch kleine Studienpopulationen in ihrer Aussagekraft limitiert sind. Außerdem sind konzentrische Intimaverdickung mit und ohne schaumzellig transformierten Makrophagen, subendotheliale Ansammlungen von Lymphozyten und perivaskuläre Fibrose unspezifische Veränderungen. Die Autoren erklären, dass endomyokardiale Befunde eine limitierte Sensitivität zur Diagnostik der Transplantatvaskulopathie besitzen. Die Klinik des Patienten ist uncharakteristisch, vor allem weil aufgrund der funktionellen Denervierung des transplantierten Herzens eine typische Angina pectoris fehlt. Ventrikuläre Arrhythmien, Zeichen der Herzinsuffizienz auf dem Boden einer myokardialen Ischämie, stumme Herzinfarkte oder plötzlicher Herztod sind häufig die ersten Manifestationen.

2. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Studie werden histomorphometrische Biopsiedaten aus dem rechten Herzventrikel, die im Rahmen der postoperativen Kontrollen nach HTx am Deutschen Herzzentrum in Berlin im Zeitraum von 1998 bis 2009 erhoben wurden, untersucht. Anhand von Endomyokardbiopsien können Veränderungen des Myokards wie z.B. Fibrose- und Narbenbildung beurteilt werden. Diese sind zentraler Gegenstand unserer Untersuchungen, über die statistisch signifikante Aussagen geprüft werden. Herztransplantierte Patienten unterliegen lebenslang der Gefahr, eine zelluläre Abstoßungsreaktion zu erleiden. Die rechtsventrikulären Endomyokardbiopsieproben wurden im Zusammenhang mit den Daten der untersuchten Patienten, ihrem Geschlecht und ihrem Alter sowie zeitgleichen und vorangegangenen Abstoßungsreaktion statistisch bewertet. Die Beurteilung der akuten zellulären Rejektionen erfolgt streng nach der von der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) empfohlenen Klassifikation und ihrer Ergänzung.

Dieser Komplex scheint in der Literatur bisher unzureichend bearbeitet.

Die vorliegende Arbeit will einen Beitrag zu dieser Thematik leisten.

Die Arbeit hat zum Ziel, die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Welche quantitativen Veränderungen des interstitiellen Myokardgewebes (Fibrose, Narben) lassen sich im postoperativen Beobachtungszeitraum nach Herztransplantation beobachten?
2. Sind im postoperativen Verlauf nach Herztransplantation Muster oder Trends in den quantitativen Daten der Fibrose- und Narbenmessungen zu beobachten?
3. Können Beziehungen zwischen den interstitiellen Veränderungen (Fibrose, Narben) und den patientenbezogenen Daten (Alter, Geschlecht) festgestellt werden?
4. Welche Beziehungen bestehen zwischen den interstitiellen Veränderungen (Fibrose, Narben) im rechtsventrikulären Myokard herztransplantiertter Patienten und den einzelnen Schweregraden der Rejektionsereignisse entsprechend der Klassifikation nach ISHLT?
5. Welche Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Herztransplantation lassen sich insgesamt und nach Patientengeschlecht berechnen?
6. Welche Überlebenswahrscheinlichkeiten ergeben sich aus der ISHLT-Erstdiagnose nach Herztransplantation?

7. Lassen sich prognostisch verwertbare Richtwerte für die Fibroseanteile an der Gesamtfläche der Biopsie aus der Literatur bestätigen oder aus dem empirischen Material unserer Studie definieren?

3. Material und Methoden

3.1. Material

Im Arbeitsbereich Herzpathologie im Deutschen Herzzentrum in Berlin (DHZB) unter der Leitung von Prof. Dr. R. Meyer wurden die Daten von Endomyokardbiopsien aus dem rechten Ventrikel nach HTx in einem opto-analytischen Verfahren gewonnen und nach einem festgelegten Standard tabellarisch dokumentiert und graphisch dargestellt, sowie in einer Datenbank abgelegt.

Das Material der retrospektiven Studie wurde am Deutschen Herzzentrum in Berlin im Zeitraum von 1998 bis 2009 erhoben. 2785 Endomyokardbiopsien mit insgesamt 10.476 Proben von 855 herztransplantierten und durch eine PIN-Nr. identifizierten Patienten wurden entnommen. Damit liegen im Durchschnitt 3,3 Biopsien je Patient vor, wobei bei zwei Patienten ein Maximalwert von 19 Biopsien erreicht wurde. Die International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) schreibt vor, dass im Zuge des diagnostischen Vorganges der Biopsieentnahme mindestens drei Proben pro Patient entnommen werden müssen.

Die Daten wurden entsprechend der Datenschutzrichtlinie des DHZB anonymisiert für die vorliegende Arbeit aufbereitet. Die 855 Patienten verteilen sich auf 183 Frauen (21,4 %) und 672 Männer (78,6 %).

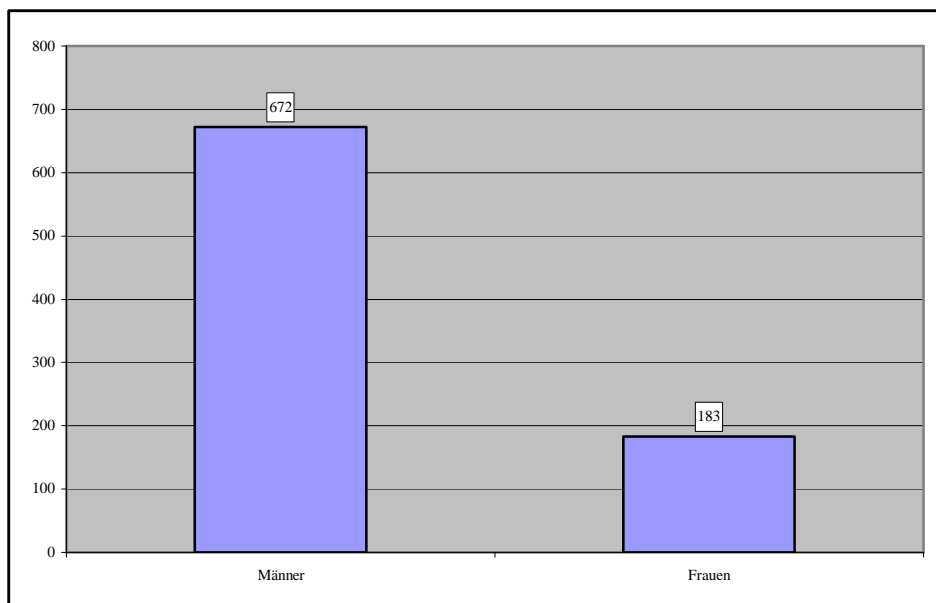


Abb. 2 Geschlechterverteilung der untersuchten herztransplantierten Patienten des DHZB

Das Durchschnittsalter der Patienten lag zum Zeitpunkt der HTx bei 43 Jahren (Median: 48).

3.2. Methoden

3.2.1 Fibrosemessung

Verfahren zur biometrischen Fibrosemessung sind in der Literatur beschrieben, die allgemeinen Grundzüge zusammenfassend in der Promotionsarbeit von C. Fechler [17]. Eine Darstellung auch der Details dieses Verfahrens fehlt jedoch bisher trotz der hohen Bedeutung, die ihm im Rahmen des Abstoßungsmonitorings zukommt.

Für die Auswertung im Rahmen der histomorphometrischen Analyse werden benötigt:

1) Durchlichtmikroskop (Axioskop) (Carl Zeiss)

Für die Fibrosemessung notwendige Mikroskopeinstellungen:

Objektiv 20x

Tubus 1,0x

Okular 10x

Helligkeit 11,5

Graufilter

2) CCD-Kamera (Sony)

Das Bild des mikroskopischen Blickfeldes wird mit Hilfe der Kamera auf einen Computerbildschirm übertragen.

3) Bildanalysesoftware KS 400 (Release 3.0, Carl Zeiss Vision)

Automatisiertes Auswertungsprogramm zur Messung des Anteils an interstitiellem Bindegewebe und des Narbengewebes auf der Grundlage von KS 400 (Makro: BGW 7 nach Dipl. Ingenieur T. Betz / Prof. Dr. R. Meyer)

4) Microsoft-Excel™

Zunächst wird das erste zu messende Feld eines Sirius bzw. Domagk gefärbten histologisierten Präparates eingestellt. Das Bild muss scharf eingestellt sein, und es muss auf das Fehlen von optisch freien Räumen des Myokards geachtet werden. Am Computer werden nun

die Bildanalysesoftware KS 400, 3.0 und Microsoft Excel™ aktiviert. Auf dem Desktop erscheint das Messprogramm mit Display für den definierten Präparatausschnitt.

In den folgenden Schritten fordert das Messprogramm dazu auf, die vorher bereits durchgeführten Mikroskopeinstellungen zu bestätigen. Es beginnt die so genannte „Anlernphase“, die dazu dient, der Software die sachgerechte Segmentierung beizubringen (Abb. 3).

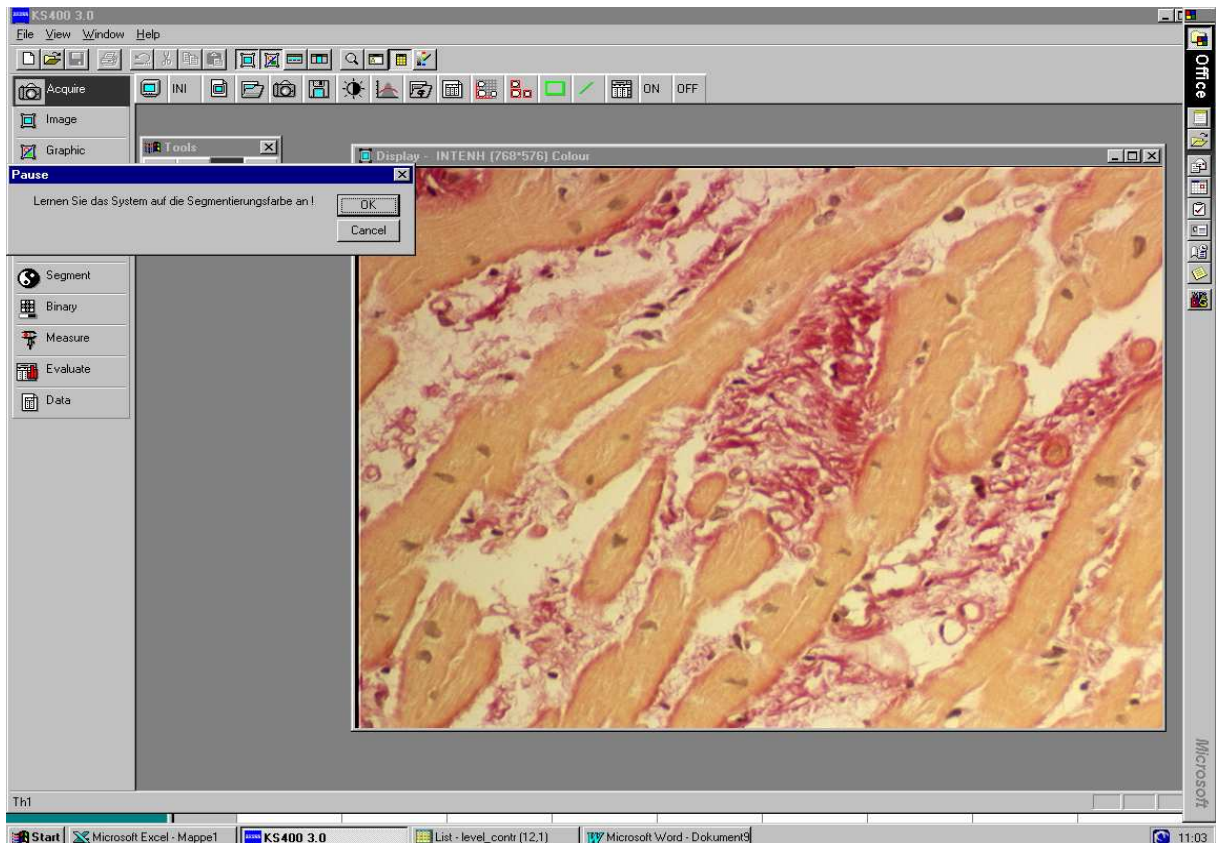


Abb. 3 Screenshot 1

Der Prozess der Segmentierung beinhaltet die Umwandlung der Farben, die während des Messvorgangs erfasst werden, in Grautöne. Die Farben stellen die bindegewebigen Strukturen des Präparates dar. Die Grautöne werden dann in einem Messvorgang quantitativ erfasst.

Man markiert nun die Fibroseareale im Präparat, in dem Sättigung, Helligkeit und die Farbe eingestellt wird. Die nun markierten Fibroseanteile werden mit „ok“ bestätigt (Abb.4).

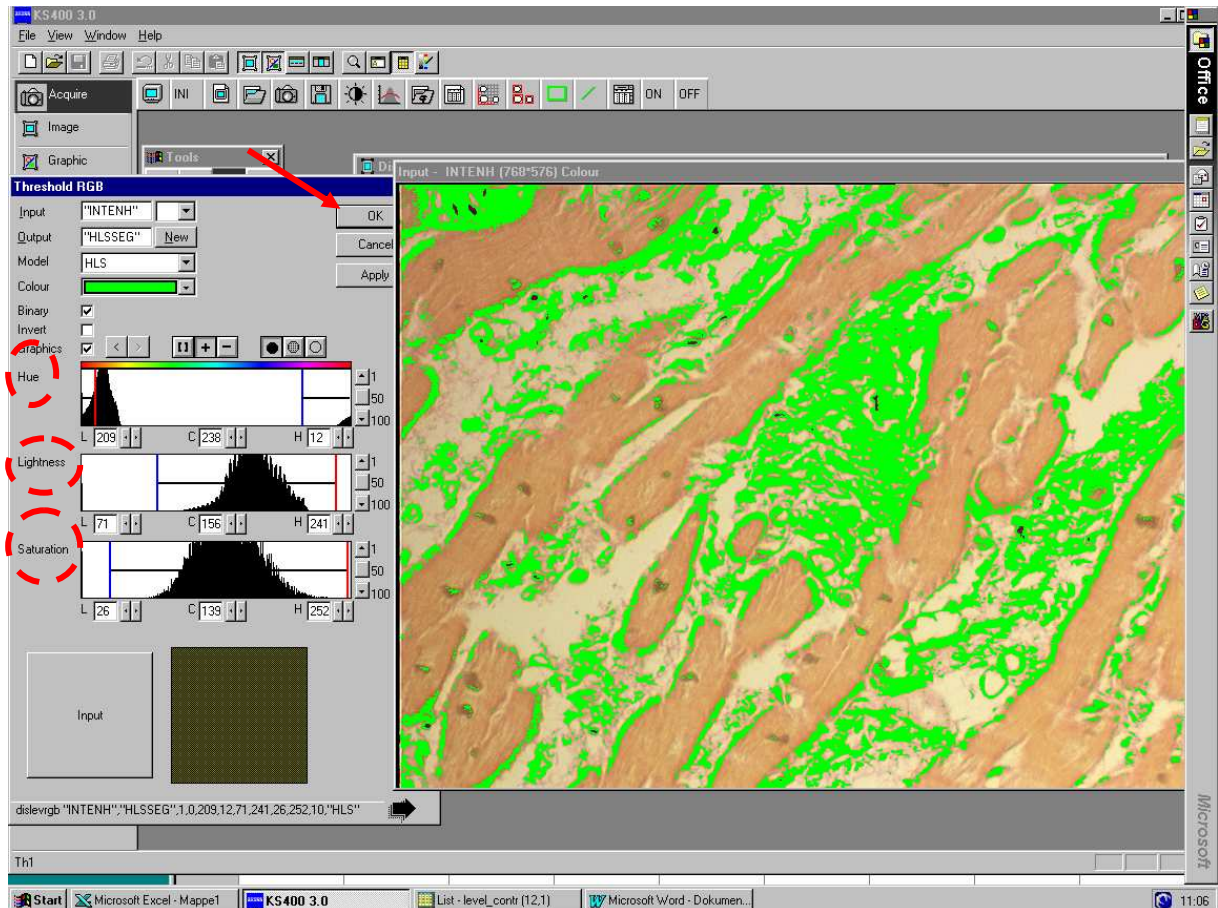


Abb. 4 Screenshot 2

Das Programm ist jetzt für das aktuelle Präparat „angelern“. Es folgt die Messphase. Für jede Messung wird ein neuer Präparatausschnitt am Mikroskop eingestellt. An jeder Endomyokardbiopsie werden 12 Messstellen erfasst, die eine Gesamtfläche von 1mm^2 ergeben. Die Messfelder der Schnitte sind zufällig zu wählen.

Die Segmentierung wird mit „ok“ bestätigt (Abb. 5).

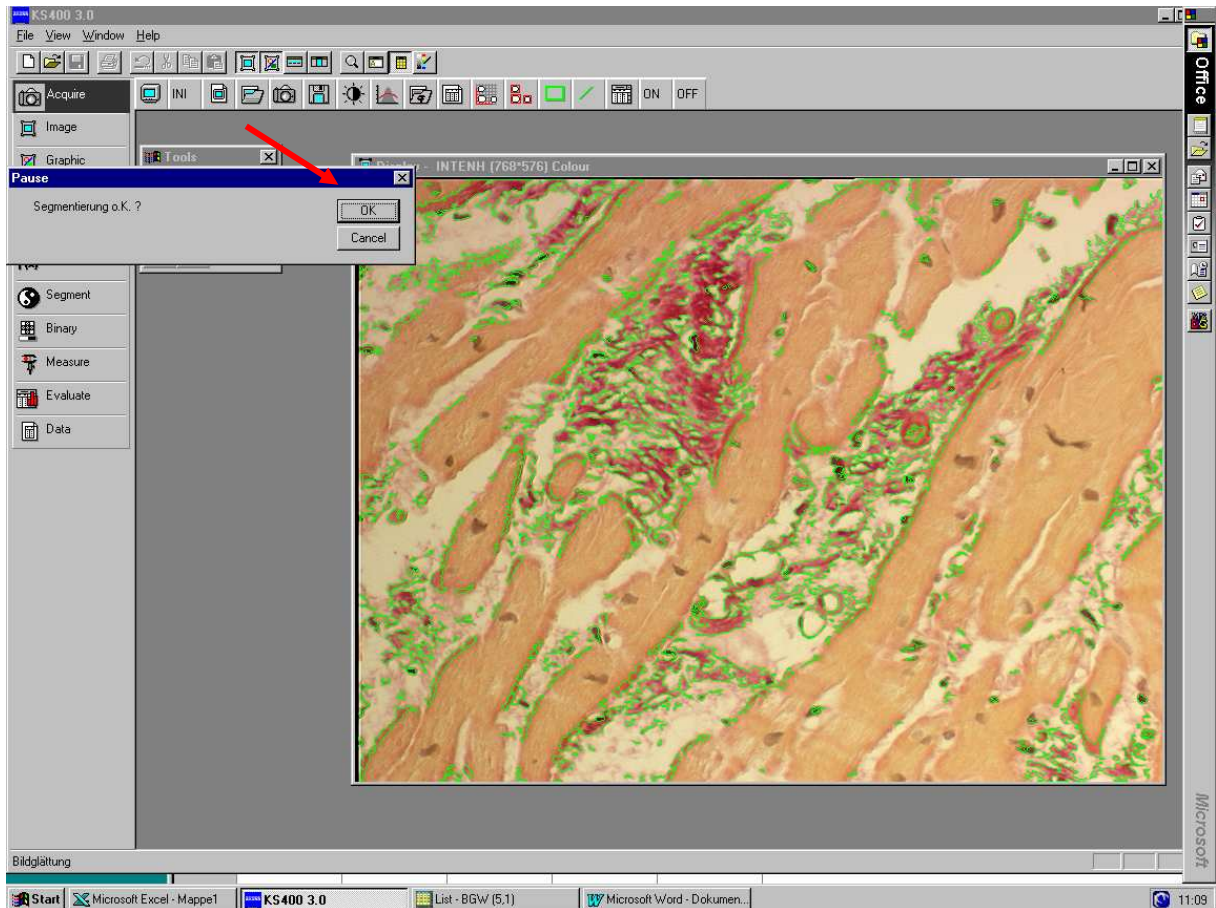


Abb. 5 Screenshot 3

In einem weiteren Arbeitsschritt können Narben im Gewebe vom Untersucher für den Messvorgang mit Hilfe der Software am Bildschirm definiert werden. Um die Narben im Präparatausschnitt zu markieren, müssen folgende Befehle eingegeben werden (Abb.6):

1. „Region Reject“ anklicken.
2. Mit dem Cursor auf das rechte kleine Display gehen, rechte Maustaste drücken und dann wieder mit der linken Maustaste „Big Display“ anklicken.
3. Mit der Maus auf das Display gehen, es erscheint ein weißes Fadenkreuz.
4. Die so markierten Narbenareale werden durch einen gesonderten Messvorgang erfasst.

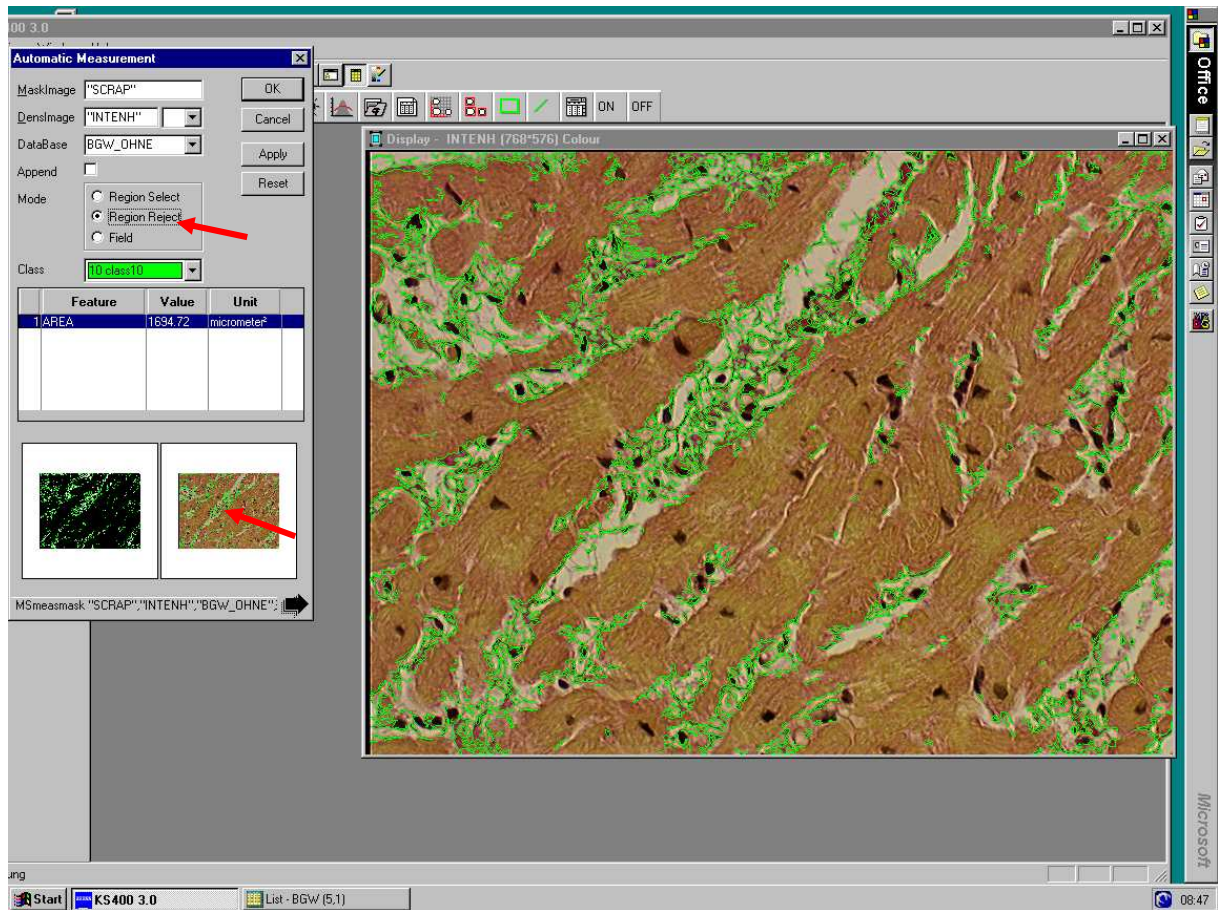


Abb. 6 Screenshot 4

Nach der Markierung der Narben „Field“ anklicken und mit „ok“ bestätigen (Abb. 7).

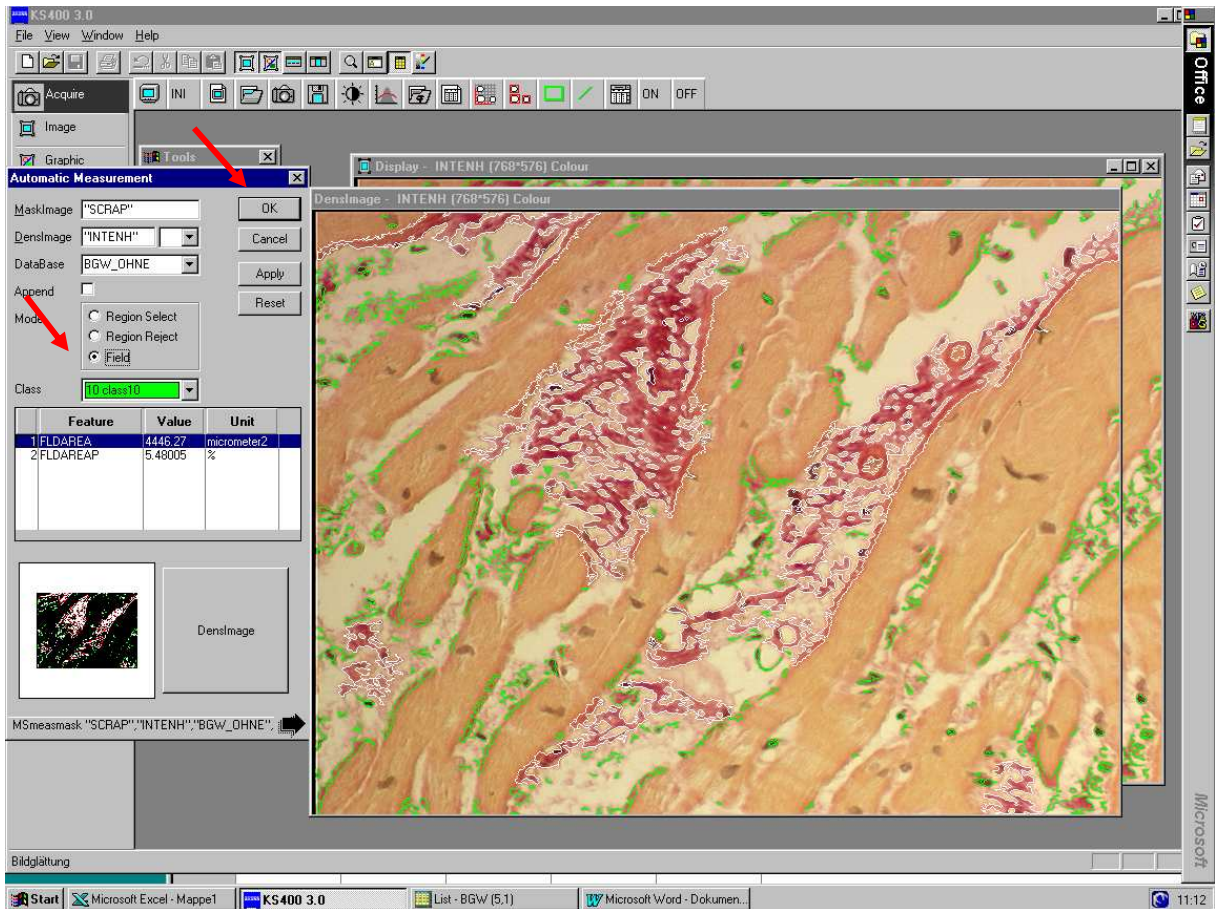


Abb. 7 Screenshot 5

Nach 12 Messungen erfolgt der Datentransfer in eine Exceldatei. Hierfür wird am unteren Bildschirmrand „List BGW (5,12)“ aufgerufen und dann auf „Edit und Copy Ctrl+C“ geklickt (Abb. 8).

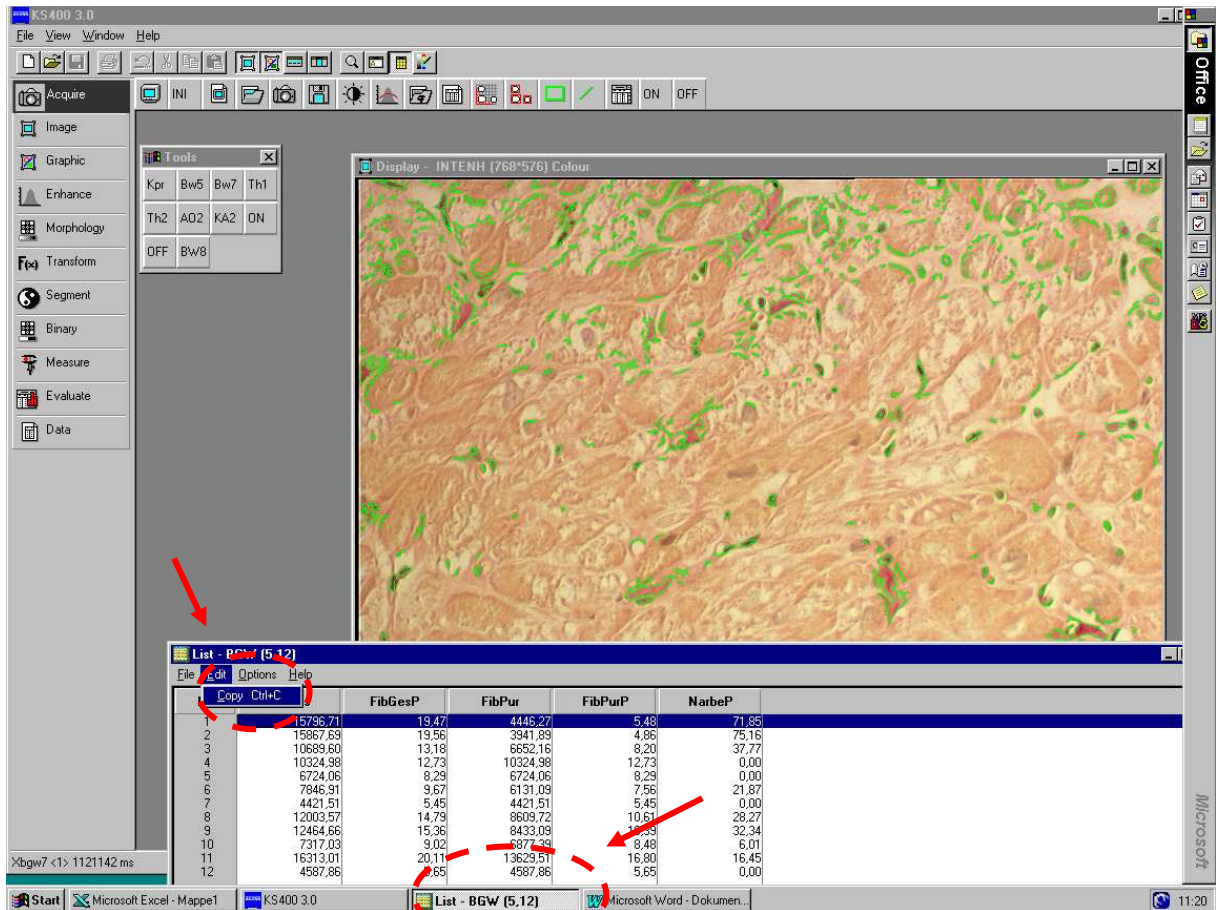


Abb. 8 Screenshot 6

Nun werden Daten in eine Microsoft-Excel™-Mappe eingefügt. In einem zweiten Schritt werden die Werte in ein bereits bestehendes Dateiformat kopiert. Diese Datei ist das Fibroseprotokoll „Befundbericht: Fibrose“. Sie enthält nun die Messergebnisse und stellt ein Diagramm zur Fibroseverteilung in der Gewebeprobe dar (Abb. 9).

Pro Biopsie wurden jeweils 12 Messungen zur Fibrosebestimmung sowie zur Narbenbildung durchgeführt. Ergänzt um die daraus berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich für jede Biopsie 14 Datensätze, insgesamt mehr als 36.000 Einzeldaten.

Der Befundbericht enthält als Spalten folgende Parameter:

- Gesamtfläche der Fibrose in Quadratmikrometern (Fibrose_μm²) und in Prozent (Fibrose_%) als vH-Anteil an der Gesamtfläche der Biopsie

- Die reine Fibrose (Gesamtfläche der Fibrose abzüglich der Narbe) in Quadratmikrometern (Fibrose_pur_μm²) und in Prozent (Fibrose_pur_%), ebenfalls als vH-Anteil an der Gesamtfläche der Biopsie
- Das Narbengewebe wurde als Prozentanteil an der Fläche der Fibrose (Narben_%) erfasst.

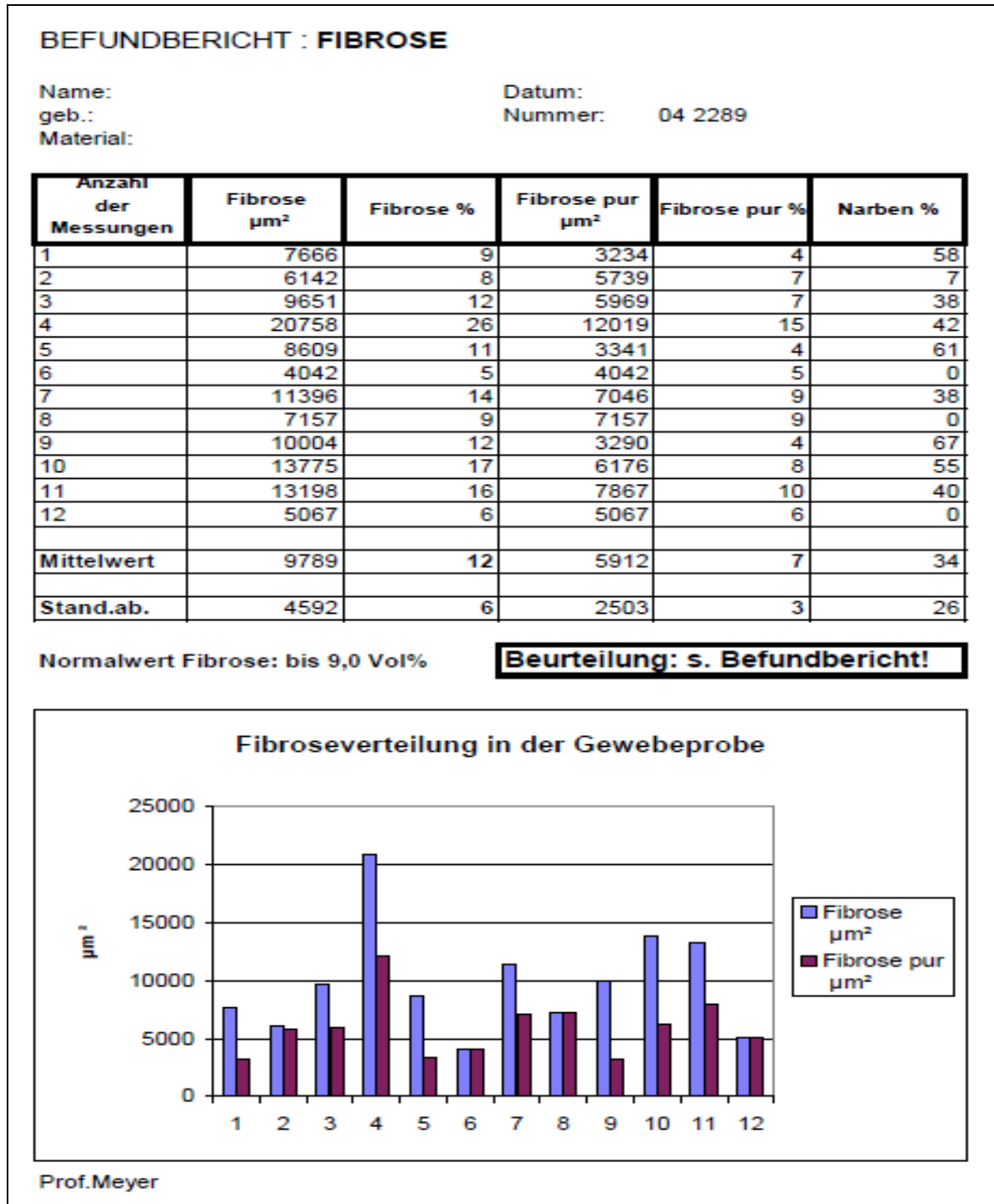


Abb. 9 Befundbericht Fibrose

Aus den 12 Messdaten (= Zeilen des Befundberichts) wurden die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die 12 Messwerte der „Gesamtfläche der Fibrose“ (Fibrose_μm²) und die „reine Fibrose“ abzüglich des Narbengewebes (Fibrose_pur_μm²) wurden grafisch in einem Säulendiagramm dargestellt.

Das Narbengewebe wurde als relativer Anteil an der Gesamtfibrose gemessen und in % angegeben. Die Anteilswerte der Fibrose und der reinen Fibrose sind demgegenüber auf die Gesamtfläche der Biopsie bezogen. Da das Narbengewebe als Differenz zwischen Fibrose und Fibrose_pur definiert ist, erfolgte eine entsprechende Neuberechnung, die das Narbengewebe ebenfalls als Prozentanteil an der Gesamtfläche der Biopsie darstellt und auf diese Weise in eine einheitliche Vergleichsdimension stellt.

Der postoperative Beobachtungszeitraum wurde in 12 Erhebungsintervalle unterteilt und die einzelnen Messwerte innerhalb eines Intervalls zu einem Mittelwert zusammengefasst. Diese Einteilung bildet eine einheitliche Grundlage für die zeitabhängige Darstellung des Fibrosegeschehens nach HTx.

Folgende Erhebungsintervalle (EI) wurden gewählt:

EI 1: 1. Monat post HTx,	EI 7: 7.-12. Monat post HTx,
EI 2: 2. Monat post HTx,	EI 8: 2. Jahr post HTx,
EI 3: 3. Monat post HTx,	EI 9: 3. Jahr post HTx,
EI 4: 4. Monat post HTx,	EI 10: 4. Jahr post HTx,
EI 5: 5. Monat post HTx	EI 11: 5. Jahr post HTx,
EI 6: 6. Monat post HTx	EI 12: > 5. Jahr post HTx

Zu Beginn der Beobachtungen wurden relativ kleine Zeitabschnitte gewählt, da davon auszugehen ist, dass in den ersten 6 Monaten nach HTx wesentliche Veränderungen auf histologischer Ebene stattfinden. Ab dem 7. Monat wurden die Zeitabschnitte in zwei Schritten vergrößert. Zuerst von 30 auf 180 Tage, dann auf 360 Tage, um die Anzahl der Endomyokardbiopsien auf einem repräsentativen Niveau zu halten.

Die deskriptiven und verschiedenen explorativen statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Computerprogramms PASW (ehemals SPSS) Statistics 18 für Microsoft Windows Version sowie IBM[®] SPSS[®] Statistics Version 20.

3.2.2 Codierung innerhalb der Microsoft-Access™ Datenbank

Um Abfragen nach unterschiedlichen Kriterien durchführen zu können, wurde aus den Daten der Microsoft-Excel™ Tabelle eine Microsoft-Access™ Datenbank aufgebaut.

Zur Bewertung der Daten hinsichtlich der zellulären Abstoßung wird wie üblich auf die Skala der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) zurückgegriffen. Ihre erste Arbeitsfassung von 1990 [5] wurde ab 2004 einer Revision unterzogen, nach der die Abstoßungsreaktionen bei HTx gegliedert werden:

Grade 0 R--no rejection (no change from 1990)

Grade 1 R--mild rejection (1990 Grades 1A, 1B and 2)

Grade 2 R--moderate rejection (1990 Grade 3A) and

Grade 3 R--severe rejection (1990 Grades 3B and 4) [59]

In dieser Arbeit wird die differenzierte Gliederung der 1990er Fassung beibehalten, ergänzt um die in der ISHLT-Klassifikation nicht enthaltene Klasse 01A, die von Prof. Dr. R. Meyer zusätzlich eingeführt wurde [57].

Diese modifizierte Form der Rejektionsdiagnostik des DHZB nach Prof. Dr. R. Meyer ist die Betrachtung der Endothelzellen, der Wanddicke und des Quilty-Phänomens zusätzlich zu der Beurteilung des Rejektionsgeschehens nach der ISHLT-Klassifikation.

Außerhalb der ISHLT-Klassifikation werden in dieser Arbeit für die Auswertung zwei weitere Codes genutzt. Der Code 7 ist für die Gruppe der Nullbiopsien reserviert. Mit Code 9 wurden nicht auswertbare Datensätze klassifiziert.

Am Ende verteilen sich die 2785 Ausgangsbiopsien auf drei Gruppen:

1. Code 7: 42 Nullbiopsien von 42 Patienten dienen als Ausgangswerte, um das Ausmaß der Veränderungen in Bezug setzen zu können, von denen jedoch 10 (Kodierung „999999“) verworfen werden mussten; in einem Fall lagen keine Messwerte für eine Biopsie vor. So reduziert sich die Anzahl der Ausgangswerte auf die verbleibenden 31 Nullbiopsien. Es handelt sich in der Nullbiopsiegruppe um 21 Männer und 10 Frauen. Die Patienten waren zwischen 14 und 64 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt betrug 39 Jahre.
2. Code 9: 81 nicht auswertbare Biopsien von 72 Patienten,

3. Code 0 – 4: 2662 Biopsien von 838 Patienten, die nach der Skala der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) klassifiziert wurden. Von diesen Biopsien mussten 111 verworfen werden. Bei 53 Biopsien lagen keine Messwerte vor. Weitere 58 Biopsien wurden mit der Wertangabe „999999“ gekennzeichnet, da keine Messungen durchgeführt werden konnten.

Entweder stand nicht genügend Material für die Durchführung histomorphometrischer Untersuchungen zur Verfügung oder die myokardiale Zellstruktur war so stark verändert, dass kein innerer struktureller Zusammenhang zu erkennen war. Von ursprünglich 2662 Biopsien werden abzüglich dieser 111 Datensätze im Folgenden also 2551 näher betrachtet.

Die Grundgesamtheit von 2785 Biopsien von 855 herztransplantierten Patienten ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Gruppen aufgeführt. So kann die Biopsie eines Patienten einmal mit der Codierung 7 als Nullbiopsie bewertet sein und eine später gewonnene Biopsie bei demselben Patienten mit dem Code 0-4 nach der ISHLT-Klassifikation erfasst sein. Somit ergibt sich in der Gesamtsumme ein Wert von 952 Patienten, da ein Patient in mehreren Gruppen miterfasst ist.

4. Ergebnisse

4.1. Histomorphometrische Ergebnisse der Fibrosemessungen

Für die Gruppe „Nullbiopsien“ werden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Fibrosebildung dargestellt. Aus den in den Befundberichten der Biopsien vorliegenden Mittelwerten sind „Mittelwerte der Mittelwerte“ berechnet worden (N=31). Zusätzlich wurden aus den $12 \times 31 = 372$ Einzelmessdaten jeder Biopsie Mittelwerte neu berechnet (N=372).

Es wurden folgende Parameter erfasst:

Tab. 1a Fibrosemittelwerte der Nullbiopsiegruppe (aus Mittelwerten)

Statistiken					
	N		Mittelwert	Median	Standard- abweichung
	Gültig	Fehlend			
Fibrose_µm ²	31	0	7892,81	7188,00	3617,295
Fibrose%	31	0	9,84	9,00	4,495
Fibrose pur µm ²	31	0	4833,97	4420,00	1760,558
Fibrose pur %	31	0	5,81	5,00	2,257

Tab. 1b Fibrosemittelwerte der Nullbiopsiegruppe (aus Einzelmessdaten)

Statistiken					
	N		Mittelwert	Median	Standard- abweichung
	Gültig	Fehlend			
Fibrose µm ²	372	0	7912,18	6918,50	5157,581
Fibrose %	372	0	9,76	9,00	6,361
Fibrose pur µm ²	372	0	4846,04	4488,00	2377,716
Fibrose pur %	372	0	5,97	6,00	2,937

Während die Mittelwerte nahe beieinander liegen, ergeben sich bei den Standardabweichungen deutlichere Differenzen.

Differenziertere Darstellungen werden im Folgenden für die Biopsien vorgestellt, die den Patienten nach HTx entnommen wurden. Im Gesamtbild (Abb. 10) zeigt sich, dass die Messwerte der Fibrosemittelwerte nicht normalverteilt sind:

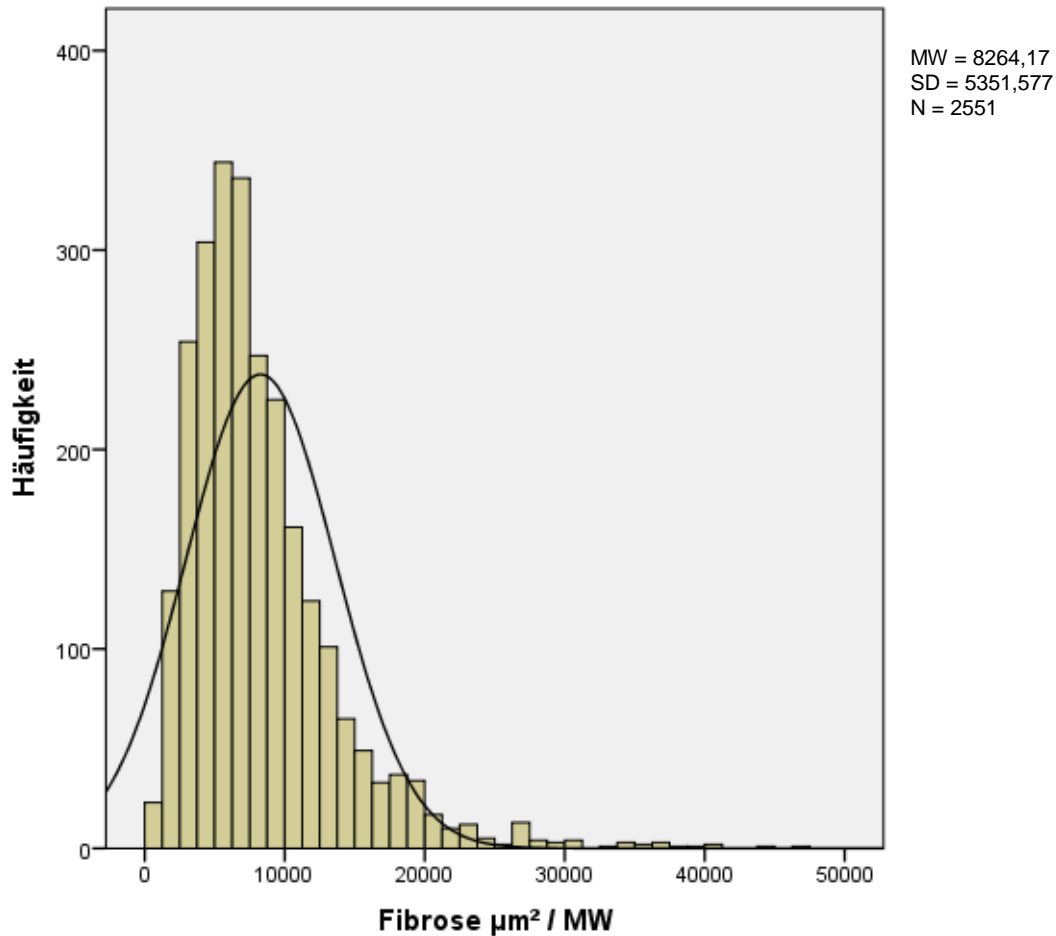


Abb. 10 Histogramm und Normalverteilung der Fibrosemittelwerte (Gesamtbiopsien: N=2551)

Der Mittelwert liegt mit $8264,17\mu\text{m}^2$ über dem Median von $7054,00\mu\text{m}^2$; der häufigste Wert wird als Modus mit $5122\mu\text{m}^2$ festgestellt. Im Histogramm der Abb. 10 liegt in dem Bereich zwischen 2000 und $8000\mu\text{m}^2$, also unterhalb des Mittelwertes, die stärkste Häufung der Messergebnisse. Die Verteilung der Fibrosemittelwerte ist linkssteil bei einer Kurtosis von $6,717$ und rechtsschief ($1,998$), weil die Fibrosemittelwerte bei den hohen Werten stärker streuen als bei niedrigen Werten. Die tatsächliche Verteilung ist also nicht symmetrisch. Die hohen Werte bei einigen wenigen Fällen haben große Auswirkungen auf den Mittelwert, aber nur eine geringere auf den Median. Deshalb ist der Median der bessere Indikator für die zentrale Tendenz.

Tab. 2 Deskriptive Statistik der Fibrosemittelwerte (Gesamtbiospien: N=2551)

Fibrose_µm²MW		
N	Gültig	2551
	Fehlend	0
	Mittelwert	8264,17
	Standardfehler des Mittelwertes	105,956
	Median	7054,00
	Modus	5122
	Standardabweichung	5351,577
	Varianz	2,864E7
	Schiefe	1,998
	Standardfehler der Schiefe	,048
	Kurtosis	6,717
	Standardfehler der Kurtosis	,097
	Spannweite	47144
	Minimum	221
	Maximum	47365

Zwei Tests, der Kolmogorov-Smirnov- und der Shapiro-Wilk-Test, die PASW anbietet, bestätigen die Vermutung, dass es bei den Werten für die Fibrosemittelwerte sich nicht um eine Normalverteilung handelt.

Tab. 3 Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Fibrose µm²	,110	2551	,000	,852	2551	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Abbildung 11 zeigt die zeitliche Entwicklung von Median und Mittelwert einschließlich der Standardabweichungen der Gesamtfläche der Fibrosemenge (μm^2) im postoperativen Beobachtungszeitraum. N gibt die Anzahl der Biopsien an, deren Messwerte in den einzelnen Erhebungsintervallen verwendet werden. Innerhalb der ersten fünf Monate nach HTx kommt es zu einem Anstieg der Fibrosemittelwerte von $7.913,86\mu\text{m}^2$ auf den Maximalwert von

11.548,56 μm^2 . Nach Erreichen des Maximalwertes nimmt die Gesamtfläche der Fibrosemenge im Mittel wieder ab und sinkt auf 7.997,51 μm^2 im fünften Jahr nach HTx ab.

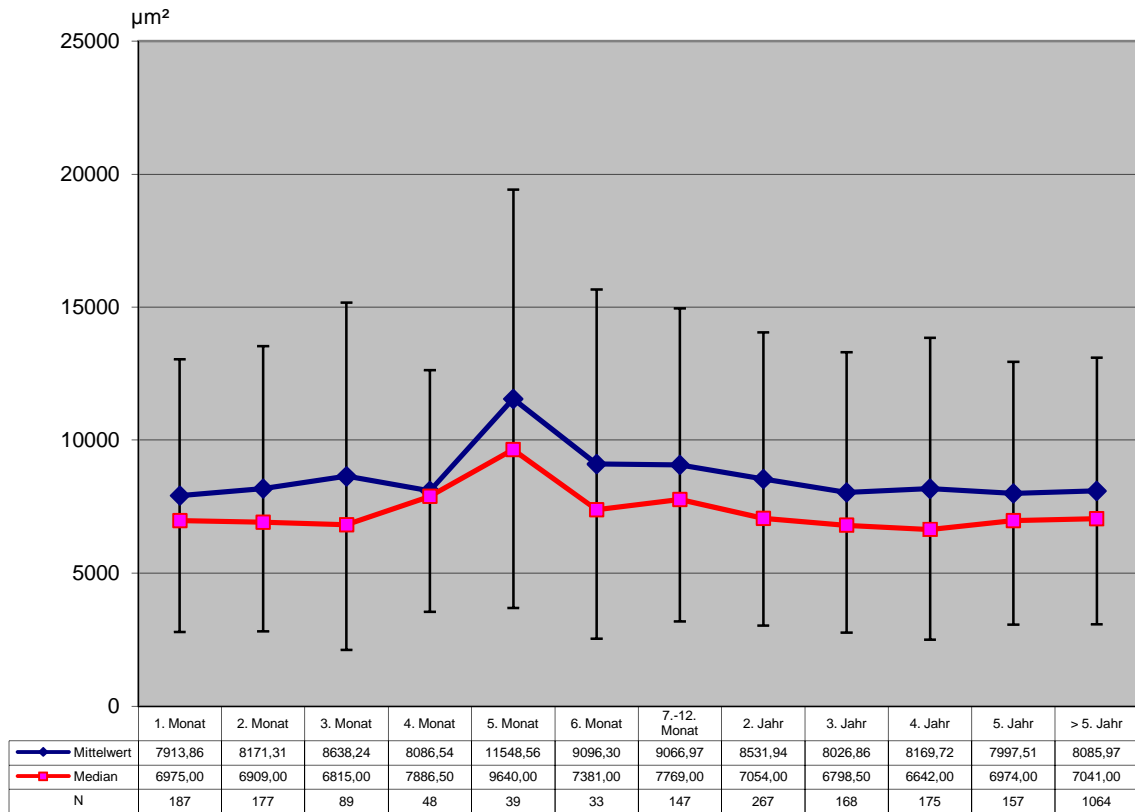


Abb. 11 Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose nach HTx in μm^2 (Gesamtbiopsien: N=2551)

Für die Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Fibroseentwicklung und dem Alter der Patienten bei Biopsieentnahme wurden Alterskohorten gebildet. Tabelle 4 zeigt die Anzahl der entnommenen Biopsien pro Zeitpunkt nach HTx für die einzelnen Kohorten. In der Altersgruppe der bis-9 Jahre alten Patienten sind mit 147 Biopsien die wenigsten Biopsien entnommen worden. Für alle Alterskohorten gilt, dass in dem Erhebungsintervall vom 4. – 6. Monat nach HTx die geringsten Fallzahlen auftreten. Die häufigsten Biopsien werden 5 Jahre nach HTx entnommen. Der Maximalwert von 791 Biopsien fällt in die Gruppe der 50-59 Jahre alten Patienten.

Tab. 4 Biopsien pro Alterskohorte und Zeitpunkt nach HTx

Alter	Erhebungsintervall												Gesamtbiopsien
	1. Monat	2. Monat	3. Monat	4. Monat	5. Monat	6. Monat	7.-12. Monat	2. Jahr	3. Jahr	4. Jahr	5. Jahr	> 5. Jahr	
≤ 9 Jahre	6	7	1	3			7	15	6	8	11	83	147
10 - 19 Jahre	3	8	3	1		1	8	26	22	25	18	88	203
20 - 29 Jahre	11	15	4	4	3	3	11	13	11	13	8	107	203
30 - 39 Jahre	25	23	5	9	4	4	17	28	17	21	16	142	311
40 - 49 Jahre	45	37	21	8	7	6	38	56	30	48	38	236	570
50 - 59 Jahre	65	62	41	19	16	15	49	89	54	42	47	292	791
≥ 60 Jahre	32	25	14	4	9	4	17	40	28	18	19	116	326
	187	177	89	48	39	33	147	267	168	175	157	1064	2551

Abbildung 12 stellt die in den Biopsien gemessenen Mittelwerte der Fibrose in μm^2 unterteilt nach Altersgruppen grafisch in einem Boxplot dar. Der Boxplot besteht aus der Box, die vom 25. und vom 75. Perzentil begrenzt wird und deren innere Linie den Median markiert. Die Höhe der Box entspricht dem Interquartilsabstand, der Differenz zwischen dem oberen und unteren Quartil und erfasst folglich 50 % der Verteilung. Die „Whisker“, die Linien außerhalb der Box sind auf maximal das 1,5fache der Interquartilsabstände begrenzt und enden bei dem Wert, der noch innerhalb dieser Grenzen liegt. Werte außerhalb dieser Grenze werden als „milde“ Ausreißer mit dem Symbol \circ und Extremwerte, die den dreifachen Interquartilsabstand überschreiten, mit * verzeichnet. Die in Abb. 13 dargestellten Extremwerte und Ausreißer geben einen weiteren möglichen Hinweis darauf, dass die erhobenen Messergebnisse nicht normalverteilt sind. Geordnet nach Alterskohorten liegen 75% der Biopsiemittelwerte unterhalb oder an der Schwelle von $10.000\mu\text{m}^2$. Eine differenziertere Darstellung der einzelnen Messergebnisse geordnet nach Alterskohorten wird auf den folgenden Seiten beschrieben.

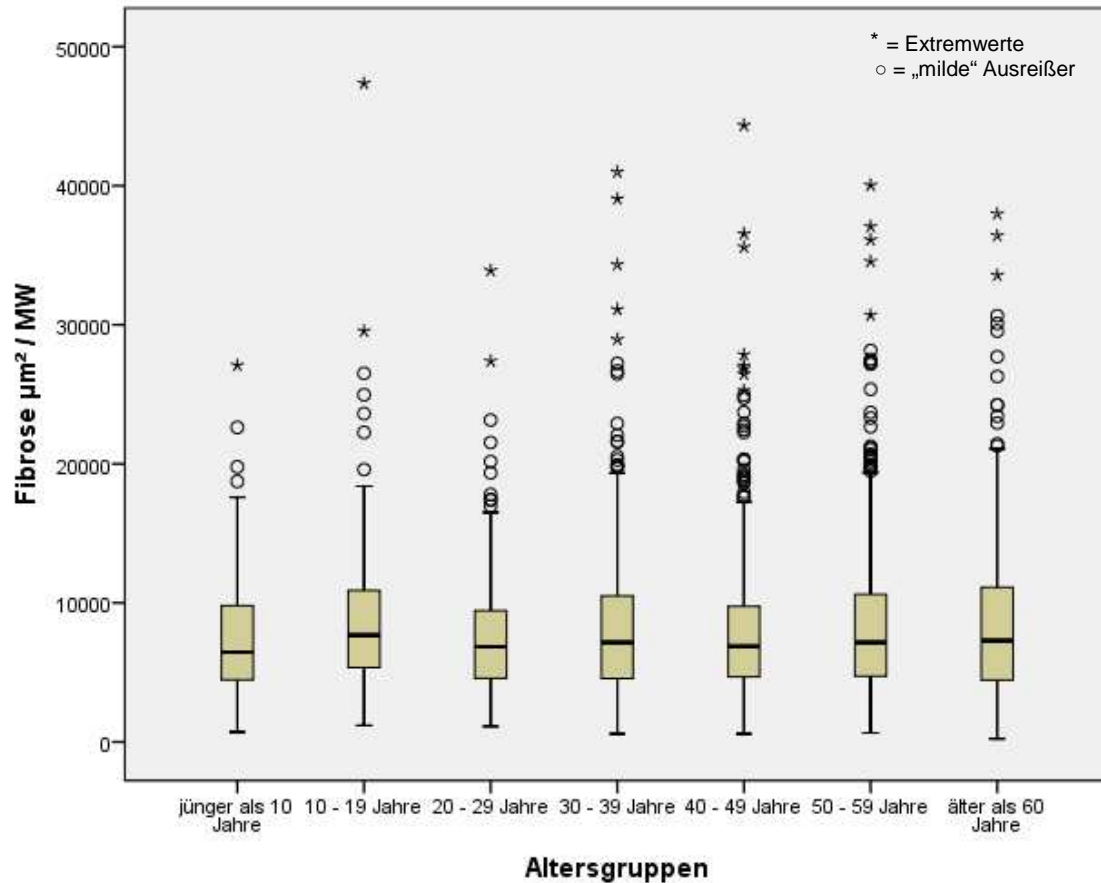


Abb. 12 Fibrosemittelwerte nach Alterskohorten

In Abbildung 13 sind die Mittelwerte der Fibrose nach Zeitpunkten nach HTx für die einzelnen Alterskohorten dargestellt. Die Ausgangsmittelwerte der Kohorten liegen zwischen $3788,33\mu\text{m}^2$ in der Alterskohorte ≤ 9 Jahre ($N=6$) und $8.812,66\mu\text{m}^2$ in der Gruppe ≥ 60 Jahre ($N=32$). In den folgenden fünf Monaten kommt es nahezu in allen Gruppen zu einem Anstieg der Fibrosemenge. Die Maximalwerte liegen bei $15.850,11\mu\text{m}^2$ in der Alterskohorte ≥ 60 Jahre ($N=9$) im fünften Monat nach HTx und bei $14.618,25\mu\text{m}^2$ in der Altersgruppe der 30-39 jährigen ($N=4$) sechs Monate nach HTx. Im weiteren Verlauf sinken die Fibrosemittelwerte ab.

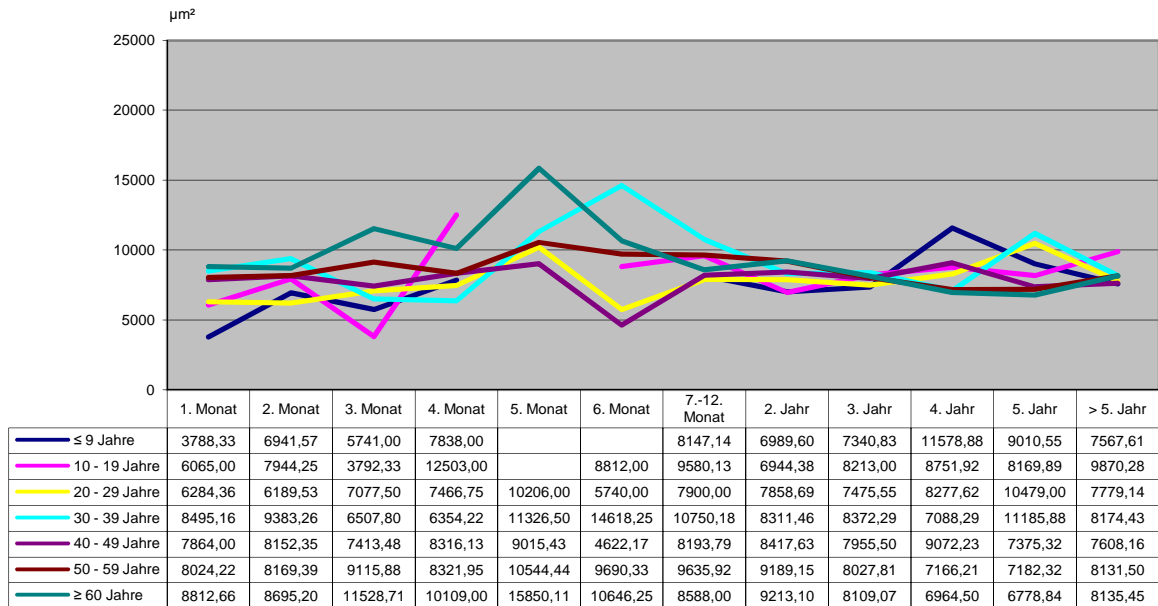


Abb. 13 Biopsie – Mittelwerte der Fibrose nach HTx in μm^2 (Alterskohorte: N= 2551)

Auch differenziert nach Geschlecht zeigt die Abbildung 14, dass 75% der in den Biopsien gemessenen Mittelwerte der Fibrose unterhalb der Schwelle von 10.000 μm^2 liegen. Auffällig sind die stärkeren Extremwerte bei Männern. Die zugrunde liegenden Fallzahlen sind 514 Biopsien bei den Frauen und 2037 bei den Männern, also etwa viermal so viele.

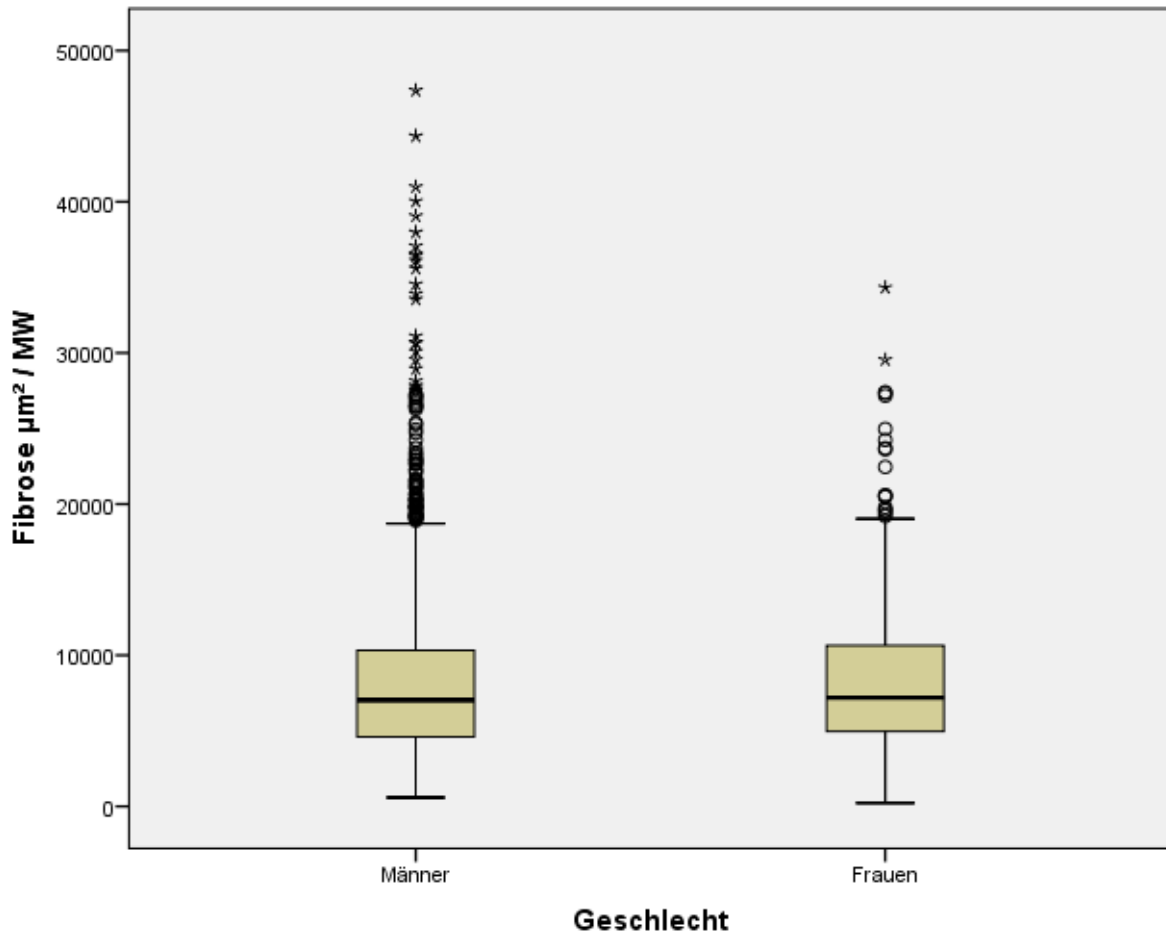


Abb. 14 Fibrosemittelwerte und Geschlecht

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen Median und Mittelwerte einschließlich der Standardabweichungen der Gesamtfläche der Fibrosemenge (μm^2) in den einzelnen Erhebungsintervallen. Diese sind unterschieden nach dem Geschlecht der Patienten. Die Ausgangsmittelwerte der beiden Gruppen liegen bei $7.919,76\mu\text{m}^2$ bei den Frauen und bei $7.912,54\mu\text{m}^2$ bei den Männern, also eng beieinander.

In den ersten fünf Monaten nach HTx zeigt die Gesamtfläche des Mittelwertes der Fibrosemenge bei Männern und Frauen einen Verlauf gleicher Tendenz. In beiden Gruppen kommt es zu einem Anstieg des Mittelwertes der Fibrosemenge. Während bei den Frauen der Höchstwert bei $10.738,60\mu\text{m}^2$ im fünften Monat nach HTx liegt, liegt er bei den Männern mit $11.667,68\mu\text{m}^2$ um fast $1000\mu\text{m}^2$ höher. Im weiteren Verlauf sinkt die Fibrosemenge bei beiden Geschlechtern auf Werte um die $8.000\mu\text{m}^2$ ab. Jedoch gestaltet sich bei den Männern der Rückgang der Fibrosemittelwerte kontinuierlicher als bei den Frauen. Die Biopsien der Frauen zeigen zunächst im sechsten Monat nach HTx einen deutlichen Rückgang des Mittelwertes um fast die Hälfte von $10.738,60\mu\text{m}^2$ im fünften Monat nach HTx auf $5.588\mu\text{m}^2$. Im folgenden

Erhebungsintervall erfolgt ein erneuter Anstieg auf $9.205,44\mu\text{m}^2$, um im Folgenden postoperativen Verlauf zwischen Werten von $7.296,39\mu\text{m}^2$ und $8.725,08\mu\text{m}^2$ zu schwanken.

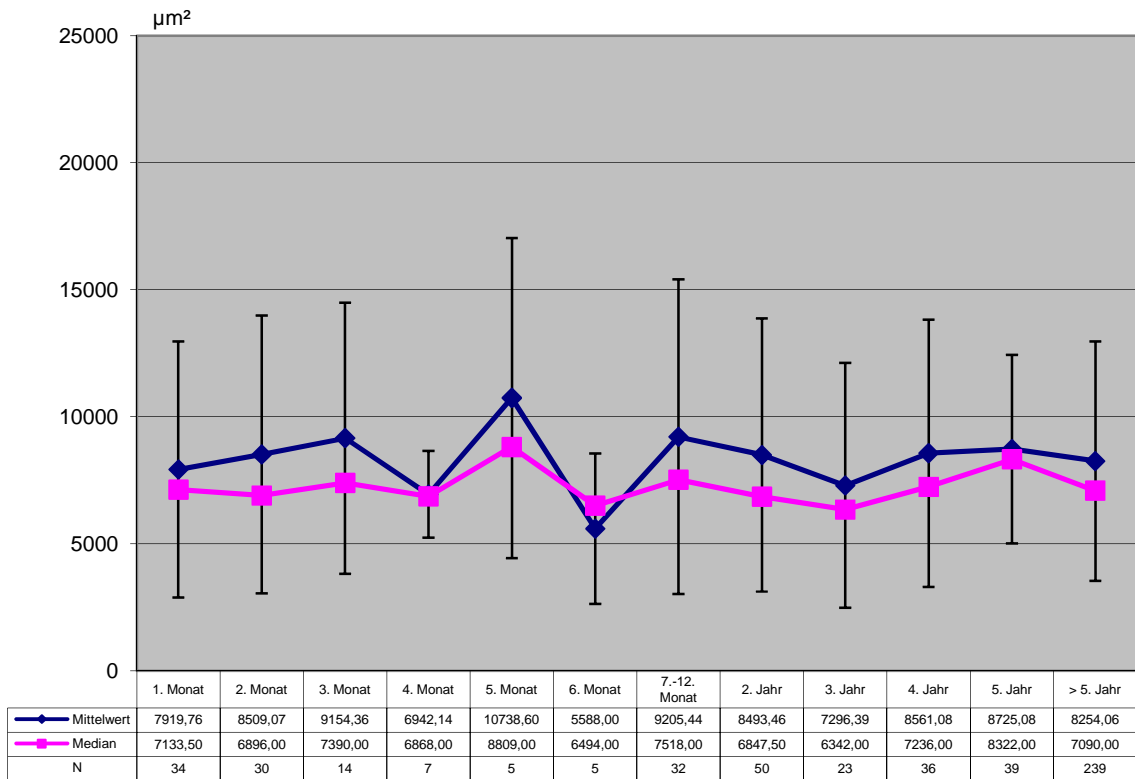


Abb. 15 Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose nach HTx in μm^2 (Frauen: N = 514)

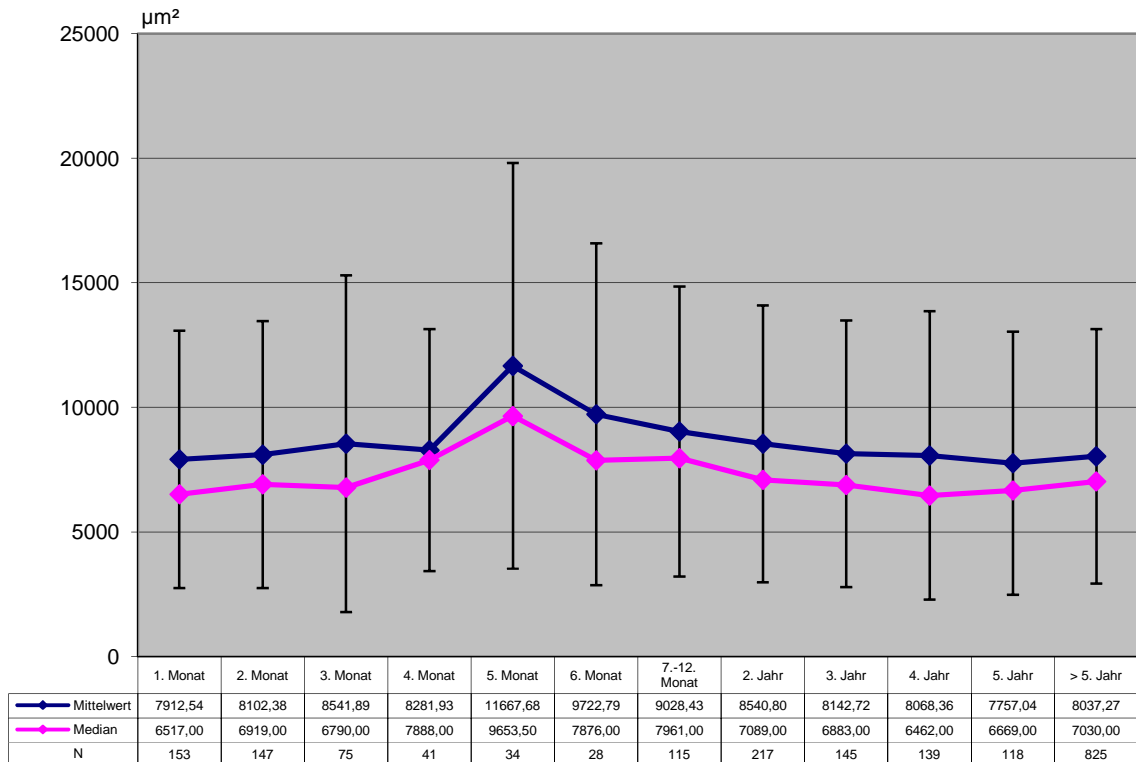


Abb. 16 Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose nach HTx in μm^2 (Männer: N= 2037)

Um Abhängigkeiten zwischen der Fibroseentwicklung und den akuten zellulären Rejektionsepisoden zu prüfen, werden alle erhobenen Messwerte der Endomyokardbiopsien nach den Kriterien der ISHLT klassifiziert.

In der vorliegenden Arbeit werden die ISHLT Gruppen von 0 mit „keiner“ Abstoßung bis einschließlich 1B mit „milder“ akuter zellulärer Abstoßungsreaktion gemeinsam als rejektionsnegative Gruppe zusammengefasst. Hingegen werden die ISHLT Gruppen von 2 mit „moderater“ bis einschließlich 4 mit „schwerer“ akuter zellulärer Abstoßungsreaktion als rejektionspositive Gruppe betrachtet.

In Abbildung 17 ist die Verteilung der Biopsien nach Rejektionsgeschehen in Boxplots dargestellt. Die rejektionspositive Gruppe mit einem Mittelwert von $9.339,7\mu\text{m}^2$ (Median: $8.067\mu\text{m}^2$) beruht auf 135 Biopsien, gegenüber 2416 der rejektionsnegativen Gruppe mit einem Mittelwert von $8.204,1\mu\text{m}^2$ (Median: $7026\mu\text{m}^2$).

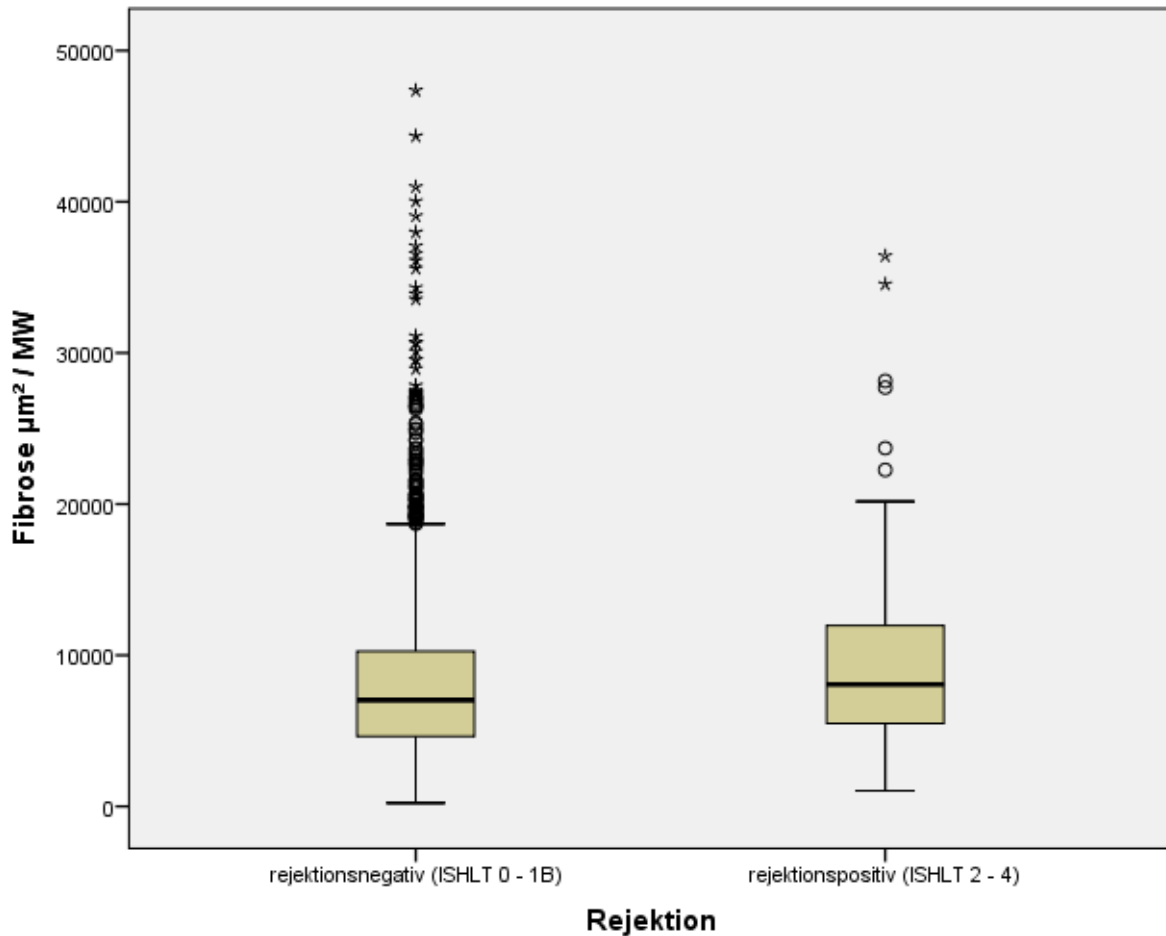


Abb. 17 Fibrosemittelwerte und Rejektion

Betrachtet man nun die Fibrosemittelwerte in den einzelnen Beobachtungszeiträumen der beiden Gruppen (Abb. 18 und 19), so zeigt sich in den ersten drei Monaten ein ähnlicher Verlauf. Es kommt sowohl in der rejectionsnegativen (Abb. 18) als auch in der rejectionspositiven (Abb. 19) Gruppe zu einem Anstieg der Fibrosemesswerte. Die Werte der rejectionspositiven Gruppe liegen im ersten Monat nach HTx bereits deutlich über dem Ausgangswert der anderen Gruppe, weiterhin steigen die Fibrosemittelwerte im dritten und vierten Monat nach HTx deutlicher an. Es fallen die extremen Standardabweichungen der Messwerte besonders im dritten bis fünften Monat nach HTx bei der Gruppe der rejectionspositiven Biopsien auf. Der maximale Mittelwert von $14.085 \mu\text{m}^2$ in der rejectionspositiven Gruppe im vierten Monat wird zu keinem Zeitpunkt von der rejectionsnegativen Gruppe erreicht. Ihr Maximalwert liegt bei $11.676,85 \mu\text{m}^2$ im fünften Monat nach HTx. Im Verlauf nach dem fünften Monat nach HTx kommt es in der rejectionsnegativen Gruppe zu einem Rückgang der Fibrosemittelwerte auf Werte um die $8.000 \mu\text{m}^2$. In der rejectionspositiven Gruppe zeigt sich im 7.-12. Monat nach HTx zunächst ein Rückgang der Fibrosemittelwerte auf $6.101,75 \mu\text{m}^2$; dieser Messwert liegt unterhalb des

Ausgangswertes. In den folgenden zwei Jahren kommt es zu einem erneuten Anstieg der Fibrosemittelwerte auf $9.557,10\mu\text{m}^2$ im dritten Jahr nach HTx. Im vierten Jahr nach HTx fällt der Messwert auf $6.900,00\mu\text{m}^2$ ab, um in den folgenden Beobachtungszeiträumen erneut anzusteigen.

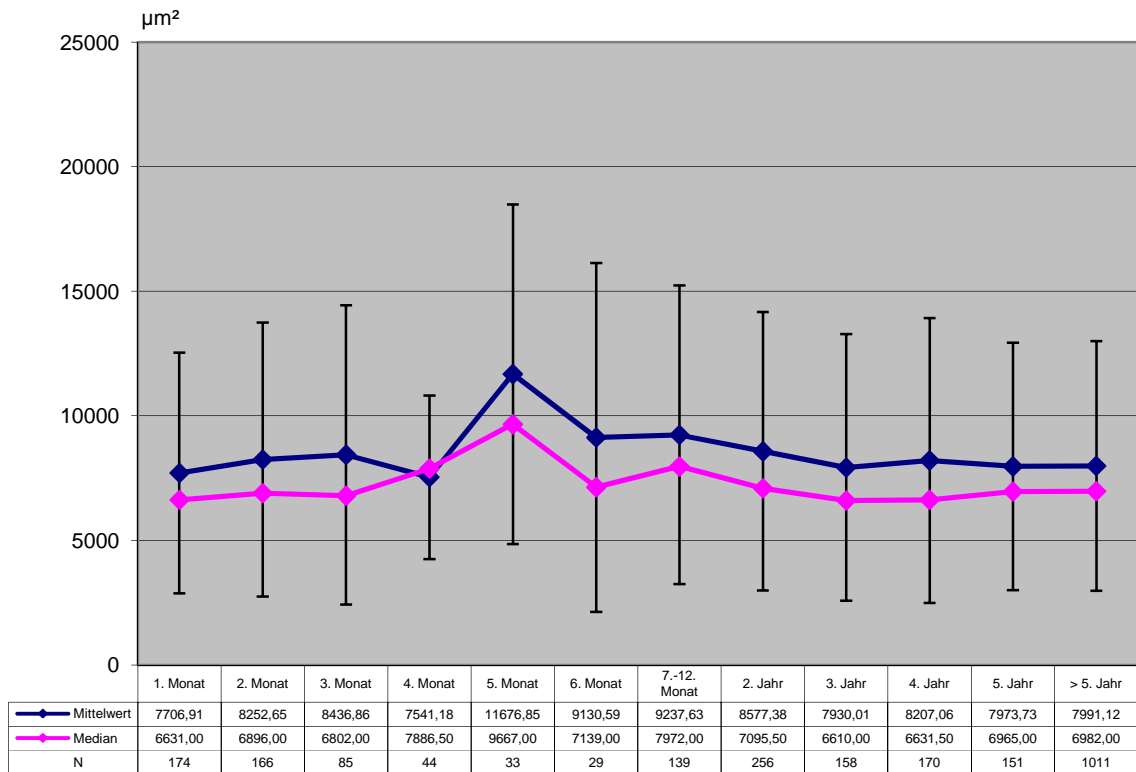


Abb. 18 Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose nach HTx in μm^2 (Rejektion negativ: ISHLT 0-1B: N = 2416)

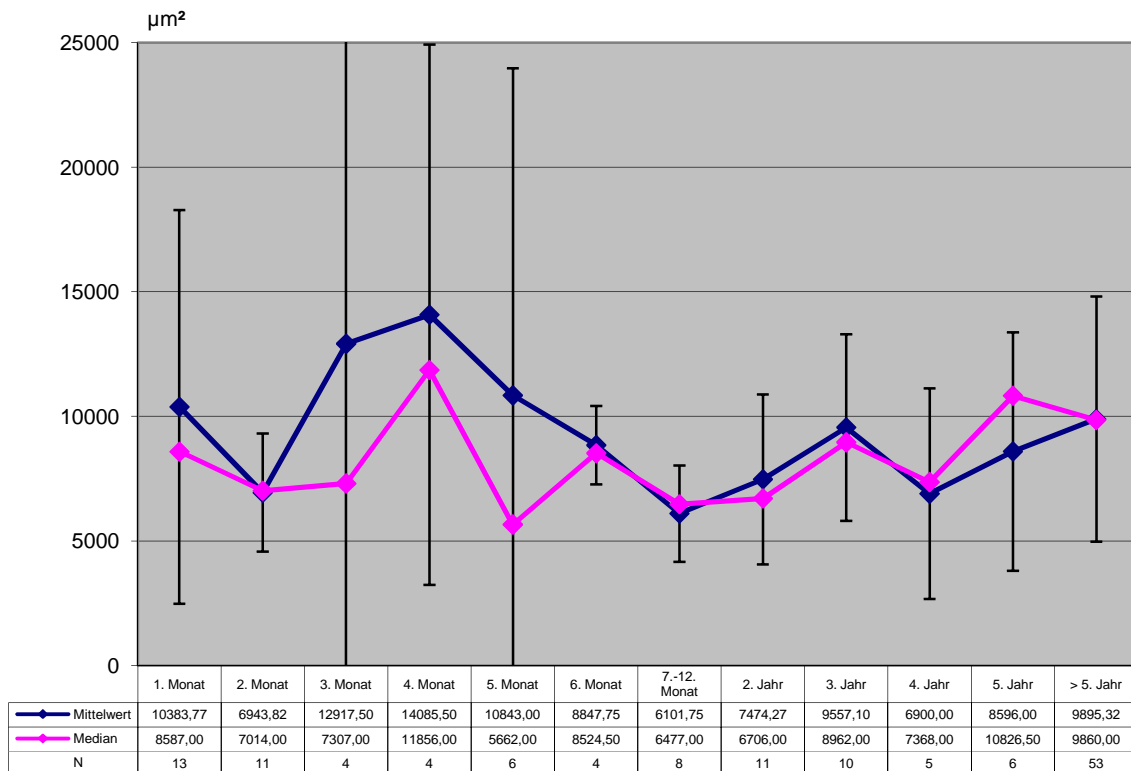


Abb. 19 Mittelwerte, Standardabweichungen und Median der Fibrose nach HTx in μm^2 (Rejektion positiv: ISHLT 2 - 4: N = 135)

Abbildung 20 stellt im zeitlichen Verlauf die Fibrosemittelwerte in μm^2 der Biopsien der in einem gemeinsamen Gesamtvergleich der Geschlechter- und Rejektionsgruppen dar. Die Abbildung zeigt die bereits in Abbildung 11 beschriebene allgemeine Tendenz der Fibroseentwicklung, die jedoch Abweichungen bei der Gruppe der rejektionspositiven und bei den Frauen enthält. Auffällig sind die Biopsien der rejektionspositiven Gruppe im ersten Monat nach HTx mit einem bereits deutlich über den anderen Gruppen liegenden Ausgangswert. Weiterhin steigen die Fibrosemittelwerte im dritten und vierten Monat nach HTx deutlicher an als in den andern Gruppen. In der Gruppe der Frauen fällt auf, dass es im sechsten Monat nach HTx zu einem stärkeren Sinken der Fibrosemenge kommt. Im weiteren zeitlichen Verlauf nähern sich die Fibrosemittelwerte der Geschlechter- und Rejektionsgruppen einander wieder an.

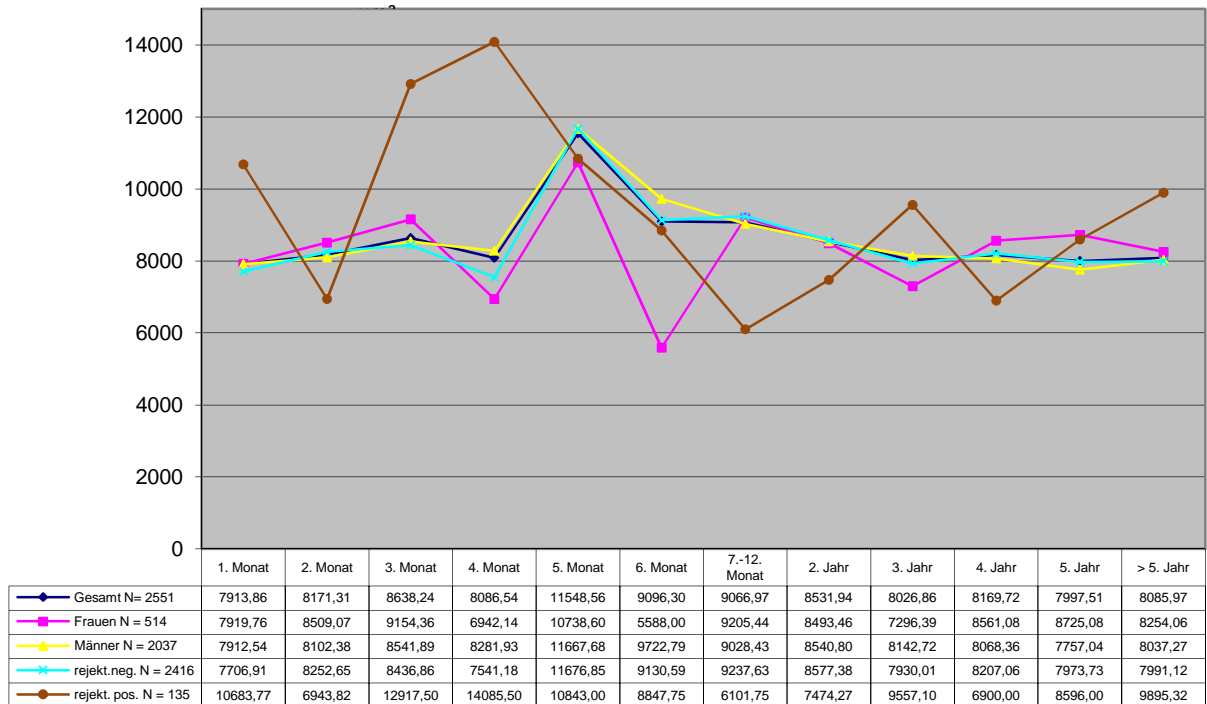


Abb. 20 Vergleich der Mittelwerte: Fibrose nach HTx in μm^2

In einer Korrelationsanalyse (vgl. Tabelle 5) wird versucht, Abhängigkeiten der histomorphometrischen Fibrosemessungen vom Alter der Patienten zum Zeitpunkt der HTx sowie vom Zeitpunkt der Biopsie nach HTx festzustellen. Ein errechneter Wert von 0 indiziert keinen, ein Wert von 1 einen starken Zusammenhang der Werte. Tabelle 5 a prüft die Abhängigkeit der statistischen Mittelwerte der Fibrose vom Alter der Patienten bei HTx.

Tab. 5 a Korrelationen der Fibrosemittelwerte mit dem Alter bei HTx

		Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Alter bei HTx
Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Korrelation nach Pearson	1	,026
	Signifikanz (1-seitig)		,099
	N	2551	2551
Alter bei HTx	Korrelation nach Pearson	,026	1
	Signifikanz (1-seitig)	,099	
	N	2551	2551

			Fibrose μm^2 / MW	Alter bei HTx
Kendall-Tau-b	Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Korrelationskoeffizient	1,000	,014
		Signifikanz (1-seitig)	.	,148
		N	2551	2551
	Alter bei HTx	Korrelationskoeffizient	,014	1,000
		Signifikanz (1-seitig)	,148	.
		N	2551	2551
Spearman-Rho	Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Korrelationskoeffizient	1,000	,020
		Signifikanz (1-seitig)	.	,151
		N	2551	2551
	Alter bei HTx	Korrelationskoeffizient	,020	1,000
		Signifikanz (1-seitig)	,151	.
		N	2551	2551

Die Korrelation nach Pearson prüft lineare Beziehungen zwischen den Variablen. Danach besteht zwar ein leicht positiver (+ 0,026), jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fibrosemenge und dem Alter der Patienten. Auch die Korrelationskoeffizienten Kendalls Tau (+ 0,014) und Spearmans Rho (+ 0,020) verwerfen die Hypothese eines positiven Zusammenhangs der Variablen, beide Ergebnisse sind nicht signifikant. Tabelle 5 b prüft die Abhängigkeit der statistischen Mittelwerte der Fibrose vom Zeitpunkt der Biopsie nach HTx.

Tab. 5 b Korrelationen der Fibrosemittelwerte mit dem Zeitpunkt der Biopsie

		Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Biopsie nach HTx in Tagen
Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Korrelation nach Pearson	1	-,062**
	Signifikanz (1-seitig)		,001
	N	2551	2551
Biopsie nach HTx in Tagen	Korrelation nach Pearson	-,062**	1
	Signifikanz (1-seitig)	,001	
	N	2551	2551

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (1-seitig) signifikant.

		Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Biopsie nach HTx in Tagen
Kendall-Tau-b	Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Korrelationskoeffizient	1,000
		Signifikanz (1-seitig)	-,018
		N	,081
Biopsie nach HTx in Tagen		N	2551
		Korrelationskoeffizient	1,000
		Signifikanz (1-seitig)	-,018
Spearman-Rho	Fibrose μm^2 / Mittelwerte	Korrelationskoeffizient	1,000
		Signifikanz (1-seitig)	-,027
		N	,084
Biopsie nach HTx in Tagen		N	2551
		Korrelationskoeffizient	1,000
		Signifikanz (1-seitig)	-,027
	N	,084	2551

Die Korrelation nach Pearson errechnet einen leicht negativen (- 0,062) und auf dem Niveau von 0,01 signifikanten Zusammenhang zwischen der Fibrosemenge und dem Zeitpunkt der Biopsie. Sie stützte also eine Hypothese, nach der die Fibrosemenge umso geringer gemessen wird je später nach der HTx die Biopsie genommen wird. Allerdings wird von den Korrelationskoeffizienten Kendalls Tau (- 0,018) und Spearmans Rho (- 0,027) zwar ebenfalls ein leicht negativer Zusammenhang errechnet, der jedoch nicht signifikant ist.

Schließlich wird in einem Regressionsmodell (Tabelle 6) statistisch geprüft, ob die Ergebnisse der histomorphometrischen Fibrosemessungen durch die intervallskalierten Variablen

„Alter der Patienten zum Zeitpunkt der HTx“ („Alter bei HTx“) und „Zeitpunkt der Biopsie nach HTx (in Tagen)“ („Biopsie nach HTx“) oder die dichotomen Variablen „Geschlecht“ und „Abstoßungsreaktion“ („Rejektion“) beeinflusst werden. Das Modell liefert Informationen, ob und in welchem Ausmaß Veränderungen in den beobachteten Variablen die Entwicklung der Fibrosemittelwerte, der abhängigen Variablen, linear beeinflussen. R-Quadrat ist dabei die Maßzahl, mit der der Anteil angegeben wird, in dem Variationen in der abhängigen Variablen, den Fibrosemittelwerten, durch lineare Regression aus den Einflussvariablen erklärt werden können. Dabei wird statistisch die Variation der abhängigen Variablen zerlegt in die Variation, die durch das Modell erklärt wird, und diejenige der „Residuen“, die durch das Modell nicht erklärt wird. Weil R-Quadrat tendenziell größer wird, je größer die Zahl der unabhängigen Variablen ist, wird mit dem korrigierten R-Quadrat die Komplexität des Modells statistisch berücksichtigt. Im Ergebnis beschreiben R-Quadrat und das korrigierte R-Quadrat den erklärten Anteil der Veränderungen in den Fibrosemittelwerten durch die im statistischen Modell benannten Einflussvariablen Alter, Geschlecht, Abstoßungsreaktion und Zeitpunkt der Biopsie. Bei einem Wert von 0 besteht kein linearer Zusammenhang, bei einem Wert von 1 ein vollständiger linearer Zusammenhang.

Tab. 6 Regressionsmodell

Aufgenommene Variablen	Entfernte Variablen	Methode
Rejektion, Biopsie nach HTx in Tagen, Geschlecht, Alter bei HTx ^b		Einschluß

Modellzusammenfassung

R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat	Standardfehler des Schätzers	Änderungsstatistiken
				Sig. Änderung in F
,080 ^a	,006	,005	5338,717	,003

Der Wert von R-Quadrat liegt bei 0,006, der des korrigierten R-Quadrat bei 0,005. Veränderungen in der abhängigen Variablen Fibrosemittelwert können nicht linear aus Veränderungen der Einflussvariablen erklärt werden, denn mit Veränderungen der Einflussvariablen Alter, Geschlecht, Abstoßungsreaktion und Zeitpunkt der Biopsie lassen sich nicht einmal ein Prozent (0,5 %) der Veränderung der abhängigen Variablen Fibrosemittelwert erklären. Allerdings liefert der F-Test der Signifikanz („Sig. Änderung in F“) einen Wert von

0,003 und weist damit für das Regressionsmodell einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Einfluss- und der abhängigen Variablen aus ($p < 0,05$).

Tabelle 7 prüft für die einzelnen Einflussvariablen, ob deren Veränderungen eine lineare Veränderung in der abhängigen Variablen Fibrosemittelwert erklären können.

Tab. 7 Koeffizienten^a

Modell	Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
(Konstante)	8220,837	353,231		23,273	,000
Geschlecht	184,048	270,650	,014	,680	,497
1 Alter bei HTx	6,240	6,466	,020	,965	,335
Biopsie nach HTx in Tagen	-,183	,064	-,057	-2,845	,004
Rejektion	1096,438	473,614	,046	2,315	,021

a. Abhängige Variable: Fibrose μm^2 / Mittelwerte

Die T-Werte aller Variablen sind sehr klein, so dass die Hypothese, dass deren Koeffizienten gleich Null sind, nicht verworfen werden kann. Nur für die Variable „Biopsie nach HTx in Tagen“ stellt der T-Test der Koeffizienten auf einem Signifikanzniveau („Sig. = 0,004“) von $p < 0,05$ einen schwachen negativen linearen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Biopsie nach HTx und dem Fibrosemittelwert. Der Zusammenhang zeigt sich auch in einem Streudiagramm (Abb. 21), in dem die leicht fallende Regressionsgerade eingezeichnet ist. Die verbleibenden Differenzen zwischen den tatsächlich beobachteten und den durch die Regressionsgleichung geschätzten Werten der abhängigen Variablen sind durch die Kreise dargestellt. Die breite Streuung dieser Residuen aus dem Regressionsmodell ohne ausgeprägte Annäherung an die Regressionsgerade widerspricht einem linearen (negativen) Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Biopsieentnahme nach HTx und dem Fibrosemittelwert.

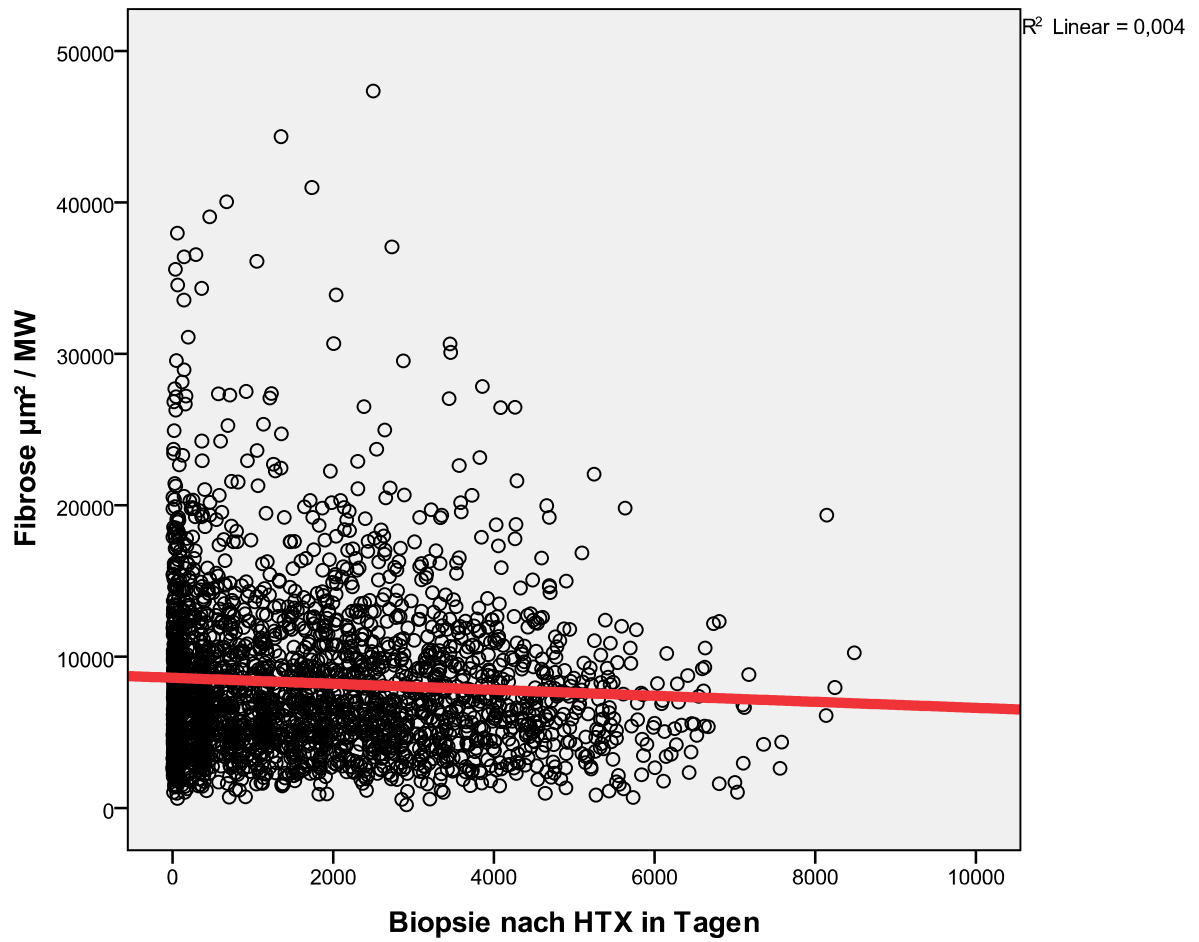


Abb. 21 Streudiagramm

4.2. Histomorphometrische Ergebnisse der Narbenmessungen

Die prozentualen Anteile des Narbengewebes am Gesamtgewebe der Biopsien sind für die Nullbiopsiegruppe wie folgt gemessen worden:

Tab. 8a Narbenmittelwerte der Nullbiopsiegruppe (aus Mittelwerten)

	N		Mittelwert	Median	Standard- abweichung
	Gültig	Fehlend			
Narbenanteil in %	31	0	4,0	3,0	3,3

Tab. 8b Narbenmittelwerte der Nullbiopsiegruppe (aus Einzelmessdaten)

	N		Mittelwert	Median	Standard- abweichung
	Gültig	Fehlend			
Narbenanteil in %	372	0	3,8	2,0	5,6

Der berechnete Anteil des Narbengewebes in Prozent an der Gesamtfläche der Biopsie für die im postoperativen Beobachtungsraum gewonnenen Biopsien ist in Abbildung 22 als Mittelwert und Median einschließlich der Standardabweichung dargestellt.

Der Medianwert des Narbengewebes an der Gesamtfibrose liegt während der gesamten Beobachtungsdauer bei 2 – 3 %. Der Ausgangsmittelwert liegt bei 2,428 % Narbengewebe im ersten Monat nach HTx. In den folgenden vier Monaten steigt der Wert. Das erste Halbjahr nach HTx ist durch eine relativ konstante Menge des Narbenanteils an der Gesamtfläche der Biopsie gekennzeichnet. Im 7.-12. Monat nach HTx erfolgt ein weiterer Anstieg des Narbenanteilmittelwerts auf den Maximalwert von 3,646%. Die folgenden Jahre lassen einen Rückgang des Narbengewebes erkennen.

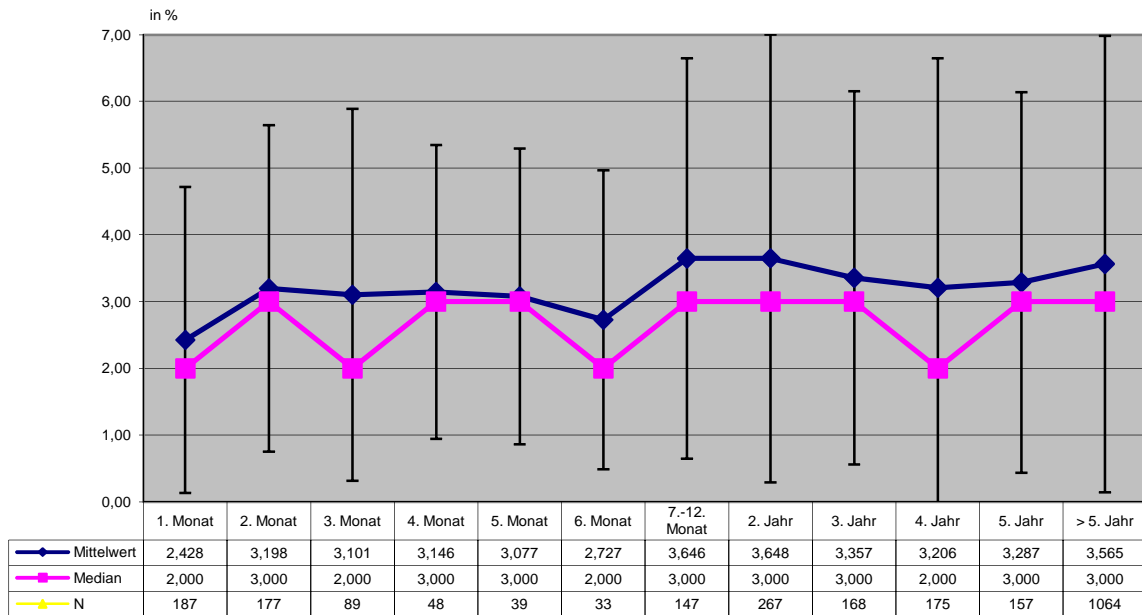
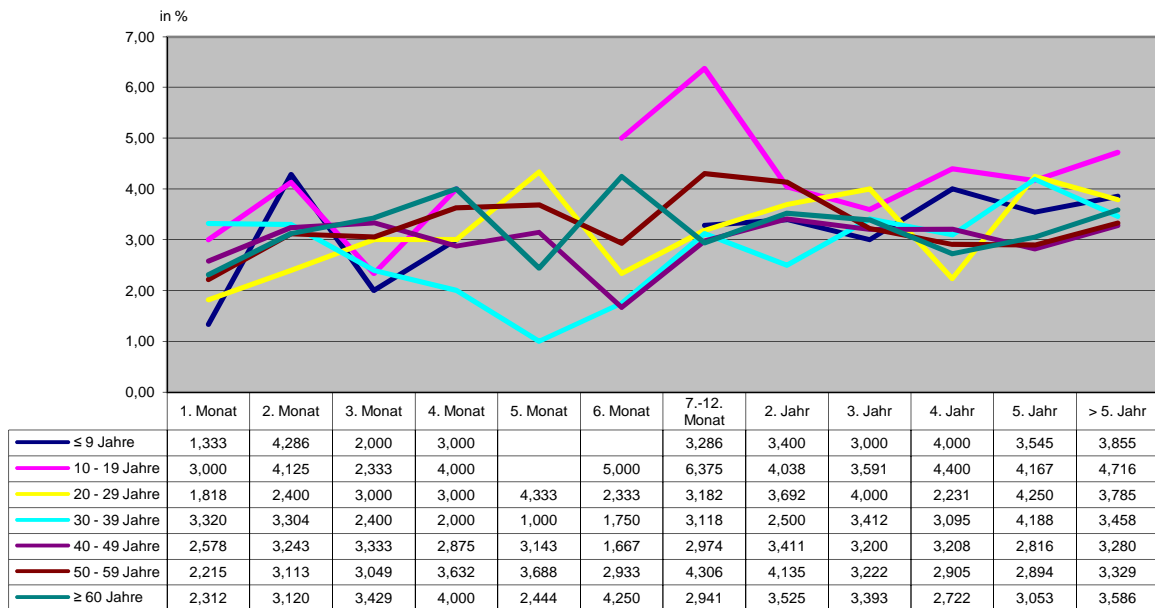


Abb. 22 Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsien in % (Mittelwerte und Median) (Gesamtbiopsien: N = 2551)

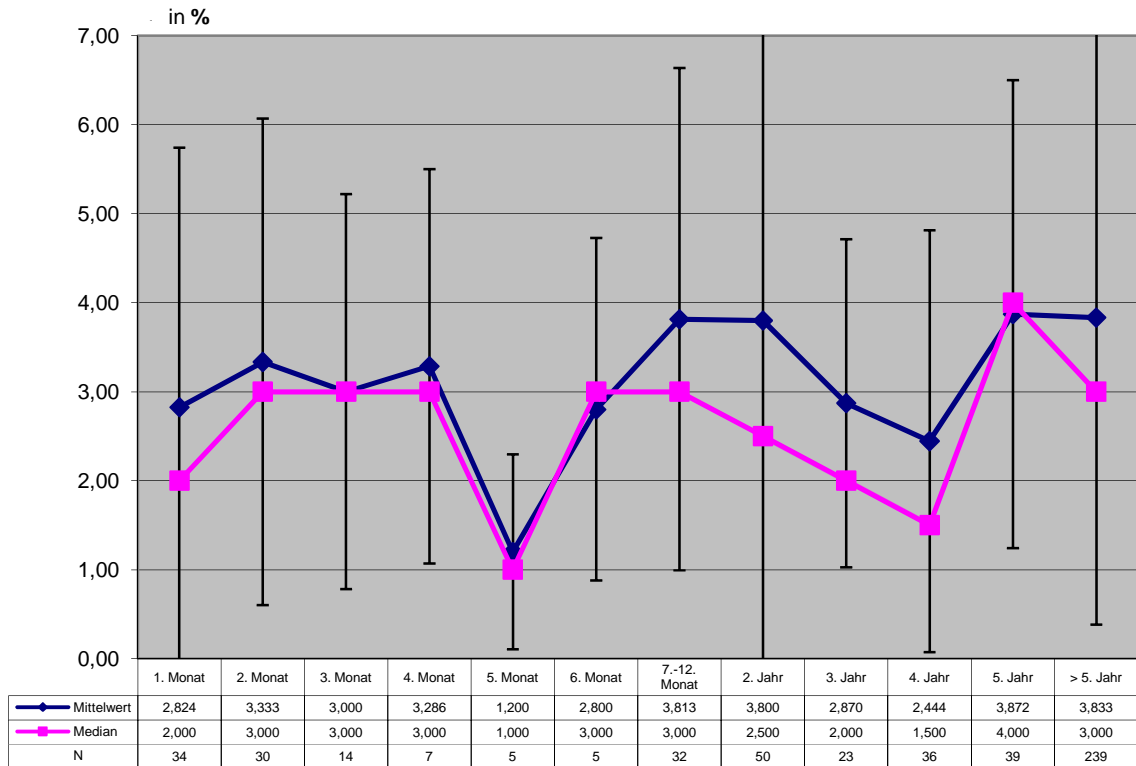
Um Abhängigkeiten zwischen der Narbenentwicklung und dem Alter der Patienten bei Biopsieentnahme zu untersuchen, wurden Alterskohorten gebildet (Abb. 23).

Die Ausgangsmittelwerte der Kohorten liegen zwischen 1,333% in der Alterskohorte ≤ 9 Jahre (N=6) und 3,320% in der Gruppe der 30-39 Jährigen (N=25). In den folgenden fünf Monaten kommt es in allen Gruppen - zum Teil unter Schwankungen - zu einem Anstieg der Narbenanteile, so dass nach einem halben Jahr die Ausgangswerte überschritten sind, mit Ausnahme der Kohorte der 30-39 Jährigen, wo die Werte unter den Ausgangswert einen Monat nach HTx absinken. Der Maximalwert aller Alterskohorten wird mit 6,375% in der Alterskohorte von 10-19 Jahren ebenfalls im 7.-12. Monat nach HTx erreicht. Im weiteren Verlauf sinken die Narbenmittelwerte ab.



**Abb. 23 Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsien in % (Mittelwerte)
(Alterskohorten: N= 2551)**

In den Abbildungen 24 und 25 sind die Anteile des Narbengewebes an der Gesamtfläche der Biopsie je Erhebungsintervall für Frauen und Männer aufgeführt. Die Ausgangsmittelwerte der beiden Gruppen liegen bei 2,824% bei den Frauen und bei 2,340% bei den Männern. Der prozentuale Anteil des Narbengewebes steigt in der Gruppe der Frauen in den ersten zwei Monaten auf 3,333% an. Bis zum Ende des 5. Monats nach HTx sinkt der prozentuale Anteil des Narbengewebes auf 1,200%. In den folgenden Monaten kommt es zu einem erneuten Anstieg auf den Maximalwert von 3,813% im 7.-12. Monat nach HTx. In der Gruppe der Männer zeigt sich in den ersten Monaten nach HTx ebenfalls ein Anstieg des prozentualen Anteils des Narbengewebes in der Biopsie. Das Maximum liegt bei den Männern im 2. Jahr nach HTx bei 3,613%. Dieser Wert liegt unter dem Maximalwert der Frauen. Im weiteren zeitlichen Verlauf ab dem 12. Monat nach HTx kommt es zu einer Abnahme des Narbengewebanteils.



**Abb. 24 Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsien in % (Mittelwerte und Median)
(Frauen: N = 514)**

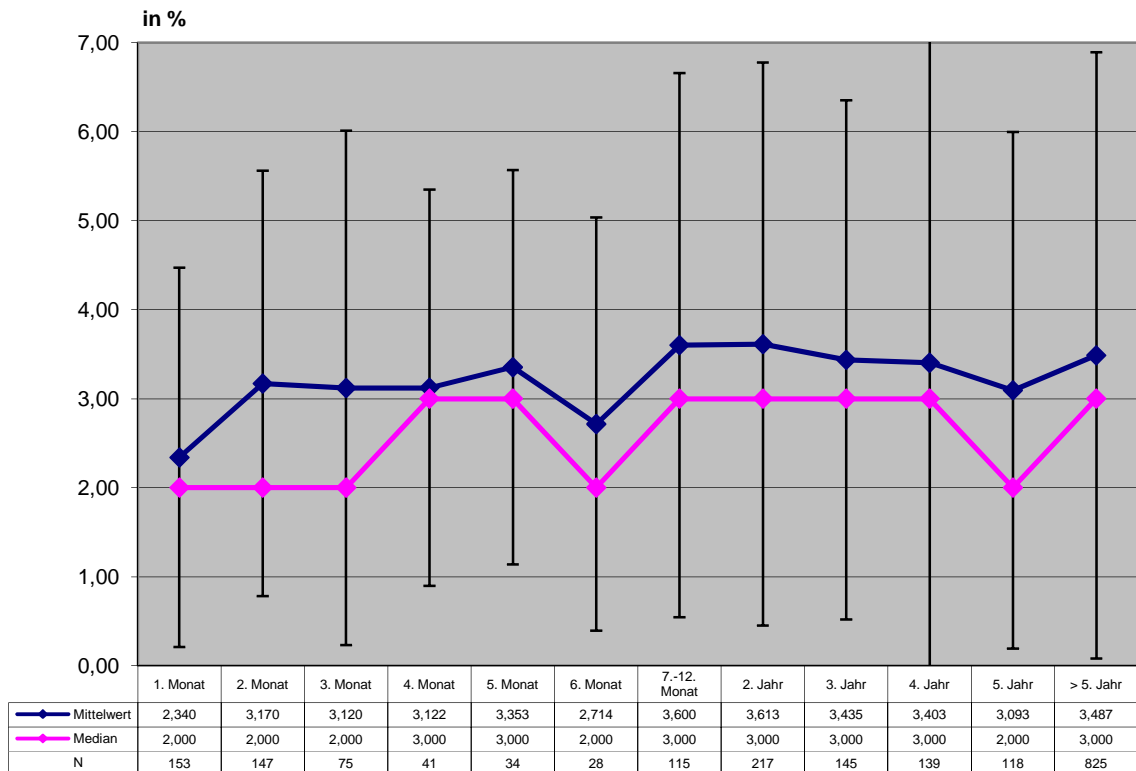
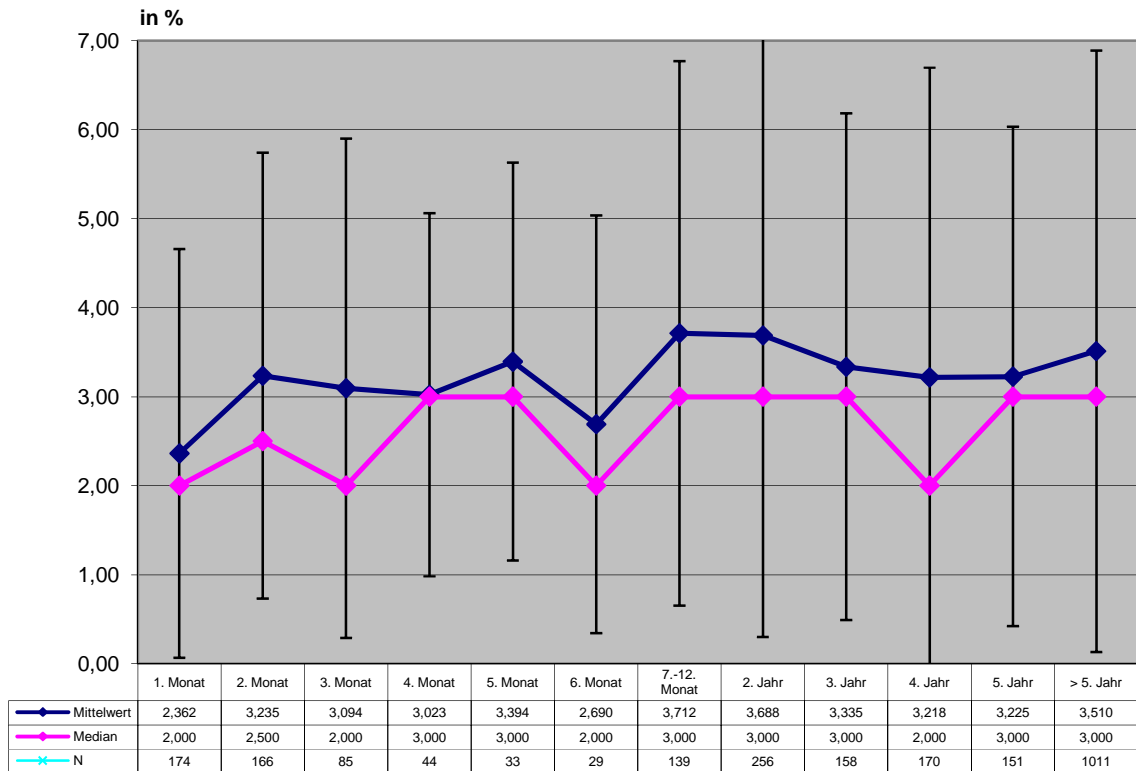


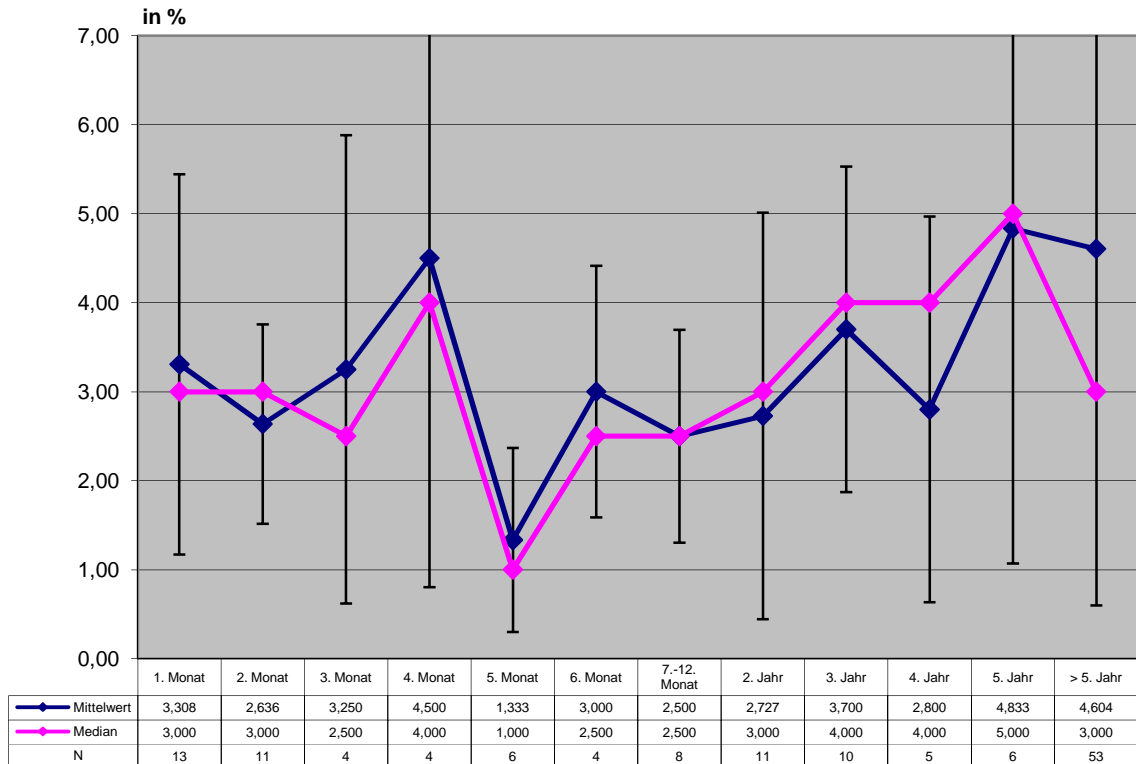
Abb. 25 Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsien in % (Mittelwerte und Median) (Männer: N = 2037)

Die Abbildungen 26 und 27 zeigen im zeitlichen Verlauf die Ergebnisse nach Abstoßungsreaktionen gegliedert. Der Prozentanteil des Narbengewebes in den Biopsien wird für die „rejektionsnegative“ Gruppe aufgeführt, die keine oder „milde“ Anzeichen einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion nach HTx zeigt (ISHLT 0-1B), und die „rejektionspositive“ Gruppe, die schwerere Anzeichen einer Abstoßungsreaktion (ISHLT 2-4) aufweist.

Betrachtet man die Messwerte in den ersten sechs Monaten nach HTx dieser beiden Gruppen, so zeigen beide einen Anstieg des prozentualen Anteils des Narbengewebes an der Gesamtfläche der Biopsie. Während die rejektionsnegative Gruppe den Maximalwert von 3,712% im 7.-12. Monat nach HTx erreicht, liegt das Maximum der rejektionspositiven Gruppe mit 4,500% im 4. Monat nach HTx. In der rejektionsnegativen Gruppe sinkt nach Erreichen des Maximums der prozentuale Anteil des Narbengewebes kontinuierlich. Demgegenüber kommt es in der rejektionspositiven Gruppe nur zu einer vorübergehenden Abnahme und in den folgenden Jahren zu einem erneuten Anstieg des Narbengewebanteils.



**Abb. 26 Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsien in % (Mittelwerte und Median)
(Rejektion negativ: ISHLT 0 – 1B: N = 2416)**



**Abb. 27 Narbenanteile am Gesamtgewebe der Biopsien in % (Mittelwerte und Median)
(Rejektion positiv: ISHLT 2 – 4: N = 135)**

Abbildung 28 zeigt einen Gesamtvergleich der Mittelwerte der Narbenanteile an den Biopsien im zeitlichen Verlauf nach HTx. Die rejektionspositive Gruppe verzeichnet im vierten Monat nach HTx einen erheblichen Anstieg des Narbenanteils. Im fünften Monat nach HTx sinken die Narbenanteile in der rejektionspositiven Gruppe und in der Gruppe der Frauen deutlich.

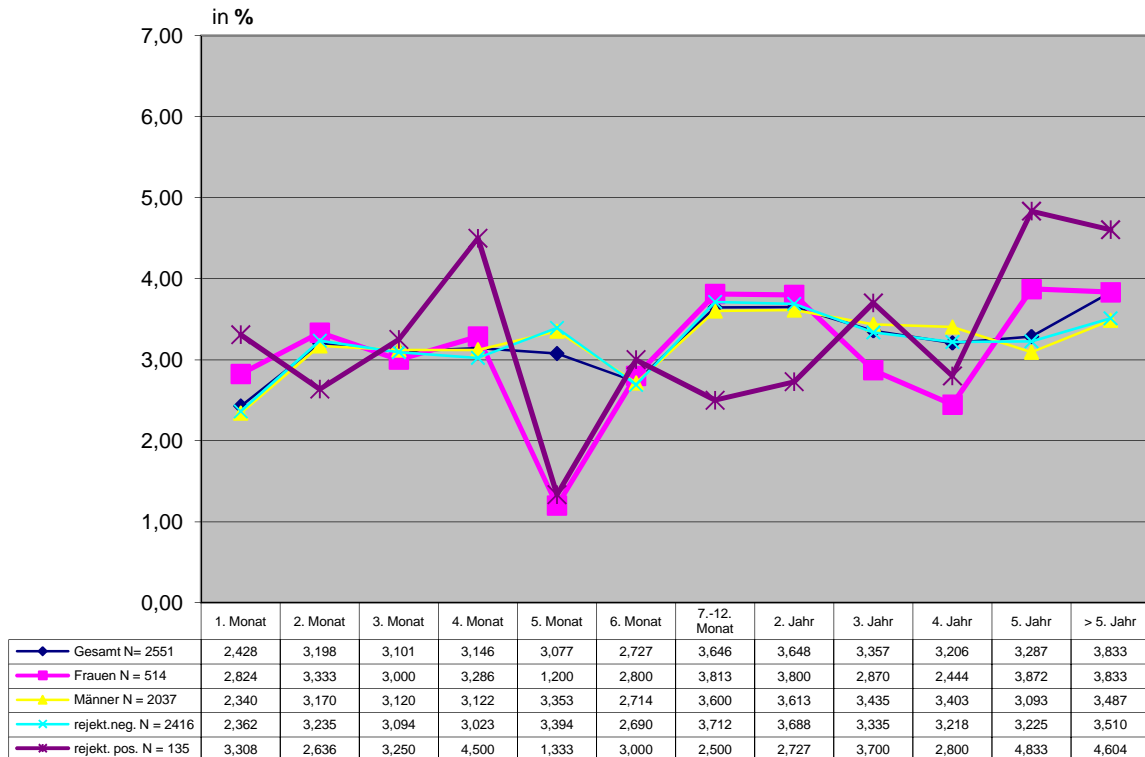


Abb. 28 Vergleich der Mittelwerte: Narbenanteile an den Biopsien nach HTx in %

Da die Narbengröße als Differenz zwischen der Fibrosefläche und der reinen Fibrose angegeben wird, es sich also um eine Untermenge von Fibrose_μm² handelt, gelten folglich dort getroffene Aussagen über die statistische Unabhängigkeit der beobachteten Variablen. Statistisch signifikante Zusammenhänge für die Entwicklung des Narbenanteils in den Biopsien können aus den beobachteten Variablen Alter bei HTx, Geschlecht, Zeitpunkt der Biopsie nach HTx und Abstoßungsreaktion nicht getroffen werden.

5. Diskussion

5.1. Diskussion von Material und Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde der histomorphometrisch erfaßte Bindegewebsanteil von 2551 Endomyokardbiopsien von 855 herztransplantierten Patienten analysiert. Das zur Verfügung stehende Material bestand aus rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien, die während der im Posttransplantationsmanagement routinemäßig durchgeführten Herzkatheteruntersuchungen gewonnen wurden.

Die histomorphometrischen Daten der Biopsien wurden im Zusammenhang mit den Daten der untersuchten Patienten, ihrem Geschlecht und ihrem Alter sowie zeitgleichen und vorangegangenen Rejektionsepisoden statistisch bewertet. Nach einer deskriptiven statistischen Analyse wurde insbesondere versucht, Korrelationen zwischen den Daten und dem in der Endomyokardbiopsie gemessenen Fibrose- bzw. Narbengehalt festzustellen. Die Beurteilung der akuten zellulären Rejektionen erfolgt streng nach der von der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) empfohlenen Klassifikation und ihrer Ergänzung. In dieser Arbeit wird die differenzierte Gliederung der Fassung von 1990 beibehalten [59], ergänzt um die in der ISHLT-Klassifikation nicht enthaltene Klasse 01A, die von Prof. Dr. R. Meyer zusätzlich eingeführt wurde [57].

Von 2662 Endomyokardbiopsien, die nach der Skala der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) klassifiziert wurden, konnten 111 datentechnisch nicht ausgewertet werden: Bei 53 Biopsien lagen keine Messwerte vor. An weiteren 58 Biopsien konnten keine histomorphometrischen Messungen durchgeführt werden. Entweder stand nicht genügend Material zur Verfügung oder die myokardiale Zellstruktur war so stark verändert, dass kein innerer struktureller Zusammenhang zu erkennen war. Somit ergibt sich eine Gesamtsumme von 2551 Biopsien, die Gegenstand der Untersuchungen sind. Weil diese verbleibende Grundgesamtheit für die Durchführung valider statistischer Tests repräsentativ ist, bleibt die Aussagekraft der Ergebnisse erhalten.

Für die Beurteilung der am DHZB erhobenen Messergebnisse wurde der beobachtete Zeitraum von mehr als 5 Jahren nach HTx in 12 Erhebungsintervalle unterteilt. Dabei erhält man eine unterschiedliche Biopsieanzahl je Untersuchungsintervall (vgl. Tab.9).

Tab. 9 Biopsien je Untersuchungsintervall

	Erhebungsintervall	Frauen	Männer	Gesamt
EI 1	1. Monat post HTx	34	153	187
EI 2	2. Monat post HTx	30	147	177
EI 3	3. Monat post HTx	14	75	89
EI 4	4. Monat post HTx	7	41	48
EI 5	5. Monat post HTx	5	34	39
EI 6	6. Monat post HTx	5	28	33
EI 7	7. - 12. Monat post HTx	32	115	147
EI 8	2. Jahr post HTx	50	217	267
EI 9	3. Jahr post HTx	23	145	168
EI 10	4. Jahr post HTx	36	139	175
EI 11	5. Jahr post HTx	39	118	157
EI 12	> 5. Jahr post HTx	239	825	1064
	Insgesamt	514	2037	2551

In den ersten Erhebungsintervallen nahm die Biopsiezahl von 187 im ersten Monat nach HTx auf 33 Biopsien im sechsten Monat nach HTx stetig ab. Im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen war die Zahl der Endomyokardbiopsieentnahmen ebenfalls rückläufig. Die Ergebnisse des 4.-6. Erhebungsintervalls weisen die geringsten Fallzahlen auf und scheinen deshalb weniger repräsentativ als die übrigen Intervalle zu sein. Aus diesem Grund wurde das 7. Erhebungsintervall auf 180 Tage erweitert, wodurch die Fallzahlen wieder auf 147 Biopsien erhöht wurden. Der darauf folgende Zeitraum wurde nochmals um 180 Tage auf Ein-Jahres-Intervalle verlängert und diese Intervallgröße für die weiteren Erhebungen beibehalten. Tabelle 9 zeigt die Anzahl der entnommenen Biopsien dem Geschlecht zugeordnet. Männer weisen mit 2037 Biopsien fast viermal so viele Biopsien wie Frauen (N=514) auf. 46% der Biopsien bei den Frauen und 40% der Biopsien bei den Männern erfolgen erst 5 Jahre nach HTx. In den Erhebungsintervallen 1-11, also bis einschließlich 5 Jahre nach HTx liegt der Mittelwert bei den Frauen bei 25 Biopsien je Erhebungsintervall. Dieser Mittelwert wird vor allem in den Erhebungsintervallen 4-6, also vier bis sechs Monate nach HTx deutlich unterschritten, weshalb

die Ergebnisse dieser Erhebungsintervalle möglicherweise statistisch verzerrt sind. Bei den Männern liegt der Mittelwert in den Erhebungsintervallen 1 bis 11, also bis einschließlich 5 Jahre nach HTx bei 110 Biopsien je Erhebungsintervall. Auch hier müssen für die Erhebungsintervalle vier bis sechs, also 4.-6. Monat nach HTx, dieselben statistischen Bedenken hinsichtlich der Daten erhoben werden.

Die Arbeit hat zum Ziel Muster oder Trends in den quantitativen Daten der Fibrose- und Narbenmessung festzustellen. Um diese Veränderungen richtig interpretieren zu können ist es sinnvoll, Charakteristika des Datenmaterials zu verstehen. Anhand der Messdaten in der Nullbiopsiegruppe werden einige, im Folgenden erläuterte Eigenschaften der Daten ersichtlich. Im Vergleich der konsolidierten Mittelwerte aus den Biopsien, die durchgängig in der Patientenuntersuchung zugrunde liegen (Tab. 1a), mit den jeweiligen zwölf Einzelwerten der Biopsien (Tab. 1b) fallen in den Einzelmesswerten größere Spannweiten bei den Standardabweichungen auf. Diese sind eine Wirkung der 12fach höheren Fallzahlen. In den Werten der Tab. 1a schlägt sich der Nivellierungseffekt der ersten in den Befundberichten erfolgten Berechnungsstufe von Mittelwerten nieder. In die Kontrollberechnung der Werte der Tab. 1b, die jeweils alle 12 Einzelmesswerte berücksichtigt, gehen auch extremere Einzelwerte der 372 Messdaten ein und führen zu einer größeren Spreizung der Ergebnisse.

Die extreme Spreizung der Datenwerte wiederholt sich bei den 2551 Biopsien der Patientendaten, obwohl hier bereits der nivellierende Effekt der Mittelwerte aus den Ergebnisprotokollen wirksam ist, in denen die jeweils 12 Einzelmessungen zusammengefasst sind. Die hohen Standardabweichungen und die – in den Boxplots sichtbaren – Ausreißer und Extremwerte sind geradezu ein Charakteristikum des Datenmaterials. Die auffälligen Ausreißer und Extremwerte unterstreichen, dass die Biopsieergebnisse keiner Normalverteilung unterliegen. Insbesondere einzelne hohe Messwerte sind für eine extreme Spreizung der Verteilung verantwortlich und erhöhen den arithmetischen Mittelwert der Ergebnisse. Deshalb empfiehlt sich der Medianwert als Indikator für generelle Aussagen über die untersuchten Zusammenhänge.

Zur erfolgreichen Herztransplantation (HTx) gehört unabdingbar die sachgerechte Diagnostik von Abstoßungsreaktionen. Die Endomyokardbiopsie hat sich als eine zuverlässige Überwachungsmethode zur Erkennung von Abstoßungsreaktionen erwiesen und stellt nach wie vor den Goldstandard in der Abstoßungsdiagnostik nach HTx dar [16][32][39][42][46][54][71].

Bei der EMB werden Gewebeproben von 2-3mm Durchmesser mittels Bioptom aus dem Myokard entnommen. Über einen venösen Zugang wird ein Katheter über die V.cava superior, in den rechten Vorhof über die Trikuspidalklappe bis in die rechte Herzkammer vorgeschoben. Die EMB wird bevorzugt aus dem Interventrikularseptum entnommen, da das Gewebe dort kräftiger ist als in der freien rechtsventrikulären Wand und somit das Risiko einer Perforation minimiert werden kann [40]. Da die zellulären Entzündungsinfiltrate fleckförmig und inhomogen über das Myokard verteilt sind, besteht bei zu geringer Probenanzahl die Gefahr der falschen Bewertung. Aus diesem Grund ist es wichtig, mindestens drei Biopsien aus mindestens zwei verschiedenen Orten (z.B. spitzennah und mittleres Septum) zu entnehmen. Tan et al. [58] zeigen, dass, wenn in drei Biopsien keine Rejektion nachweisbar ist, nur eine 0-5%ige Chance besteht eine milde, moderate oder schwerwiegende Rejektion zu verpassen. Werden vier Biopsien entnommen, so kann die Rate der falsch-negativen Diagnosen einer milden Rejektion auf 2% reduziert werden.

Damit die Endomyokardbiopsie repräsentative histopathologische Ergebnisse liefern kann, sind folgende Anforderungen an die Myokardbiopsie zu stellen:

- 1.) Anzahl der Biopsie: mindestens 3
- 2.) Anteil am Myokardgewebe: mindestens 50%
- 3.) Anzahl der Schnittstufen mit HE-Färbung: mindestens 3. [4][40][58]

Die Weiterbehandlung und Aufbereitung der am DHZB entnommenen Endomyokardbiopsien erfolgt nach allgemein anerkannten und standardisierten Methoden. Die Auswertung der histologischen Präparate basiert auf einer computergestützten Bildanalyse. Damit sind standardisierte und vom Untersucher unabhängige Messbedingungen geschaffen. Eine mögliche Fehlerquelle stellt jedoch die subjektive Auswahl der zu vermessenden Gesichtsfelder durch den Untersucher dar. In einigen Fällen enthalten die histologischen Schnitte Regionen, in denen die myokardiale Zellarchitektur stark gestört ist, so dass ein vollständiger Messvorgang von 12 Gesichtsfeldern nicht möglich ist. Da 3-4 Gewebsschnitte auf einem Objektträger platziert werden, besteht die Möglichkeit, die fehlenden Gesichtsfelder in einer anderen Schnittebene zu ergänzen.

Die histologische Auswertung der Endomyokardbiopsie wird durch einige Artefakte erschwert. Durch den Zug bei der Biopsieentnahme kommt es zu einer Kontraktion der Muskelfasern an der peripheren Zone des entnommenen Gewebes. Somit entstehen Artefakte, die ähnlich denen von Kontraktionsbändern sind. Sollte das Gewebe über einen längeren

Zeitraum auf einem nassen Schwamm liegen, kommt es zu einer Separation der Muskelfasern und zur Ausbildung eines interstitiellen Ödems. Das Biopsat sollte jederzeit behutsam behandelt werden, um eine mechanische Beschädigung wie beispielsweise kompressionsbedingte Artefakte zu verhindern [42].

Außerdem gibt es noch Artefakte, die durch das ischämische Intervall zwischen der Herzexplantation beim Spender und Implantation beim Empfänger zu Stande kommen. Je länger die Ischämiezeit beträgt, desto ausgeprägter stellt sich die Veränderung in der histologischen Analyse dar. Es zeigt sich ein kleiner subendokardialer Herd, der einen Verlust an Muskelfasern ohne Nachweis einer Entzündungsreaktion zu verzeichnen hat.

Billingham [7] verweist 1985 darauf, dass Unterschiede zwischen der Abstoßungsreaktion unter Cyclosporin-A-Therapie und unter konventioneller Therapie bestehen. Die Nebenwirkungen von Cyclosporin A führen u.a. zu einer Entwicklung endokardialer Infiltrate. Nach dem ersten Patienten, bei dem endokardiale Lymphozyteninfiltrate beobachtet wurden, wird vom Quilty-Effekt gesprochen. Die Biopsien zeigen in 10-20% der Fälle solche endokardiale Infiltrate. Das Infiltrat besteht hauptsächlich aus T-Lymphozyten und einigen B-Zellen [63]. Inwieweit das Entzündungszellinfiltrat mit einer akuten Abstoßung assoziiert ist, wird kontrovers diskutiert [42][65]. Untersuchungen von Hiemann et al. [23][24] zeigen jedoch, dass eine Quilty-Läsion mit einem schlechteren Überleben nach Transplantation verknüpft ist.

Aus technischen Gründen ist es möglich, dass bei wiederholten Biopsien Gewebe aus früheren, „alten“ Biopsiestellen entnommen wird. Nach einer Endomyokardbiopsie unterliegt die Biopsieentnahmestelle einer progressiven Reorganisation [65]. Nach Endomyokardbiopsieentnahme findet sich an der Entnahmestelle ein Thrombus, der von Fibroblasten und Endothelzellen durchsetzt ist. Zunächst bildet sich Granulationsgewebe, später kommt es als Zeichen des regenerativen Gewebeumbaus zur Ausbildung von Fibrose, die Entzündungszellen enthalten kann [42]. Diese Fibrose wird als reparative oder „Ersatzfibrose“ bezeichnet [37]. Je länger die Nachbeobachtungszeit andauert und je häufiger Gewebeproben entnommen werden, desto weniger informativ und schwieriger zu interpretieren sind die Endomyokardbiopsien [63]. Veränderungen, die eine Rejektionsdiagnostik erschweren sind z.B. frische Thromben, Hämorrhagien, Granulationsgewebe und mononukleäre Infiltrate [42][63]. Trotz der beschriebenen Probleme bei der Durchführung und Auswertung von Endomyokardbiopsien kann der Pathologe in Kenntnis dieser Sachverhalte mit einer bisher durch keine andere Untersuchungstechnik erreichbaren Sicherheit Aussagen zum Zustand des transplantierten Organs treffen.

In den letzten Jahren wurden neue nicht-invasive Methoden entwickelt, um die Biopsiefrequenz zu verringern oder die Endomyokardbiopsie zu ersetzen. Hummel et al. [28] kommen zu dem Ergebnis, dass alternative Methoden für die Diagnostik der akuten Abstoßungsreaktion bereits zur Verfügung stehen und somit Endomyokardbiopsien nicht länger als „Goldstandard“ zur Überwachung von Abstoßungsreaktionen akzeptiert werden könnten. Die Autoren sehen das Abstoßungsmonitoring mittels Endomyokardbiopsie nur noch in Zentren als gerechtfertigt an, die keinen Zugriff auf modernere Alternativen hätten. Winters [71] hingegen kommt zu einem anderen Ergebnis. Er stellt fest, dass bis heute keine der non-invasiven Techniken eine hinreichende Spezifität oder Sensitivität zeigt, um die Endomyokardbiopsie als diagnostisches Instrument zu ersetzen.

In der Abteilung für Herzpathologie (Leitung: Prof. Dr. R. Meyer) im DHZB konnte im Zeitraum von 1998 bis 2009 das Material dieser Studie erhoben werden. Trotz den beschriebenen hohen Anforderungen an die Endomyokardbiopsieentnahme sowie an die Aufarbeitung als auch an die Auswertung, liegen dieser Arbeit 2551 Biopsien zugrunde. Anzahl, absolute und relative Werte der untersuchten Endomyokardbiopsien reflektieren unterschiedliche Zeitpunkte der Biopsieentnahme und verschiedene Dimensionen der Spender- und Empfängerverteilung in soziodemografischer und medizinischer Hinsicht. Die Gesamtsumme der Biopsien sowie Struktur und Qualität bilden eine valide Grundlage, die Ausgangsfragestellung aufzugreifen.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Bei der Kaplan-Meier-Methode werden die Überlebenswahrscheinlichkeiten der noch Lebenden immer dann neu berechnet, wenn für einen Fall das Ereignis (der Tod eines Patienten) eintritt. Dabei wird zwischen Fällen unterschieden, bei denen das Ereignis eintritt, und den zensierten Fällen (bei denen der Eintritt des Ereignisses bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eintritt). Im beobachteten Zeitraum sind 46 Frauen und 240 Männer verstorben, 74,9% der Frauen und 64,3% der Männer leben zum Endpunkt der Untersuchung am 31.12.2009 noch (vgl. Tab 10a). Bei der Betrachtung der Überlebenswahrscheinlichkeiten ergibt sich, dass bei einem Gesamtmittelwert von 15,6 Jahren (Median=16,1) für die Gruppe der Frauen im Mittel eine Überlebenszeit von 17,2 Jahren (Median=18,7) und bei den Männern von 15,2 Jahren (Median=15,1) auftritt (vgl. Tab 10b).

Tab. 10a Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier (nach Geschlecht)

Geschlecht	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse (=Tod)	Zensiert = Ereignis nicht eingetreten	
			N	Überlebens- wahrscheinlichkeiten in %
Frauen	183	46	137	74,9%
Männer	672	240	432	64,3%
Gesamt	855	286	569	66,5%

Tab. 10b Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit (in Jahren)

Geschlecht	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	Standard- fehler	95%- Konfidenzintervall		Schätzer	Standard- fehler	95%- Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
Frauen	17,2	,779	15,6	18,7	18,7	.	.	.
Männer	15,2	,394	14,4	15,9	15,1	,847	13,4	16,7
Gesamt	15,6	,355	14,9	16,3	16,1	1,029	14,1	18,1

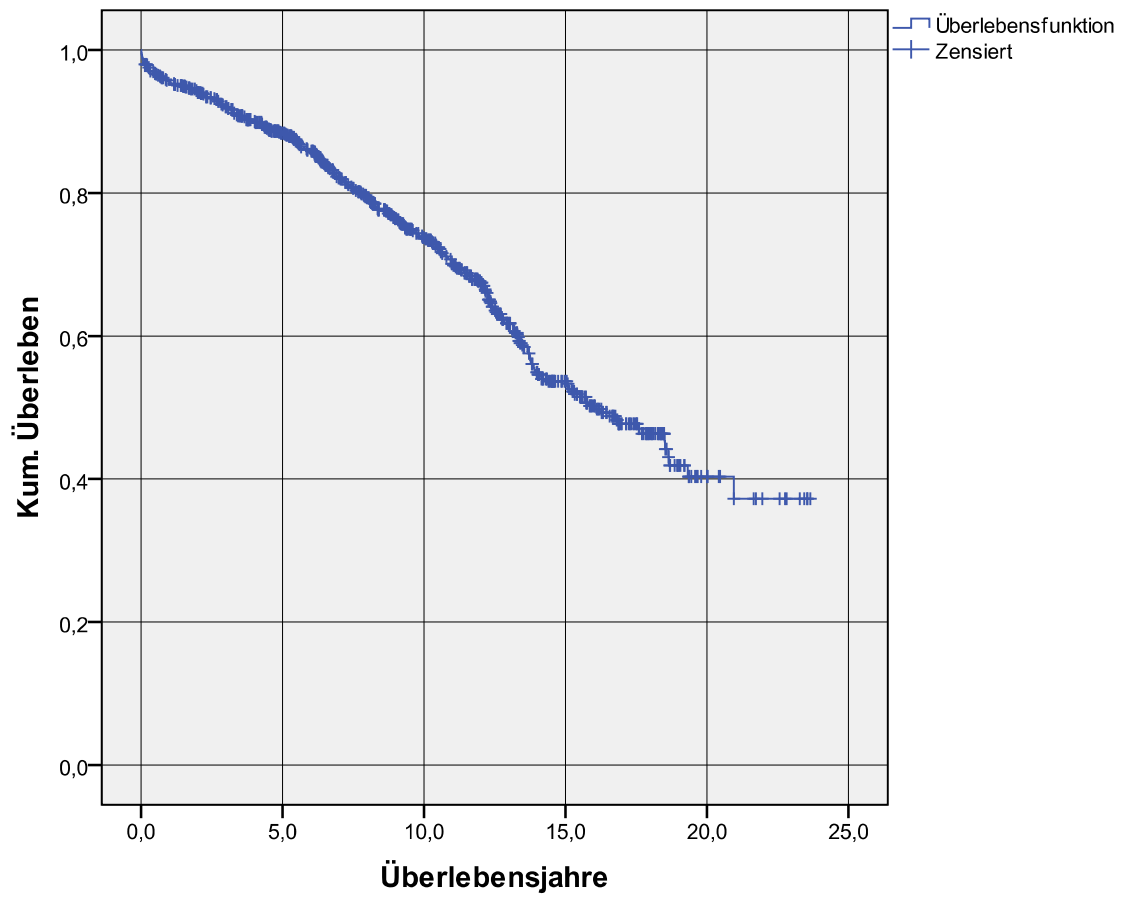


Abb. 29 Überlebensfunktionen insgesamt (nach Kaplan-Meier) (in Jahren)

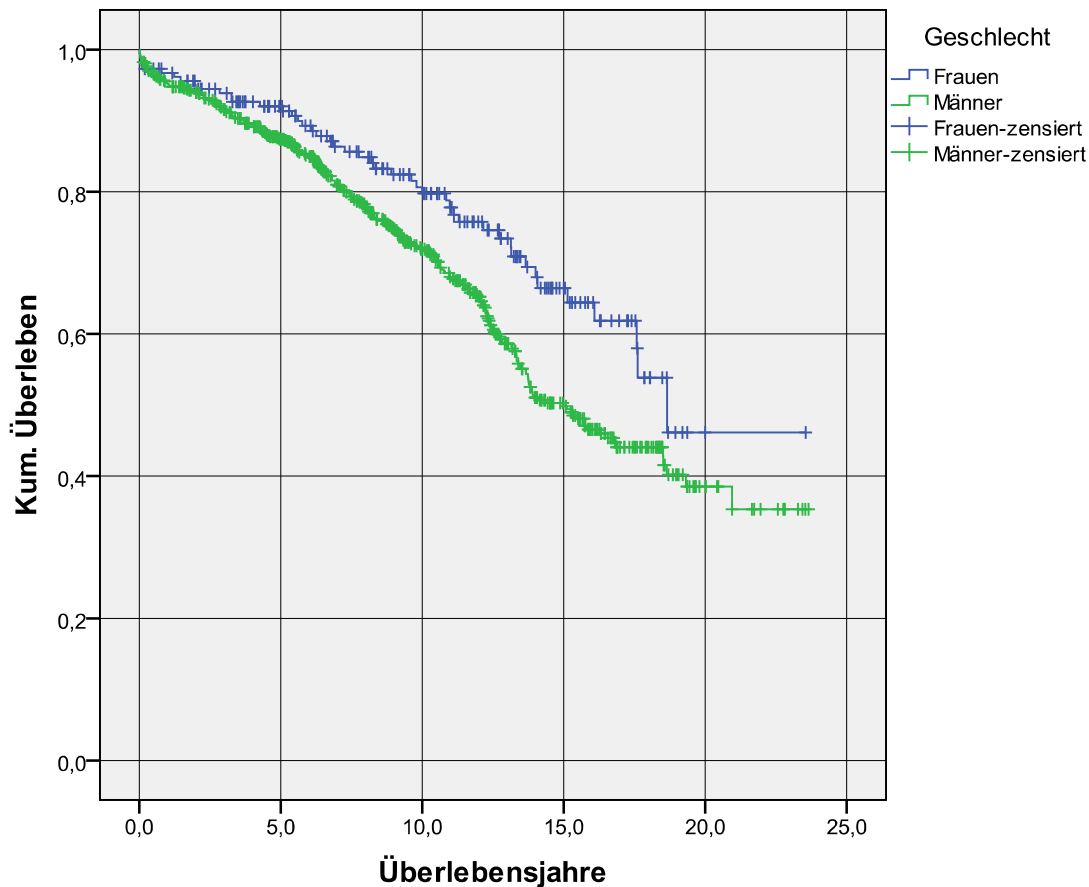


Abb. 30 Überlebensfunktionen der Geschlechter (nach Kaplan-Meier) (in Jahren)

Bei der Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten ist es möglich, dass ein Patient aufgrund der morphologischen Veränderungen in der EMB im zeitlichen Verlauf Unterschiede in der quantitativen Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit aufweist. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache weist die Erstdiagnose, die entsprechend den ISHLT Kriterien gestellt wird, eine hohe Treffsicherheit bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit auf.

Tab. 11a bestätigt mit den relativen Überlebenswahrscheinlichkeiten die Unterscheidung der Gesamtpopulation in rejektionsnegative (ISHLT 0-1B) und -positive (ISHLT 2-4) Gruppen. Die ISHLT - Gruppe 4 ist nicht aufgeführt, weil zum Erstdiagnosezeitpunkt noch keine Biopsie diesem Kriterium entsprach. In den ISHLT -Gruppen 2 und 3B liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit unter 40%. Das bedeutet, dass die histologische Diagnose einer moderaten oder schweren Abstoßung mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit im weiteren postoperativen Zeitraum nach HTx einher gehen kann.

Tab. 11a Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier nach ISHLT - Erstdiagnose

Erstdiagnose ISHLT	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse (=Tod)	Zensiert = Ereignis nicht eingetreten	
			N	Überlebens- wahrscheinlichkeiten in %
Nicht auswertbar	30	22	8	26,7%
0	557	173	384	68,9%
01A	67	19	48	71,6%
1A	136	44	92	67,6%
1B	13	2	11	84,6%
2	19	12	7	36,8%
3A	29	11	18	62,1%
3B	4	3	1	25,0%
Gesamt	855	286	569	66,5%

Tab. 11b zeigt, dass sich im Mittel für die ISHLT - Gruppe 0 die längste Überlebenszeit von 16,3 Jahren (Median = 18,5) und für die ISHLT - Gruppe 3B die kürzeste mit 5,4 Jahren (Median = 6,2) ergibt. Auffällig ist, dass besonders in den ISHLT - Gruppen 1B, 3A und 3B eine breite Streuung der Überlebenszeiten von bis zu 9 Jahren vorliegt. Ein statistischer Zusammenhang zwischen der ISHLT - Erstdiagnose und der Überlebensverteilung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 11c). Nicht auswertbar waren die Daten von 30 der 855 Patienten, die der Codierung 9 zugewiesen wurden, da keine Messungen durchgeführt werden konnten. Auch wenn die Unterscheidung in rejektionsnegative und -positive Gruppen die Ergebnisse der Überlebenswahrscheinlichkeiten betreffend statistisch betrachtet nicht signifikant sind, so weisen sie jedoch auf einen Trend mit hoher klinischer Bedeutung hin. Dieses Ergebnis hebt die Bedeutung hervor, die der histologischen Sicherung der Diagnose zukommt.

Tab. 11b Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit (in Jahren)

Erstdiagnose ISHLT	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	Standard- fehler	95%- Konfidenzintervall		Schätzer	Standard- fehler	95%- Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
nicht auswertbar	9,3	1,344	6,6	11,9	11,0	2,255	6,5	15,4
0	16,3	,428	15,4	17,1	18,5	1,080	16,4	20,6
01A	14,9	,779	13,4	16,5
1A	13,3	,686	11,9	14,6	13,7	1,452	10,8	16,5
1B	15,2	2,321	10,7	19,8
2	11,8	,908	10,0	13,6	12,5	,500	11,5	13,5
3A	14,6	2,004	10,7	18,5
3B	5,4	1,967	1,5	9,2	6,2	4,715	0,0	15,5
Gesamt	15,6	,355	14,9	16,3	16,1	1,029	14,1	18,1

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Tab. 11c Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen je ISHLT-Erstdiagnose

Erstdiagnose	Perzentile					
	25,0%		50,0%		75,0%	
	Schätzer	Standardfehler	Schätzer	Standardfehler	Schätzer	Standardfehler
fehlend	13,462	1,225	10,968	2,255	,953	,953
0	.	.	18,519	1,080	10,626	,821
01A	10,461	2,053
1A	.	.	13,662	1,452	8,966	,944
1B	10,850	7,433
2	15,253	.	12,490	,500	10,579	3,427
3A	3,258	1,669
3B	8,057	.	6,248	4,715	,074	.
Gesamt	.	.	16,082	1,029	9,339	,539

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	45,748	7	,000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	45,798	7	,000
Tarone-Ware	45,807	7	,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Erstdiagnose.

Beim Studium der aktuell verfügbaren Literatur konnte kein Nachweis über die Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit vom ISHLT-Grad gefunden werden, so dass die Diskussion nicht mit Publikationen untermauert werden kann.

Die günstige Erstdiagnose nach ISHLT macht jedoch die weitere strenge medizinische Kontrolle nicht überflüssig, noch darf sie zu einer nachlassenden Sorgfalt in ihrer Durchführung verleiten. Auf mögliche Artefakte der Biopsie selbst wurde bereits warnend hingewiesen. Mills et al. [40] weisen in ihrer Studie auf einen paradoxen Zusammenhang zwischen einer hämodynamischen Gefährdung und einem ISHLT-Grad von 0 bis maximal 2 hin. In ihrer Studie hatten Patienten mit einem ISHLT Grad von 0 bis maximal 2 drei Monate nach HTx eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 95%, hingegen Patienten mit einem initialen ISHLT Grad von 3A oder höher (d.h. 3B oder 4) nur noch eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 60%. Jedoch sank die Überlebenswahrscheinlichkeit zwei Jahre nach HTx für die Patienten mit dem ISHLT Grad von 0 bis maximal 2 auf 46% gegenüber Patienten mit einem initialen ISHLT Grad von 3A oder höher (d.h. 3B oder 4), die bei 84% liegt und somit fast zweimal so groß ist. Neben der Annahme eines biologisch unterschiedlichen pathologischen Prozesses führen sie das höhere Risiko für diese spezifische Gruppe der hämodynamischen Gefährdung auf die durch die ISHLT-Diagnostik indizierte fehlende zelluläre Rejektionsgefahr und die damit verbundene vernachlässigte Immunsuppression zurück.

Der normale Bindegewebsgehalt in aufgeführten Kontrolluntersuchungen liegt $< 10\%$ [31][43][55]. Der Fibroseanteil von 0 bis zu einschließlich 9 % wird am Deutschen Herzzentrum in Berlin in den Befundberichten als „Normalwert“ definiert.

Die folgende Tabelle 12a gibt die Ergebnisse über die jeweiligen Fibroseanteile (in %) in den Biopsien wieder. Die Tabelle gibt die Mittelwerte der Fibroseanteile für die 855 Patienten wieder, wobei jeweils nur die Ergebnisse der Erstbiopsie nach HTx ausgewertet wurden. Die Tabelle 12b gibt dagegen die Mittelwerte der Fibroseanteile an, die aus der Gesamtauswertung aller Biopsien errechnet werden.

In Tabelle 12c sind die Ergebnisse noch einmal gruppiert, und zwar Gruppe 1 mit einem Mittelwert der Fibroseanteile bis 9 %, Gruppe 2 mit einem Fibroseanteil von 9 bis 20 % und Gruppe 3 mit einem darüber liegenden Anteil.

**Tab. 12 a: Fibroseanteile in %
(Erstbiopsie nach HTx)**

Mittelwerte bei 855 Patienten		
N	Gültig	831
	Nicht auswertbar	24
Mittelwert		10,51
Median		9,00

**Tab. 12b: Fibroseanteile in %
(Gesamtbiopsien)**

Mittelwerte der Gesamtbiopsien		
N	Gültig	2551
	Fehlend	0
Mittelwert		10,18
Median		9,00

Tab. 12c: Fibroseanteile in % – gruppiert

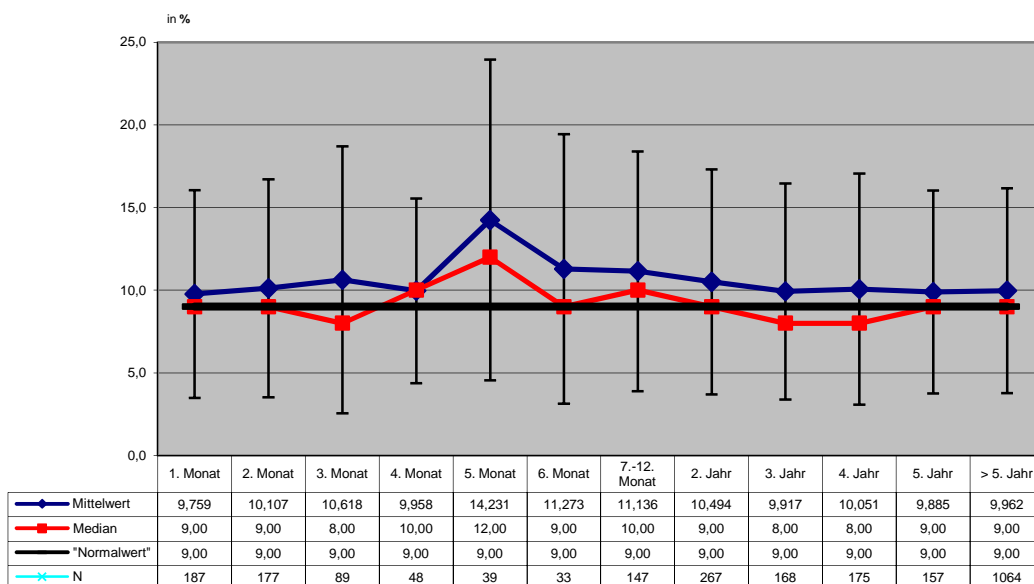
Mittelwerte bei 855 Patienten					
	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente	
Gültig	Gruppe 1: Bis 9 %	465	54,4	56,0	56,0
	Gruppe 2: 9 - 20 %	301	35,2	36,2	92,2
	Gruppe 3: > 20 %	65	7,6	7,8	100,0
	Gesamt	831	97,2	100,0	
Fehlend	System	24	2,8		
Gesamt		855	100,0		
Mittelwerte der Gesamtbiopsien					
	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente	
Gültig	Gruppe 1: Bis 9 %	1439	56,4	56,4	56,4
	Gruppe 2: 9 - 20 %	936	36,7	36,7	93,1
	Gruppe 3: > 20 %	176	6,9	6,9	100,0
	Gesamt	2551	100,0	100,0	

Der am Deutschen Herzzentrum in Berlin in den Befundberichten als „Normalwert“ definierte Schwellenwert von 9 % wird durch die vorgelegten Daten statistisch als Median bestätigt (vgl. Tab. 12a). Ein Fibroseanteil bis zu 9 % wird bei den Erstbiopsien nach HTx in 54,4 % aller Fälle bzw. 56,0 % aller gültigen Prozentwerte, bei Berücksichtigung der Gesamtbiopsien in 56,4 % aller Fälle eingehalten.

Knieriem [30] legte 1964 als Ergebnis seiner damaligen Forschungen an der Düsseldorfer Medizinischen Akademie einen „kritischen Bindegewebsgehalt“ von maximal 20 % fest. Gegenstand seiner Untersuchungen waren Herzmuskelbiopsien aus der Vorder-/ und Hinterwand der rechten und linken Herzkammer, aus dem rechten und linken vorderen Papillarmuskel sowie aus dem Interventrikularseptum. Nur bei 65 Patienten = 7,8 % der ausgewerteten Patientendaten wird ein hoher Fibroseanteil von mehr als 20 % in der (Erst-) Biopsie ausgewiesen, bei Berücksichtigung der Gesamtbiospien liegt dieser Anteil bei 6,9 % (vgl. Tab.12c). Demnach liegen innerhalb Knieriems 20%- Schwellenwert 92,2 % der Daten je Patient, bei Berücksichtigung der Gesamtbiospien 93,1 % (vgl. Tab. 12c).

Der arithmetische Mittelwert der Fibroseanteile liegt bei den Daten je Patient mit 10,51 % um 1,5 (vgl. Tab 12a), bei Berücksichtigung aller Biopsien etwas niedriger wohl aufgrund der höheren Fallzahlen mit 10,18 % um 1,2 Prozentpunkte über dem Medianwert (vgl. Tab 12b). Ursache dafür, dass der arithmetische Mittelwert über dem Medianwert liegt, ist seine starke Streuung mit einer Standardabweichung von 6,6 für alle gemessenen Werte.

In der Abb. 31 sind die Fibroseanteile (in %) am Gesamtgewebe aller Biopsien für die einzelnen Erhebungsintervalle grafisch dargestellt.



**Abb. 31: Fibroseanteile am Gesamtgewebe der Biopsie in %
(Gesamtbiospien: N = 2551)**

Lediglich in drei Erhebungsintervallen (4., 5. und 7.-12. Monat) liegt der Medianwert über dem Normalwert von 9 %, dafür im dritten Monat sowie im dritten und vierten Jahr nach Herztransplantation mit 8,0% unter dem Normalwert von 9 %. Für diese zeitlichen Schwankungen können keine statistisch plausiblen Erklärungen angeführt werden.

Tab. 13a: Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier nach Fibroseanteilen

Zusammenfassung der Fallverarbeitung				
Fibroseanteile in der (Erst-) Biopsie	Gesamt- zahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
Gruppe 1: Bis 9 %	465	127	338	72,7%
Gruppe 2: 9 - 20 %	301	116	185	61,5%
Gruppe 3: > 20 %	65	25	40	61,5%
Nicht auswertbar	24	18	6	25,0%
Gesamt	855	286	569	66,5%

Während die Überlebenswahrscheinlichkeit in der Gruppe der Patienten, bei deren (Erst-) Biopsie ein Fibrosemittelwert von bis zu 9 % gemessen wurde, bei 72,7 % und damit um 6,2 Prozentpunkten über dem Gesamtwert von 66,5 % liegt, steht sie in der Gruppe mit einem höheren Fibroseanteil um 11,2 Prozentpunkten niedriger bei 61,5 %, 5 Prozentpunkte unter dem Gesamtwert. Die 20%-Grenze Knieriems markiert keinen Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit gegenüber der Gruppe mit einem Fibroseanteil von 9 – 20 % (jeweils 61,5 %). Insofern erscheint Knieriems „kritischer Bindegewebsgehalt“ von 20 % zu hoch angesetzt. Der 20%-Grenzwert liefert keinen Ansatz, um prognostische Aussagen hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit zu treffen.

Tab. 13 b: Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit (in Jahren)

Fibroseanteile in der (Erst-) Biopsie	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	Standard- fehler	95%- Konfidenzintervall		Schätzer	Standard- fehler	95%- Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
Gruppe 1: Bis 9 %	16,1	,520	15,1	17,1	18,5	,997	16,6	20,5
Gruppe 2: 9 - 20 %	14,8	,558	13,7	15,9	13,9	,831	12,3	15,6
Gruppe 3: > 20 %	16,6	1,087	14,4	18,7
Nicht auswertbar	10,1	1,451	7,3	13,0	11,7	1,380	9,0	14,4
Gesamt	15,6	,355	14,9	16,3	16,1	1,029	14,1	18,1

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Tab. 13 c: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen nach Fibroseanteilen

Fibroseanteile in der (Erst-) Biopsie	Perzentile					
	25,0%		50,0%		75,0%	
	Schätzer	Standard- fehler	Schätzer	Standard- fehler	Schätzer	Standard- fehler
Gruppe 1: Bis 9 %			18,508	,997	10,461	,831
Gruppe 2: 9 - 20 %			13,933	,831	8,285	,970
Gruppe 3: > 20 %					9,331	2,006
Nicht auswertbar	13,462	1,228	11,669	1,380	1,459	3,923
Gesamt			16,082	1,029	9,339	,539

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	16,475	3	,001
Breslow (Generalized Wilcoxon)	15,153	3	,002
Tarone-Ware	16,015	3	,001

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Fibroseanteile in der (Erst-) Biopsie.

Der Median der Überlebenszeit liegt in der Gruppe der Patienten, bei deren (Erst-) Biopsie ein Fibrosemittelwert von bis zu 9 % gemessen wurde, mit 18,5 Jahren fast 5 Jahre über dem der Gruppe mit einem Wert zwischen 9 und 20 % (= 13,9 Jahre) und fast zweieinhalb Jahre über dem Gesamtdurchschnitt. Er liegt damit auf dem Niveau der Medianwerte für die Gruppe der Erstdiagnose nach ISHLT = 0 (Tab. 11b). Allerdings können keine statistisch signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden (Tab. 13 c). Auch wenn dieses Ergebnis statistisch betrachtet nicht signifikant ist, so wird ein Trend abgebildet, der den am DHZB in den

Befundberichten als „Normalwert“ definierte Schwellenwert der Fibrose von bis zu 9,0% bestätigt.

Nach einer Herztransplantation kann der Prozess der Fibrosierung schon früh nachgewiesen werden. Koch et al. [31] finden als Ergebnis, dass es zu einem signifikanten Anstieg des perimysialen Bindegewebes von $3,19 \pm 1,48\%$ vor der Transplantation auf $4,62 \pm 1,91\%$ eine Woche nach HTx kommt. In den folgenden Wochen zeigt sich kein weiterer signifikanter Anstieg mehr. Die Autoren werten den größten Anstieg des Bindegewebsgehalts in der ersten Woche nach HTx als Reaktion auf die vielen unphysiologischen Stimuli während der Herztransplantation (z.B. Hirntod, Ischämie, Immunsuppression). Nach diesem sprunghaften Anstieg in der unmittelbaren Zeit nach HTx steigt der Fibrosegehalt in der folgenden postoperativen Zeit langsamer an. Ein Jahr nach HTx ist dieser Prozess jedoch immer noch feststellbar.

In der Studie von Nozynski et al. [43] liegt der Fibrosemittelwert ihrer Kontrollgruppe bei 2,9%. Nur die Endomyokardbiopsien, die in der ersten Woche und nach einem Monat entnommen wurden zeigten mit 4,5 bzw. 6,1% einen vergleichbaren Fibrosemittelwert auf. Die Endomyokardbiopsien, die im späteren postoperativen Verlauf entnommen wurden, wiesen signifikant höhere Fibrosewerte verglichen mit der Kontrollgruppe auf. Der Maximalwert liegt in ihrer Studie bei 9,3% ein Jahr nach HTx. Danach sinken die Fibrosemittelwerte auf Werte um die 7% ab.

Im Vergleich der Ausgangswerte der Nullbiopsien mit den Endomyokardbiopsien, die im späteren postoperativen Verlauf entnommen wurden, bestätigt sich die von Nozynski et al. [43] beschriebene Entwicklung. Die Entwicklung des Bindegewebsgehalts in der Vergleichsgruppe kann nicht beurteilt werden, da es sich um einmalig befundete Spenderherzen handelt.

Der Fibrosemittelwert, der als Ausgangswert in der Nullbiopsiegruppe dient, liegt bei $7892,8\mu\text{m}^2$ bzw. 9,8%. Nur die EMB, die im ersten Monat nach HTx entnommen wurde, zeigt mit einem Mittelwert von $7913,86\mu\text{m}^2$ bzw. 9,8 % einen vergleichbaren Fibrosegehalt auf. Der Fibrosegehalt, der in den folgenden Erhebungsintervallen gemessen wurde, liegt deutlich höher.

Nozynski et al. [43] sehen besonders in der ersten Zeit nach HTx bis hin zu einem Monat nach HTx einen dynamischen Prozess in der Fibroseentwicklung. Der höchste Mittelwert im Fibroseanteil der EMB wird mit 9,3% (Median 9,6%) im Zeitraum ein Jahr nach HTx angegeben. In den Daten aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin wird der Maximalwert mit $11.548,56\mu\text{m}^2$ bzw. 14,2% (Median: $9.640\mu\text{m}^2$ bzw. 12,0%) bereits im fünften Monat nach HTx und somit

früher gemessen. Dies kann allerdings daran liegen, dass im fünften Monat eine vergleichsweise kleine Probenanzahl (N=39) vorliegt. Im Erhebungsintervall 7.-12. Monat nach HTx mit fast viermal so vielen Biopsien (N=147) liegt der Mittelwert bei $9066,97\mu\text{m}^2$ (11,1%) und der Median bei $7769,0\mu\text{m}^2$ (10,0%). Nozynski et al. weisen einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Fibrosegehalt und der postoperativen Zeit nach. Im Regressionsmodell konnte ein signifikanter, aber schwacher negativer Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Fibrosemittelwertes und dem Zeitpunkt der Biopsieentnahme bestätigt werden, jedoch können die Veränderungen in der abhängigen Variable Fibrosemittelwert nicht linear aus Veränderungen der Einflussvariablen erklärt werden, denn mit Veränderungen des Zeitpunkts der Biopsie lassen sich nicht einmal ein Prozent (0,5%) der Veränderung im Fibrosemittelwert erklären.

Es könnte ein grundsätzlicher Einwand gegen die Datenbasis des Regressionsmodells erhoben werden. Die untersuchten Biopsien stammen von Patienten, die sich unterschiedlich häufig einer Biopsie unterzogen haben. Die 2551 Biopsien stammen von 855 Patienten, die im Mittel 3,3 Biopsien erfuhren bei einem Maximalwert von 19 Biopsien bei einem Patienten. Ein Bias zugunsten nicht erhobener Variablen könnte sich folglich theoretisch verstärken. Die statistische Verzerrung des Regressionsmodells auf Grund dieser in unterschiedlicher Zahl mehrfach untersuchten Patienten ist nach der Erfahrung zwar als theoretisch nicht auszuschließen zu erwähnen, aber praktisch unvermeidbar und in den vorgelegten Ergebnissen eher unerheblich.

Schnabel et al. [55] führen eine Studie durch, um die interstitielle Fibrose ein Jahr nach Herztransplantation zu analysieren. Bei zwölf Patienten werden rechtsventrikuläre „0-Biopsien“, vor Implantation des Spenderherzens mit rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien verglichen, die bei der ersten Jahresuntersuchung entnommen werden. Danach kommt es ein Jahr nach HTx zu einem Anstieg des Fibrosegehalts. Perimysial nehmen die Bindegewebsfasern von $4,2 \pm 1,3\%$ vor Implantation auf $24,5 \pm 6,5\%$ ein Jahr post HTx zu. Endomysial zeigt sich eine Zunahme des Bindegewebes von $6,1 \pm 2,9\%$ auf $17,0 \pm 3,9\%$ bezogen auf den Referenzraum Myozytenbündel, umgerechnet auf das gesamte Myokard von $5,2 \pm 2,6\%$ auf $11,0 \pm 2,9\%$. Die Autoren schlussfolgern, dass bereits ein Jahr nach HTx morphometrisch eine signifikante interstitielle Myokardfibrose in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien gegenüber den „0-Biopsien“ zu finden ist.

Innerhalb des ersten Jahres nach HTx ist in allen untersuchten Gruppen mit Ausnahme der rejektionspositiven Gruppe im zweiten Halbjahr nach HTx ein statistisch jedoch nicht signifikanter Anstieg der Fibrosemittelwerte ebenfalls zu verzeichnen (vgl. Abb. 8,10,11 und 12).

Im Regressionsmodell zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,5$), aber schwacher negativer Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Fibrosemittelwerts und dem Zeitpunkt der Biopsieentnahme. Jedoch lässt sich mit Hilfe dieses Zusammenhangs die beobachtete Streuung im Fibrosemittelwert praktisch nicht erklären. Das korrigierte R-Quadrat war nahe Null bei 0,005. Gegen das Modell kann grundsätzlich der omitted-variable bias eingewendet werden, dass es nämlich nicht alle aus der pathologischen Literatur bekannten oder vermuteten Einflussgrößen untersucht. Tatsächlich beschränkt es sich auf die erhobenen Variablen, und nur für sie wurde ein linearer Zusammenhang geprüft und schließlich als schwach signifikant, aber nicht relevant verworfen.

Armstrong et al. [2] untersuchen mittels einer retrospektive Studie den Grad und die zeitliche Entwicklung der Kardiomyozytenhypertrophie und der myokardialen Fibrose über einen Zeitraum von 6 Jahren nach Herztransplantation. Endomyokardbiopsien von 50 Patienten wurden zum Zeitpunkt einen Monat nach HTx bis hin zu sechs Jahren nach HTx entnommen. Nach ihrem Ergebnis wird der niedrigste Fibrosemittelwert mit ca. 15 % einen Monat nach HTx erreicht. Somit wurde dieser Zeitpunkt als Ausgangswert für statistische Vergleiche benutzt. Nach 9 Monaten bzw. nach einem, zwei, drei und fünf Jahren kam es zu einem signifikanten Anstieg der Fibrose, die statistisch betrachtet mit ca. 19 % oberhalb des Ausgangswertes einen Monat nach HTx lag.

In den vorgelegten Daten liegt der niedrigste Mittelwert im Fibroseanteil der EMB ebenfalls im Zeitraum von einem Monat nach HTx, jedoch mit 9,759% mehr als ein Drittel deutlich unter dem von Armstrong et al. Im Verlauf des postoperativen Beobachtungszeitraumes kommt es zu einem Anstieg der Mittelwerte im Fibroseanteil mit 9,962% auf unter 10% fünf Jahre nach HTx (vgl. Abb. 31). Somit liegen sie sowohl nach einem, zwei, drei und fünf Jahren deutlich unter den Fibrosewerten von Armstrong et al.

Bisher wurden verschiedene Ursachen beschrieben, die zu Entstehung einer Myokardfibrosierung beitragen können (vgl. Einleitung). Der Anstieg innerhalb der ersten Monate nach HTx ist möglicherweise Ausdruck der intensiven immunologischen Auseinandersetzung des Empfängers mit dem Spenderorgan. Interessant ist auch die Überlegung, ob die Entwicklung einer Fibrose möglicherweise auf Einflüsse in der Zeit vor der Transplantation zurückzuführen ist. Springings [58] vermutet, dass Todesursachen der Spender wie z.B. eine Subarachnoidalblutung sowie ein schweres Schädel-Hirn-Trauma einen progressiven Einfluss auf Myozytennekrose bereits vor Organimplantation haben und somit auch einen Einflussfaktor der Fibroseentwicklung darstellen. Koch et al. [31] erklären die frühzeitige

Fibroseentwicklung mit Einflüssen noch während der Herztransplantation, z.B. Ischämie, Immunsuppression, Abstoßungen.

Billingham et al. [7] weisen die Ausbildung der interstitiellen Fibrose nach akuter zellulärer Rejektion mit vorliegender Myozytenschädigung nach. Betrachtet man nun die Fibrosemesswerte in den einzelnen Beobachtungszeiträumen der rejektionspositiven und rejektionsnegativen Gruppe, so fällt auf, dass der Maximalwert von $14.085\mu\text{m}^2$ in der rejektionspositiven Gruppe im vierten Monat nach HTx zu keinem Zeitpunkt von der rejektionsnegativen Gruppe erreicht wird. Möglicherweise ist dieser fehlende Nachweis Folge der kleineren Biopsieanzahl (N=4).

In der Literatur wird die Fibrosentstehung an Orten vorangegangener Biopsieentnahmen beschrieben. Diese Fibrose wird als reparative oder Ersatzfibrose bezeichnet. Diese Problematik gewinnt mit zunehmendem postoperativem Verlauf und mit der Häufigkeit von Endomyokardbiopsien an Bedeutung. Nach dieser in der Literatur beschriebenen Prognose müsste die Fibrosemenge im postoperativen Verlauf steigen. Die vorgelegten Untersuchungsergebnisse widersprechen dem. Im postoperativen Verlauf wurde vielmehr eine Abnahme der Gesamtfläche der Fibrose gemessen, die nicht kontinuierlich erfolgt. Die Veränderungen in der kontinuierlichen Entwicklung könnten Folge der veränderten Erhebungsintervalle sein. Das gleich bleibende Niveau ab dem 6. Monat nach HTx kann durch eine suffiziente immunsuppressive Therapie und die damit ruhenden Abstoßungsprozesse erklärt werden.

Weiterhin müssten Patienten mit einem ISHLT Grad von 2-4 als Folge der häufigeren Kontrollbiopsien ebenfalls höhere Fibrosemittelwerte aufweisen als Patienten mit einem niedrigeren ISHLT Grad. Der erneute Anstieg des Bindegewebsanteils im dritten und fünften Jahr nach HTx könnte somit als Folge der häufigeren Kontrollbiopsien begründet werden.

Jedoch konnte kein statistisch signifikanter Einfluss des Rejektionsgeschehens auf die Fibrosierung nachgewiesen werden. Somit ist die Fibroseentwicklung als unabhängiger Prozess von einer zeitgleich auftretenden akuten zellulären Rejektion zu werten.

Um Abhängigkeiten zwischen der Fibroseentwicklung und dem Geschlecht des untersuchten Patientenkollektivs zu untersuchen, wurden Gruppen gebildet.

In den ersten fünf Monaten nach HTx zeigt die Gesamtfläche der Fibrose bei Männern und Frauen einen Verlauf gleicher Tendenz. Jedoch liegt der Höchstwert der Frauen mit $10.738,60\mu\text{m}^2$ im fünften Monat nach HTx (N=5) um fast $1000\mu\text{m}^2$ unter dem der Männer mit

11.667,68 μm^2 (N=34). Bei den Frauen kommt es im folgenden Monat zu einem Rückgang der Fibrosewerte (5.588,00 μm^2 , N=5), der möglicherweise nur eine Folge geringer Fallzahlen ist. Im folgenden halben Jahr ist nämlich ein erneuter Anstieg zu verzeichnen (9.205,44 μm^2 , N=32), als die Biopsieanzahl wieder steigt.

Bei dem Vergleich der Fibrosemittelwerte im zeitlichen Verlauf aller untersuchten Gruppen fällt auf, dass der Ausgangswert der rejektionspositiven Gruppe im ersten Monat nach HTx (10.683,77 μm^2 , N=13) bereits deutlich, um 35 % über dem Durchschnittswert aller Biopsien im ersten Monat von 7.913,86 μm^2 (N=187) liegt. Der Fibroseanstieg im dritten und vierten Monat nach HTx gestaltet sich auch deutlicher als in den anderen Gruppen. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der kleineren Fallzahl (N=13) die Beobachtungen weniger aussagekräftig sind als bei einer höheren Fallzahl (N=187). In der Gruppe der Frauen fällt auf, dass es im sechsten Monat nach HTx zu einem stärkeren Sinken der Fibrosemenge kommt. Da keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisbar sind, müssen die Änderungen entweder als Artefakte angesehen werden, die aus zu niedrigen Fallzahlen resultieren, oder aber vor allem als ursächlich mit anderen als den untersuchten Variablen (Zeitpunkt der Biopsieentnahme, Rejektionsgeschehen, Geschlecht und Alter) begründet.

Das Narbengewebe wurde als relativer Anteil an der Gesamtfibrose (in %) gemessen. Die Anteilswerte der Fibrose und der reinen Fibrose sind demgegenüber auf die Gesamtfläche der Biopsie bezogen. Da das Narbengewebe als Differenz zwischen Fibrose und Fibrose_pur definiert ist, erfolgte eine entsprechende Neuberechnung, die das Narbengewebe ebenfalls als Prozentanteil an der Gesamtfläche der Biopsie darstellt und auf diese Weise in eine einheitliche Vergleichsdimension stellt.

Im ersten Jahr nach HTx ist ein deutlicher Anstieg des anteiligen Narbengewebes an der Endomyokardbiopsie zu verzeichnen. Die Narbenentstehung ist in der Literatur meist als der Prozess der Reparation, Defektheilung oder unvollständigen Regeneration beschrieben [9][22]. Organspezifisches Gewebe wird dabei durch Bindegewebe ersetzt [22]. Somit kann die Narbenbildung in den ersten Monaten nach HTx als einsetzender Heilungsprozess verstanden werden. Vergleicht man die zeitliche Entwicklung des Narbengewebes als Anteil an der Endomyokardbiopsie mit der zeitlichen Entwicklung der Fibrosemenge, so zeigt sich eine umgekehrte Tendenz. Im postoperativen Verlauf sinkt die Fibrosemenge ab, während der Narbenanteil steigt. Diese Entwicklung unterstützt die These, dass die Narbenentstehung als Wundheilungsprozess zu verstehen ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach HTx ein Prozess der Fibrosierung einsetzt. In der Literatur sind verschiedene Ursachen für die Fibroseentstehung genannt worden. Lineare, statistisch signifikante Abhängigkeiten zwischen der Fibroseentwicklung und der postoperativen Zeit, dem Rejektionsgeschehen, Geschlecht oder dem Alter konnten nicht nachgewiesen werden.

6. Zusammenfassung

In der Abteilung für Herzpathologie (Leitung: Prof. Dr. R. Meyer) im Deutschen Herzzentrum in Berlin (DHZB) wurde das Material dieser retrospektiven Studie im Zeitraum von 1998 bis 2009 erhoben. Die Daten von Endomyokardbiopsien aus dem rechten Ventrikel nach HTx wurden in einem opto-analytischen Verfahren gewonnen und nach einem festgelegten Standard tabellarisch festgehalten und wissenschaftlich ausgewertet.

In der vorliegenden Arbeit wurden 2551 Endomyokardbiopsien von 855 herztransplantierten Patienten histomorphometrisch untersucht.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die quantitativen Veränderungen der Fibrose und des anteiligen Narbengewebes an der Biopsie im postoperativen Verlauf. Die histomorphometrischen Daten der Biopsien wurden im Zusammenhang mit den Daten der untersuchten Patienten, ihrem Geschlecht und ihrem Alter sowie zeitgleichen und vorangegangenen Rejektionsepisoden statistisch bewertet. Gesucht wurde nach möglichen Beeinflussungen des Fibrose- oder Narbengehaltes im Endomyokard.

Innerhalb der ersten fünf Monate nach HTx kommt es zu einem Anstieg der Fibrosemenge. Im folgenden postoperativen Verlauf nimmt die Gesamtfläche der Fibrosemenge im Mittel ab. Im Regressionsmodell zeigt sich ein signifikanter ($p < 0,5$), aber schwacher negativer Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Fibrosemittelwerts und dem Zeitpunkt der Biopsieentnahme.

In den ersten fünf Monaten nach HTx ist ein deutlicher Anstieg der Fibrosemenge sowie des anteiligen Narbengewebes an der Endomyokardbiopsie zu verzeichnen. Im weiteren postoperativen Verlauf steigt der Narbenanteil im Gegensatz zur Fibrose weiter deutlich an.

Statistische Zusammenhänge zwischen der Fibrose- bzw. Narbenentwicklung und Rejektionsepisoden sowie patientenbezogenen Daten konnten nicht nachgewiesen werden.

7. Literaturverzeichnis:

- [1] Anversa P, Olivetti G, Melissari M, Loud AV.
Stereological measurement of cellular and subcellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat.
J Mol Cell Cardiol. 1980;12(8):781-95
- [2] Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV.
Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation.
J Am Coll Cardiol. 1998;32(3):704-710
- [3] Aziz S, McDonald TO, Gohra H.
Transplant Arterial Vasculopathy: Evidence for a Dual Pattern of Endothelial Injury and the Source of Smooth Muscle Cells in Lesions of Intimal Hyperplasia.
J heart lung transplant 1995;14(6Pt2):123-36
- [4] Baba HA, Wohlschläger J, Stypmann J, Hiemann NE.
Herztransplantation: Pathologie, Klinik und Therapie.
Pathologie. 2011;32(2):95-103
- [5] Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, et al.
A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group.
The International Society for Heart Transplantation. J Heart Transplant 1990;9(6):587-93.
- [6] Billingham ME.
Diagnosis of cardiac rejection by endomyocardial biopsy.
J heart lung transplant 1981;1:25-30
- [7] Billingham ME.
Endomyocardial biopsy detection of acute rejection in cardiac allograft recipients.
Heart Vessels 1985;1:86-90
- [8] Billingham ME.
The pathologic changes in long-term heart and lung transplant survivors.
J heart lung transplant 1992;11(4Pt2):252-7
- [9] Böcker W, Denk H, Heitz PhU, Moch H. Pathologie. 4. Auflage. Elsevier Verlag, München u.a. 2008 S. 143-144- ISBN 978-3-437-42382-6

- [10] Böcker W, Denk H, Heitz PhU. Pathologie. 3. Aufl. München: Elsevier Verlag, 2004 S. 145-46 - ISBN 3-437-42381-9
- [11] Bornhöft G. Pathologie kompakt. Springer Verlag, Berlin u.a. 1997: S.6,15- ISBN 3-540-62082-6
- [12] Caulfield JB, Borg TK.
The collagen network of the heart.
Lab Invest 1979; 40(3):364-72
- [13] Chuaqui, Benedicto, Arnold, G.
Pathologische Anatomie des Herzens und seiner Hüllen. Bd 1: Orthische Prämissen, angeborene Herzfehler. Berlin: Springer, 1993. S.182-185-ISBN 3-540-56388-1
(=Spezielle pathologische Anatomie ; 22)
- [14] Cotts WG, Johnson MR.
The Challenge of Rejection and Cardiac Allograft Vasculopathy.
Heart Fail Rev. 2001;6(3):227-40
- [15] Doering CW, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, Weber KT.
Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy.
Cardiovasc Res. 1988;22(10):686-95
- [16] Eiswirth CC JR, Smart FW.
Cardiac transplantation: role of endomyocardial biopsy and immunosuppressive agents.
J La State Med 1993;145(5):203-6
- [17] Fechler C.
Histomorphometrische Untersuchungen des interstitiellen Herzgewebes nach Herztransplantation. Promotionsarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, Charité. 2003
- [18] Fyfe B, Loh E, Winters GL, et al.
Heart transplantation-Associated perioperative ischemic myocardial injury: Morphological features and clinical significance.
Circulation. 1996;93(6):1133-40
- [19] Gandhi MS, Kamalov G, Shahbaz AU, et al.
Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis.
Heart Failure Rev 2011; 16(1):23-34
- [20] Gokel JM, Reichert B, Struck E.
Human cardiac transplantation - evaluation of morphological changes in serial

- endomyocardial biopsies.
 Pathol Res Pract. 1985;179(3):354-64
- [21] Grundmann, E. Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. Hrsg. von Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK, 11. Aufl., Elsevier Verlag, München 2008; S.35-37- ISBN 978-3-437-41541-8
- [22] Hees H, Sinowatz F. Allgemeine und Spezielle Pathologie. 3. Auflage, Köln Deutscher Ärzte-Verlag, 1996; S.37, 48-49 – ISBN 3-7691-0331-9
- [23] Hiemann NE, Hetzer R, Meyer R
 Pathomorphologische Befunde nach Herztransplantation.
 Z Herz-Thorax-Gefäßchir. 2005;19(5):209-17
- [24] Hiemann NE, Huebler M, Lehmkuhl H, Potapov EV, Hetzer R.
 Heart Transplantation at the Deutsches Herzzentrum Berlin.
 Clin Transpl. 2010:207-18
- [25] Hiemann NE, Knosalla C, Wellnhofer E, Lehmkuhl HB, Hetzer R, Meyer R.
 Quilty indicates increased risk for microvasculopathy and poor survival after heart transplantation.
 J Heart Lung Transplant. 2008;27(3):289-96
- [26] Hiemann NE, Wellnhofer E, Hetzer R, Meyer R.
 Small vessel disease after heart transplantation: impact of immunologic and nonimmunologic risk factors.
 Transpl Int. 2005; 18(8):908-14
- [27] Hiemann NE, Wellnhofer E, Knosalla C, et al.
 Prognostic impact of microvasculopathy on survival after heart transplantation: evidence from 9713 endomyocardial biopsies.
 Circulation. 2007;116(11):1274-82
- [28] Hummel M, Müller J, Dandel M, Hetzer R.
 Surveillance Biopsies in Heart and Lung Transplantation.
 Transplant Proc. 2002;34(5):1860-63
- [29] Jellis C, Martin J, Narula J, Marwick TH.
 Assessment of nonischemic Myocardial Fibrosis.
 J Am Coll Cardiol. 2010;56(2):89-97
- [30] Knieriem HJ.
 Über den Bindegewebsgehalt des Herzmuskels des Menschen.
 Basic Res Cardiol. 1964;44(3-4):231-59

- [31] Koch A, Geil-Bierschenk C, Rieker R, et al.
Morphometric changes of the right ventricle in the first two weeks after clinical heart transplantation: analysis of myocardial biopsies from patients with complicated versus uncomplicated course.
Eur J Cardiothorac Surg. 2006;30(2):370-78
- [32] Kottke-Marchant K, Ratliff NB.
Endomyocardial biopsy. Pathologic Findings in Cardiac Transplant Recipients.
Pathol Annu. 1990;25(Pt1):211-44
- [33] Laser JA, Fowles RE, Mason JW.
Endomyocardial Biopsy. Cardiovasc Clin. 1985;15(1):141-63
- [34] Magener A, Schnabel PhA, Amann K, et al.
Auswirkungen kurzer und langer „Gesamt“-Ischämiezeiten bei orthotoper Herztransplantation (HTx) auf die Entwicklung einer peri- und endomyosialen Fibrose.
Verh Dtsch Ges Pathol. 1994;78:599.
- [35] Mall G, Mattfeldt T, Möbius HJ, Leonhard R.
Stereological study on the rat heart in chronic alimentary thiamine deficiency- absence of myocardial changes despite starvation.
J Mol Cell Cardiol. 1986;18(6):635-43
- [36] Mall G, Rambašek M, Neumeister A, Kollmar S, Vetterlein F, Ritz E.
Myokardial interstitial fibrosis in experimental uremia-implications for cardiac compliance.
Kidney Int. 1988;33(4):804-11
- [37] McAllister, HA.
Endomyocardial Biopsy in the Evaluation of Conditions Leading to Cardiac Transplantation and in the Evaluation of Cardiac Allograft Rejection.
Tex Heart Inst J 1995;22(1):53-66
- [38] Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, et al.
International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010.
J Heart Lung Transplant. 2010;29(7):717-27
- [39] Mehra MR, Uber PA, Uber WE, Park MH, Scott RL.
Anything but a biopsy: noninvasive monitoring for cardiac allograft rejection.
Curr Opin Cardiol. 2002;17(2):131-6

- [40] Mills RM, Naftel DC, Kirklin JK, et al.
Heart transplant rejection with hemodynamic compromise: a multiinstitutional study of the role of endomyocardial cellular infiltrate.
J Heart Lung Transplant. 1997;16(8):813-21
- [41] Myles JL, Ratliff NB, McMahon JT.
Cyclosporine-associated microfibrils in cardiac transplant patients.
Am J Cardiovasc Pathol. 1988;2(2):127-32
- [42] Nair V, Butany J.
Heart transplant biopsies: interpretation and significance.
J Clin Pathol. 2010;63(1):12-20
- [43] Nozynski J, Zakliczynski M, Zembala-Nozynska E, et al.
Remodeling of Human Transplanted Myocardium in Ten-Year Follow-Up: A Clinical Pathology Study.
Transplant Proc. 2007;39(9):2833-40
- [44] Pardo Mindán FJ, Panizo A, Lozano MD, Herreros J, Mejía S.
Role of endomyocardial biopsy in the diagnosis of chronic rejection in human heart transplantation.
Clin Transplant. 1997;11(5Pt1):426-431
- [45] Pardo-Mindán FJ, Lozano MD, Contreras-Mejuto F, de Alava E:
Pathology of heart transplant through endomyocardial biopsy.
Semin Diagn Pathol. 1992;9(3):238-48
- [46] Patel JK, Kobashigawa JA.
Should we be doing routine biopsy after heart transplantation in a new era of anti-rejection?
Curr Opin Cardiol. 2006;21(2):127-31
- [47] Pereira NL, Zile MR, Harley RA, Van Bakel AB.
Myocardial mechanisms causing heart failure early after cardiac transplantation.
Transplant Proc. 2006;38(9):2999-3003
- [48] Pichler M, Rainer PP, Schauer S, Hoefler G.
Cardiac fibrosis in human transplanted hearts is mainly driven by cells of intracardiac origin.
J Am Coll Cardiol. 2012;59(11):1008-16
- [49] Pickering JG, Boughner DR.
Fibrosis in the Transplanted Heart and Its Relation to Donor Ischemic Time.

- Assessment With Polarized Light Microscopy and Digital Image Analysis.
Circulation. 1990;81(3):949-58.
- [50] Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delegado D, Ross HJ.
Cardiac allograft vasculopathy: a review.
Can J Surg. 2005;48(4):319-27
- [51] Reed EF, Demetris AJ, Hammond E, et al.
Acute antibody-mediated rejection of cardiac transplants.
J Heart Lung Transplant. 2006;25(2):153-9
- [52] Rodriguez ER.
The Pathology of Heart Transplant Biopsy Specimens: Revisiting the 1990 ISHLT Working Formulation.
J Heart Lung Transplant. 2003;22(1):3-15
- [53] Rowan RA, Billingham ME.
Pathologic Changes in the Long-term Transplanted Heart: A Morphometric Study of Myocardial Hypertrophy, Vascularity, and Fibrosis.
Hum Pathol. 1990 21(7):767-72
- [54] Sack FU, Lange R, Schnabel PA, et al.
Der Einfluß von Ischämiezeit auf die rechtsventrikuläre Hypertrophie und Fibrose in der Frühphase nach Herztransplantationen.
Transplantat med 1996:55
- [55] Schnabel PA, Amann K, Ghaderipour H, Knapp S, Magener A, Zimmermann R.
Interstitielle Fibrose in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien (RVEMB) ein Jahr nach Herztransplantation (HTx): Lokalisation, Ausmaß und Auswirkungen.
Verh Dtsch Ges Pathol. 1993;76:510-11
- [56] Schnabel PA, Geil-Bierschenk C, Sykora J, Amann K, Lange R, Sack FU.
Does right ventricular (RV) hypertrophy compensate interstitial fibrosis one year after heart transplantation.
J Heart Lung Transplant. 1994;13:81
- [57] Sezgin, Yasar.
Untersuchungen zur Bedeutung der HLA- DR für die Entstehung und Abheilung von Abstoßungsreaktionen. – Berlin: Humboldt-Univ., Diss. 2007; Tabelle 3, S. 10
- [58] Sprigings DC.
Fibrosis in transplanted heart: Letter, Comments.
Circulation. 1990; 82(4):1542

- [59] Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al.
Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection.
J Heart Lung Transplant. 2005;24(11):1710-20
- [60] Tan CD, Baldwin WM, Rodriguez ER.
Update on Cardiac Transplantation Pathology.
Arch Pathol Lab Med. 2007;131(8):1169-91
- [61] Taylor DO, Edwards LB, Aurora P, et al.
Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report – 2008.
J Heart Lung Transplant 2008;27(9):943–56.
- [62] Taylor DO, Yowell RL, Kfoury AG, et al.
Allograft coronary artery disease: clinical correlations with circulating anti-HLA antibodies and the immunohistopathologic pattern of vascular rejection.
J Heart Lung Transplant. 2000;19(6):518-21
- [63] Tazelaar HD, Edwards WD.
Pathology of Cardiac Transplantation: Recipient Hearts (Chronic Heart Failure) and Donor Hearts (Acute and Chronic Rejection).
Mayo Clin Proc. 1992;67(7):685-96
- [64] Tazelaar HD, Gay RE, Rowan RA, Billingham ME, Gay S.
Collagen Profile in the Transplanted Heart. Hum.
Pathol 1990;21(4):424-8.
- [65] Tazelaar HD.
Spectrum and Diagnosis of myocardial rejection.
Cardiol Clin. 1990;8(1):119-39
- [66] The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation.
Twenty-eight Adult Heart Transplant Report-2011.
J Heart Lung Transplant. 2011;30(10):1078-94
- [67] Thomas C. Histopathologie, Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik, 14. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart u.a. 2006: S. 11 ff
ISBN 3-7945-2429-2
- [68] Vasalli G, Gallino A, Weis M, et al.
Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy.
Eur Heart J. 2003;24(13):1180-88

- [69] Weber KT.
Fibrosis and hypertensive heart disease.
Curr Opin Cardiol. 2000;15(4):264-72
- [70] White SK, Sado DM, Flett AS, Moon JC.
Characterising the myocardial interstitial space: the clinical relevance of non-invasive imaging.
Heart. 2012;98(10):773-79
- [71] Winters GL.
The challenge of endomyocardial biopsy interpretation in assessing cardiac allograft rejection.
Curr Opin Cardiol. 1997;12(2):146-52
- [72] Yamani MH, Haji SA, Starling RC, et al.
Myocardial Ischemic-Fibrotic Injury After Human Heart Transplantation Is Associated With Increased Progression of Vasculopathy, Decreased Cellular Rejection and Poor Long-Term Outcome.
J Am Coll Cardiol. 2002;39(6):970-7
- [73] Zhuang YF, Corone-Alden S, Duval AM, et al.
Right Ventricular Late Filling Termination Time and Its Relation to Interstitial Collagen Content in Early Transplanted Heart: A Color M-mode Doppler Digital Analysis.
J Heart Lung Transplant. 1995;14(5):846-55

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anna Boni, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Veränderung des Interstitiums des Myokards nach Herztransplantation (Computerbasierte Mikroskopbildanalyse des interstitiellen Gewebes von Kontrollendomyokardbiopsien nach Herztransplantation) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Basel, den 28.12.13

Anna Boni

9. Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

10. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Promotionsarbeit Herrn Prof. Dr. R. Meyer für die Überlassung des Themas und für die zahlreichen Anregungen, seine beständige und zuverlässige Hilfe, Kritik und Geduld. Ohne die zeitintensive Betreuung wäre die Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Arbeitsbereiches Herzpathologie des DHZB für die jederzeit freundliche Unterstützung und kompetente Beratung.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Zoschke für Ihre bereitwillige Auskunft bedanken. Sie stand mir stets bei der Bearbeitung der Patientendateien zur Seite.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Spahn, dass er mir freundlicherweise seinen Arbeitsraum zeitweilig zur Verfügung stellte. Danken möchte ich auch Frau Rahmstorf für die Organisation der Teilnahme an der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Leipzig.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, auf deren Unterstützung und Verständnis ich mich jederzeit verlassen konnte.