

## **4. Patienten, Material und Methoden**

### 4.1 Studiendesign

Der vorliegenden Arbeit liegt eine unizentrische Pilotstudie zugrunde, die in Kooperation zwischen der Lipidambulanz des Interdisziplinären Stoffwechsel-Centrums der Charité Campus Virchow-Klinikum und der Abteilung Kardiale Magnetresonanztomographie an der Franz-Volhard-Klinik der Charité Campus Buch im Zeitraum September – Dezember 2004 durchgeführt wurde. Das Studienprotokoll wurde im Vorfeld der zuständigen Ethikkommission zur Begutachtung vorgelegt und genehmigt. Alle Maßnahmen, die in dieser Studie durchgeführt wurden, unterlagen den Regeln der „Good Clinical Practice“ (GCP-Leitlinien). Die Patienten wurden per Losverfahren randomisiert einer Untersuchungs- oder Kontrollgruppe zugeteilt. Zielgruppe dieser Studie waren Patienten mit Hyperlipoproteinämie(a), KHK und LDL-Cholesterinwerten  $< 130$  mg/dl unter stabiler Statintherapie. Dabei handelt es sich um eine seltene Konstellation, sodass nicht mehr Patienten rekrutiert werden konnten. In einer ähnlichen Studie an Patienten mit Hypercholesterinämie reichte diese Gruppengröße zur Erzielung eines statistisch signifikanten Ergebnisses aus [Mellwig, Baller, Gleichmann et al., 1998].

### 4.2 Patientenkollektiv

In die Studie wurden initial 25 Patienten eingeschlossen, davon entfielen auf die Untersuchungsgruppe 13 Männer und 1 Frau, auf die Kontrollgruppe 8 Männer und 3 Frauen. Die Patienten wurden über das Interdisziplinäre Stoffwechsel-Centrum der Charité Campus Virchow-Klinikum und die Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie der Charité Campus Virchow-Klinikum rekrutiert. Alle Patienten wiesen eine stabile KHK und neben der Erhöhung des Lp(a) keine weitere unbehandelte Fettstoffwechselstörung auf. Die Patienten wurden zum Zeitpunkt der Rekrutierung und im Verlauf der Studie mit Lipidsenkern in der von ihnen tolerierten Maximaldosierung zur Erreichung des Zielwertes für LDL-Cholesterin behandelt und hatten innerhalb der letzten 4 Wochen keine Lipidapherese erhalten. Alle beeinflussbaren Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit (z.B. arterielle Hypertonie) mussten optimal therapiert sein, um Wechselwirkungen weitgehend auszuschließen. Bei der Auswahl des Patientenkollektivs wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien berücksichtigt:

#### 4.2.1 Einschlusskriterien

- dokumentierte KHK (Koronarangiographie oder Elektronenstrahl-Computertomographie)
- Hyperlipoproteinämie(a) > 60 mg/dl
- kein Anhalt für Myokardischämie auf niedrigem Belastungsniveau (bis 75 Watt)
- schriftliche Einverständniserklärung

#### 4.2.2 Ausschlusskriterien

- Triglyceride > 200 mg/dl, HDL-Cholesterin < 30 mg/dl, LDL-Cholesterin > 130 mg/dl
- unbehandelter Diabetes mellitus Typ I oder II (HbA1c > 6,5%) , unbehandelter arterieller Hypertonus, Nikotinabusus
- Lipidapherese innerhalb der letzten 4 Wochen vor Studienbeginn
- Myokardinfarkt, PTCA, ACVB-Operation oder andere Revaskularisationsmaßnahmen innerhalb der letzten 2 Monate oder schwere/instabile Angina pectoris oder Hospitalisierung aufgrund anderer atherosklerotischer Manifestationen innerhalb eines Monats vor dem Screening; geplante chirurgische Eingriffe zur Behandlung der KHK
- höhergradige Blockierungen des Herzleitungssystems (AV-Block II. oder III. Grades), QT-Verlängerung, Sick-Sinus-Syndrom
- Patienten mit einem Herzschrittmacher
- Vorhandensein cerebraler Gefäßclips
- schwere Hypotension
- hämodynamisch relevante Herzklappenfehler
- Hämodialyse-Patient(in)
- Leberinsuffizienz
- dekompensierte Herzinsuffizienz und/oder Ejektionsfraktion < 30%
- chronisch obstruktive Lungenerkrankung mit Bronchospasmus (z.B. Asthma bronchiale)
- Schilddrüsenfunktionsstörungen
- schlechte periphere Venenverhältnisse
- gleichzeitige Therapie mit Dipyridamol
- Störungen der Blutgerinnung
- Neoplasmen

- schwerwiegende weitere Erkrankungen, welche die Überlebensprognose der Patienten wesentlich verschlechtern
- Heparinunverträglichkeit, thrombolytische Behandlung innerhalb der letzten 7 Tage
- HIV, Hepatitis B oder C
- bekanntes Ulcusleiden des Magen-Darm-Traktes
- zerebrale Blutung innerhalb der letzten 3 Monate
- Demenz
- weitere signifikante Abnormitäten, welche die Sicherheit des Patienten und dessen erfolgreiche Teilnahme an der Studie beeinträchtigen können
- Hinweise auf Non-Compliance des Patienten
- Missbrauch von Alkohol oder anderen Mitteln bzw. geringe mentale Fähigkeiten
- Studienteilnahme aktuell oder in den 30 Tagen vor dem Screening an einer anderen klinischen Prüfung
- Schwangerschaft oder Stillzeit

#### 4.3 Studienablauf

##### 4.3.1 Visite 1

Die Patienten wurden über Ziele, Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken der klinischen Prüfung informiert und aufgeklärt. Nach der schriftlichen Einverständniserklärung wurden die Patienten in die Studie aufgenommen und es erfolgten eine ausführliche Anamneseerhebung und körperliche Untersuchung mit Dokumentation von Körpergröße und Gewicht, Medikation, aktueller Symptomatik sowie Begleiterkrankungen. Anschließend wurden eine Blutentnahme inklusive Lipidstatus und rheologischen Parametern sowie eine Ergometrie zum Ausschluss einer belastungsinduzierten Ischämie auf niedrigem Belastungsniveau bis 75 Watt durchgeführt.

##### 4.3.2 Visite 2

Beim zweiten Visitermin, der mindestens 3 Tage nach Visite 1 stattfand, erhielten alle Teilnehmer nach einer Blutentnahme ein Kardio-MRT in der Charité Campus Buch.

Im Anschluss daran wurde wenige Stunden später bei Vorliegen stabiler Herz-Kreislaufverhältnisse in der Charité Campus Virchow-Klinikum nur bei den Patienten der Untersuchungsgruppe eine Lipidapherese nach dem Prinzip der Lipidfiltration (vgl. S. 22) durchgeführt. Nach der Lipidfiltration erfolgte eine erneute Blutentnahme bei den Patienten der Untersuchungsgruppe.

#### 4.3.3 Visite 3

Die Visite 3 fand 24 Stunden nach der Visite 2 in der Charité Campus Buch statt. Hierbei wurden nach Fragen zum Befinden und möglicherweise aufgetretenen Komplikationen die Blutentnahme und das Kardio-MRT in beiden Gruppen wiederholt.

#### 4.3.4 Visite 4

Bei Visite 4, die 96 Stunden nach der Visite 2 in der Charité Campus Buch stattfand, erhielten nur die Teilnehmer der Untersuchungsgruppe eine Blutentnahme sowie ein weiteres Kardio-MRT, wenn Wohlbefinden angegeben wurde und keine Komplikationen aufgetreten waren. In Tabelle 1 ist der Studienablauf der Untersuchungs- und Kontrollgruppe angegeben.

Tabelle 1: Studienablauf

Untersuchungsgruppe		Kontrollgruppe	
Visite V1	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anamnese</li> <li>▪ Klinische Untersuchung</li> <li>▪ Labor V1</li> <li>▪ Ergometrie</li> </ul>	Visite V1	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anamnese</li> <li>▪ Klinische Untersuchung</li> <li>▪ Labor V1</li> <li>▪ Ergometrie</li> </ul>
Visite V2	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Labor vor Apherese (V2.1)</li> <li>▪ Kardio-MRT</li> <li>▪ Apherese</li> <li>▪ Labor nach Apherese (V2.2)</li> </ul>	Visite V2	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Labor V2.1</li> <li>▪ Kardio-MRT</li> </ul>
Visite V3	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Labor V3</li> <li>▪ Kardio-MRT</li> </ul>	Visite V3	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Labor V3</li> <li>▪ Kardio-MRT</li> </ul>
Visite V4	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Labor V4</li> <li>▪ Kardio-MRT</li> </ul>	Visite V4	entfiel

#### 4.4 Untersuchungsverfahren

##### 4.4.1 Laborparameter

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Labordiagnostik erfolgte durch das Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité, Direktor Prof. Dr. med. Rudolf Tauber.

Die Laborproben für die Apo(a)-Genotypisierung wurden an die Universitätsklinik Innsbruck, Institut für Medizinische Biologie und Humangenetik, Leiter Prof. Dr. med. Kronenberg, gesandt.

Bei der Blutuntersuchung der Patienten wurden zu den einzelnen Visiten folgende Parameter bestimmt:

##### 4.4.1.1 Laborparameter bei Visite V1

<i>Lipide:</i>	Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride, Apolipoprotein B, Lipoprotein(a)
<i>Serum:</i>	Natrium, Kalium, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, Creatinkinase (CK), C-reaktives Protein (CRP), Aspartataminotransferase (AST), Gamma-glutamyltransferase (GGT), Lipase, Albumin, Gesamteiweiß, Plasmaviskosität
<i>Hämatologie:</i>	Blutbild
<i>Gerinnung:</i>	Quick, International Normalized Ratio (INR), partielle Thromboplastinzeit (PTT), Thrombinzeit (TZ), Fibrinogen, Antithrombin III
<i>Blutzucker:</i>	Glucose nüchtern und HbA1c
<i>Hormone:</i>	TSH basal, freies T3 (fT3), freies T4 (fT4)

Es erfolgte eine Nüchternabnahme von zwei 5 ml EDTA-Monovetten zur Bestimmung von Blutbild und HbA1c, von 5ml Citratblut zur Bestimmung von Quick, INR, PTT, TZ, Fibrinogen und Antithrombin III, einer 9 ml Serum-Monovette zur Bestimmung von TSH basal, fT3 und fT4 sowie einer 9 ml, mit Lithium-Heparin beschichteten Monovette zur Bestimmung aller weiteren Parameter inklusive Lipiden, Lp(a) und Apo B. Alle Laborparameter wurden am gleichen Tag in das Zentrallabor der Charité Campus Virchow-Klinikum geschickt und dort untersucht.

#### 4.4.1.2 Laborparameter bei Visite V2, V3 und V4

Lipide:	Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride, Apolipoprotein B, Lipoprotein(a) mit Genotypisierung von Apo(a) (nur 1x bei Visite V2.1), ApoE-Genotyp (nur 1x bei Visite V2.1)
Serum:	Natrium, Kalium, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, CK, CRP, AST, GGT, Lipase, Albumin, Gesamteiweiß, Plasmaviskosität, Homocystein
Hämatologie:	Blutbild
Gerinnung:	Quick, INR, PTT, TZ, Fibrinogen, Antithrombin III

Es erfolgte jeweils die Abnahme einer 5 ml EDTA-Monovette, einer 9 ml, mit Lithium-Heparin beschichteten Monovette sowie einer 5 ml Citratblut-Monovette für die Bestimmung o.g. Laborparameter. Zusätzlich wurden einmalig bei Visite V2.1 5 ml EDTA-Blut zur ApoE-Genotypisierung abgenommen. Die Untersuchung aller Parameter fand wiederum direkt nach der Blutabnahme im Zentrallabor der Charité Campus Virchow-Klinikum statt. Zur Genotypisierung von Apo(a) wurden einmalig bei Visite V2.1 nach Abnahme von 10 ml EDTA-Blut nach Zentrifugation drei Aliquots bei -20°C eingefroren. Nach Abschluss der Studie wurden die drei Aliquots tiefgefroren (auf Trockeneis gelagert) an die Universitätsklinik Innsbruck, Institut für Medizinische Biologie und Humangenetik gesandt. Die Blutentnahme bei Visite V2.2 bei allen Patienten der Untersuchungsgruppe war direkt nach Beendigung der Apherese aus der liegenden arteriellen Punktionsnadel möglich.

Die Werte für Lp(a), Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride, die Plasmaviskosität sowie die ApoE-Genotypisierung und Apo(a)-Genotypisierung sind nach folgenden Methoden bestimmt worden:

*Lipoprotein(a):* Lp(a) wurde mit einem turbidimetrischen Trübungstest mit Latexreagens der Firma Biokit, Barcelona, Spanien, analysiert.

*Gesamtcholesterin:* Die Messung des Gesamtcholesterins aus dem Plasma erfolgte am Roche Modular Analyzer der Firma Roche mit einem enzymatischen Farbttest der Firma Roche, Basel, Schweiz.

*LDL-Cholesterin:* Das LDL-Cholesterin wurde nach der Bestimmung von Gesamtcholesterin, Triglyceriden und HDL-Cholesterin mit der Friedewaldformel berechnet [Friedewald, Levy & Fredrickson, 1972]:

---

$$\text{LDL-Cholesterin} = \text{Gesamtcholesterin} - \text{HDL-Cholesterin} - \frac{\text{Triglyceride.}}{5}$$

Diese Formel ist jedoch nur bei Triglyceriden  $\leq 400$  mg/dl anwendbar.

*HDL-Cholesterin:* HDL-Cholesterin wurde am Roche Modular Analyzer durch ein homogenes photometrisches Testverfahren mittels Immuninhibition und Farbstest der Firma Wako, Richmond, Virginia, USA, ermittelt.

*Triglyceride:* Die Triglyceride wurden am Roche Modular Analyzer mit einem enzymatischen Farbstest der Firma Roche, Basel, Schweiz, bestimmt.

*Apo B:* Apo B wurde am Roche Modular Analyzer mit dem immunturbidimetrischen Testkit (Tina-quant) der Firma Roche, Basel, Schweiz, untersucht.

*Apolipoprotein E-Genotypisierung:* der Apolipoprotein E-Genotyp wurde mittels Polymerasekettenreaktion und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus bestimmt.

*Apo(a)-Genotypisierung:* die Darstellung der verschiedenen Apo(a)-Isoformen wurde mittels Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese durchgeführt, gefolgt von einem Transfer der Proteine auf eine Membran und Sichtbarmachen durch Immunodetektion mit monospezifischen Anti-Apo(a)-Antikörpern (AK 1A2). Zusätzlich erfolgte die Darstellung des Apo(a)-Größenpolymorphismus nicht nur auf Protein-, sondern auch auf der DNA-Ebene. Dazu wurde genomische DNA aus Blut isoliert und anschließend mit einer passenden Restriktionsendonuklease verdaut. Anschließend wurde die geschnittene genomische DNA der Größe nach in einer Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran durch Southern blotting transferiert. Mittels einer Apo(a)-spezifischen Sonde konnten die DNA-Fragmente, die die repetitiven Kringel enthalten, sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, die Anzahl der Kringel IV-Wiederholungen in jedem Apo(a)-Allel genau zu bestimmen.

*Plasmaviskosität:* Die Messung fand mit dem Rheomed Viscosimeter der Firma Rheomed, Heppenheim, Deutschland, statt. Hierbei wurde ein Plasmabolus durch eine Messkappilare gedrückt und anhand der Durchlaufgeschwindigkeit durch einen Mikroprozessor die dynamische Viskosität (Einheit mPa\*sec) berechnet.

Alle anderen Laborparameter sind nach Standardmethoden untersucht worden.

Nachfolgend sind die Referenzbereiche einiger relevanter Laborparameter angegeben (Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité):

Lipoprotein(a):	< 30 mg/dl
Fibrinogen:	150 – 450 mg/dl
Plasmaviskosität:	1,14 - 1,34 mPa*sec
Hämatokrit:	Männer 0,40 – 0,52 l/l, Frauen 0,35 – 0,47 l/l

Für die Parameter Gesamtcholesterin, LDL-, HDL-Cholesterin und Triglyceride werden keine Referenzbereiche angegeben, da die Zielwerte vom individuellen Risikoprofil abhängig sind.

### 4.4.2 Fahrradergometrie

Die Belastung erfolgte standardisiert in sitzender Position, wobei die Belastung bei 25 Watt begonnen und alle zwei Minuten um 25 Watt gesteigert wurde. Nach zweiminütiger Belastung bei 75 Watt wurde die Ergometrie beendet. Es wurden in Ruhe sowie während und nach fahrradergometrischer Belastung ein 12-Kanal-EKG abgeleitet und alle zwei Minuten der Blutdruck gemessen.

### 4.4.3 Kardiale Magnetresonanztomographie (Kardio-MRT)

#### 4.4.3.1 Untersuchungsvorbereitung

Die Patientenaufklärung erfolgte im Vorfeld der Untersuchung anhand eines standardisierten Aufklärungsbogens, zudem wurde direkt vor der MRT-Untersuchung ein persönliches Arzt-Patientengespräch durchgeführt. Die Patienten wurden auf die Besonderheiten der Untersuchungsmethode, auf mögliche Risiken der Kernspinuntersuchung sowie auf Nebenwirkungen der verwendeten Diagnostika und Medikamente hingewiesen. Die Atemmanöver wurden erklärt und geübt. Mindestens 12 Stunden vor der MRT-Untersuchung durften keine xanthinhaltigen Nahrungsmittel und Getränke (Tee, Kaffee, Schokolade und Colagetränke) konsumiert worden sein. Auch die medikamentöse Einnahme von Aminophyllin oder Theophyllin innerhalb der letzten 24 Stunden vor der MRT-Untersuchung wurde pausiert. Die Patienten wurden in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch gelagert und zwei venöse Zugänge in den Kubitalvenen angelegt. Bei allen Patienten wurden kontinuierlich Blutdruck und EKG überwacht und unter Ruhe- und Adenosinbedingungen dokumentiert. Über eine Pulsoxymetrie wurde die arterielle Sauerstoffsättigung des Blutes gemessen. Alle Patienten trugen einen Gehörschutz. Über Kopfhörer und ein integriertes Mikrofon fand die Kommunikation zwischen Untersucher und Patient statt.

Die Patienten erhielten zudem eine Notklingel. Während der gesamten Messzeit war ärztliches Personal im Untersuchungsraum; eine Notfallausrüstung wurde vorgehalten.

#### 4.4.3.2 MR-Protokoll und Details der verwendeten Pulssequenzen

Die Untersuchung der First Pass-Perfusion erfolgte an einem 1,5 Tesla-MRT-Scanner (Sonata, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) unter Verwendung einer 8-Kanal phased-array Thorax-Oberflächenempfangsspule. Die Untersuchung gliederte sich in folgende, bei jeder Visite identische Schritte:

- dreidimensionaler Localizer des Thorax
- Bestimmung der linksventrikulären Funktion (LV-Funktion)
- First Pass-Perfusion unter Adenosin-Belastung
- 20-minütige Pause (Patient verblieb in unveränderter Lage im Tomographen)
- First Pass-Perfusion unter Ruhebedingungen

##### 4.4.3.2.1 Localizer

Unter Einsatz einer Steady-State Free Precession (SSFP)-Sequenz wurden atemangehalten und EKG-getriggert drei orthogonale Schichtgruppen à drei Schichten akquiriert. Sequenzparameter:

Schichtdicke 8 mm, Schichtabstand 8 mm, Field of view (FOV) maximal 400 x 400, Matrix 192 x 144, Repetitionszeit (TR) 2,4 ms, Echozeit (TE) 1,04 ms, Flip-Winkel (FA) 65°.

##### 4.4.3.2.2 Linksventrikuläre Funktion

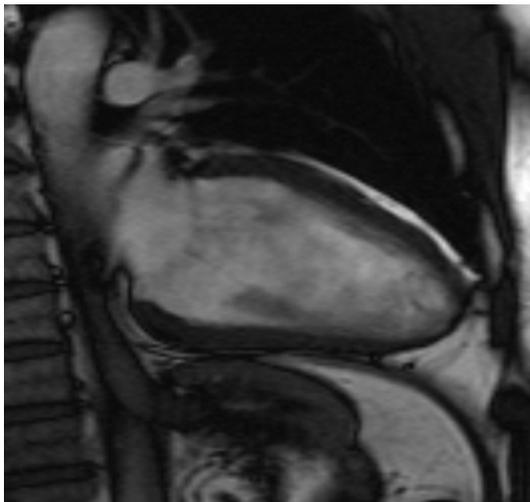
Es wurden der linksventrikuläre Zweikammerblick (siehe Abb. 5a), Dreikammerblick sowie Vierkammerblick (siehe Abb. 5b) nach einem Standardprotokoll dargestellt. Zudem erfolgten die lückenlose Darstellung des linken Ventrikels in Kurzachsenorientierung (erste Schicht auf Höhe des Mitralklappenrings, letzte Schicht direkt außerhalb der linksventrikulären Spitze) sowie dreier additiver kurzer Achsen (basal, apikal, midventrikulär; siehe Abb. 5c-e) [Cerqueira, Weissmann, Dilsizian et al., 2002]. Die drei zusätzlichen kurzen Achsen wurden als Referenzschnittebenen für die First Pass-Perfusion definiert. Die Positionierung aller Schichtebenen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll, um eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten [Messroghli, Bainbridge, Alfakih et al., 2005].

Die LV-Funktion wurde mit einer EKG-getriggerten, dynamischen cine SSFP-Pulssequenz unter Atemanhaltebedingungen mit folgenden Parametern bestimmt:

TR 20 ms, TE 1,2 ms, FA 80°, Matrix 256 x 146, field of view (FOV) 340 x 340 mm, Pixel-Grösse 1,3 x 2,3 mm, Bandbreite 930 Hertz/Pixel, Schichtdicke 8 mm, Schichtabstand im Kurzachsenpaket 0 mm.

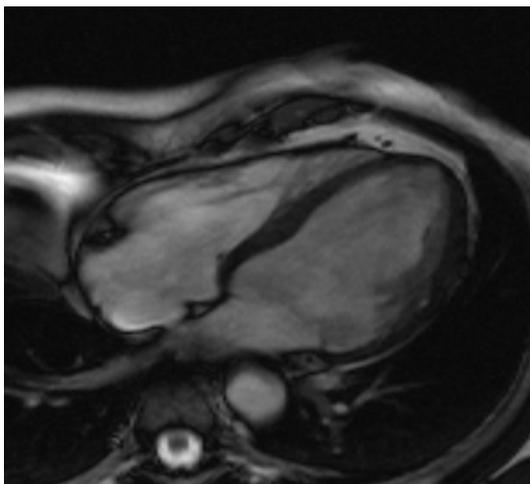
Abb. 5: MRT-Schnittbilder

Abb. 5a: Zweikammerblick



Die Abbildung zeigt eine typische diastolische Aufnahme in Zweikammerblick-Orientierung, akquiriert in cine-SSFP-Technik. Linker Vorhof und linker Ventrikel sind in sagittal-koronaler Bildebene dargestellt.

Abb. 5b: Vierkammerblick



Die Abbildung zeigt einen Vierkammerblick in der Diastole, akquiriert mittels Cine-SSFP-Technik (Schichtdicke 10 mm). Vorhöfe und Ventrikel sind in sagittal-koronaler Bildebene dargestellt.

Abb. 5c: Perfusion basal

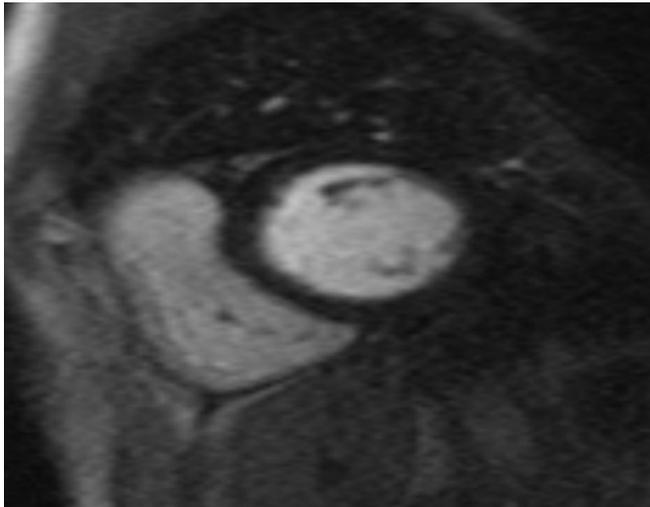


Abb. 5d: Perfusion midventrikulär

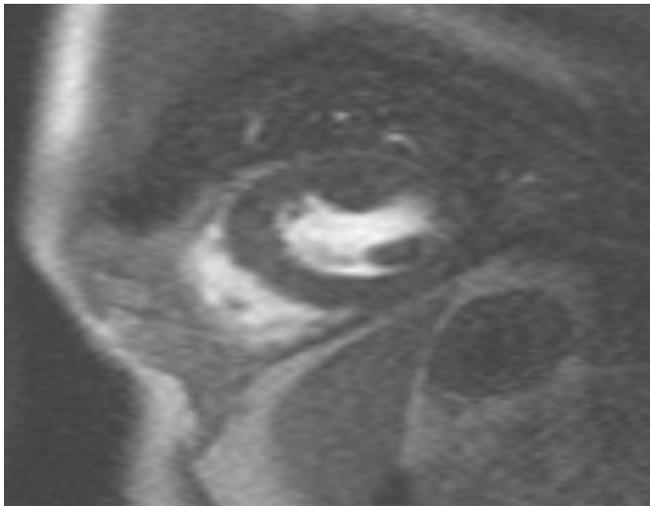
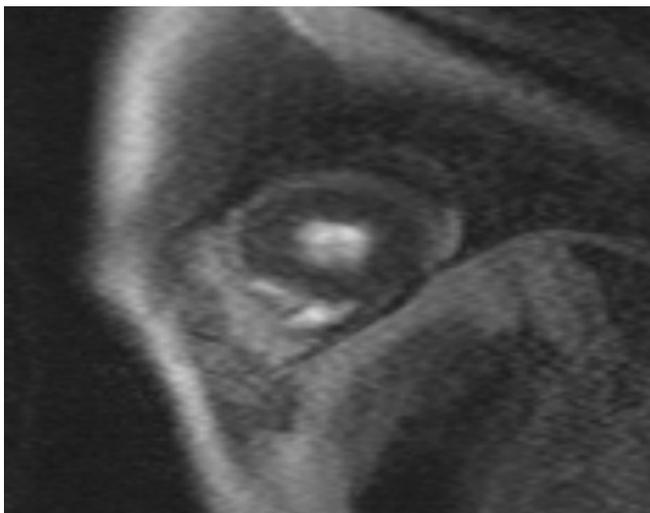


Abb. 5e: Perfusion apikal



Die Abbildungen 5c-e zeigen drei Kurzachsenbilder (basal, midventrikulär und apikal) während der First Pass-Stressperfusion (EKG-getriggert, atemangehalten, saturation recovery FLASH gradient echo) unter adenosinvermittelter maximaler Vasodilatation.

### 4.4.3.2.3 First Pass-Perfusion

Es wurden die drei oben spezifizierten Schichten in Kurzachsenorientierung pro Herzzyklus unter Verwendung einer EKG-getriggerten saturation-recovery FLASH (Fast Low Angle Shot)-Gradientenecho-Sequenz (mit Parallel Imaging: GRAPPA = generalized autocalibrating partially parallel acquisition) unter Atemhaltebedingungen akquiriert.

Sequenzparameter:

FOV 240 x 320 mm, Matrix 144 x 192, durchschnittliche Pixelgröße 2,5 x 2,1 mm, Schichtdicke 10 mm, TE 1,25 ms, TR abhängig von der Herzfrequenz, FA 12°.

Die First Pass-Stressperfusion wurde unter kontinuierlicher intravenöser Infusion von Adenosin (140mcg/kg Körpergewicht) über 5 Minuten verabreicht. Nach 3 Minuten erfolgte eine automatisierte Injektion von 0,1mmol/kgKG Gd-DTPA (Magnevist®, Schering AG, Berlin, Deutschland) bei einer Injektionsrate von 6ml/sec, gefolgt von 20ml Spülung mit 0,9%-iger NaCl-Lösung mit identischer Injektionsrate. Anschließend erfolgte eine Untersuchungspause für 20 min, in der die Studienteilnehmer in unveränderter Lagerung im Magnetresonanztomographen verblieben. Zuletzt wurde die Ruhe-Perfusion nach identischem Protokoll ohne Infusion von Adenosin durchgeführt.

### 4.4.3.3 Postprocessing bzw. Bildanalyse

#### 4.4.3.3.1 Berechnung der linksventrikulären Funktion

Die Berechnung der linksventrikulären Funktionsparameter erfolgte auf der integrierten Auswertekonzole des MR-Scanners mit Hilfe der ARGUS-Software (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland). Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV), Schlagvolumen (SV) und linksventrikuläre Muskelmasse (LVM) wurden aus dem SSFP-Kurzachsenpaket auf Grundlage der Simpson-Methode berechnet [Chapman, Baker, Reynolds et al., 1985]. Die Grenzflächen zwischen intraventrikulärem Blut und Myokard sowie zwischen Myokard und Epikard wurden manuell konturiert. Dieser Vorgang wurde für jede Schicht sowohl in der endsystolischen als auch in der enddiastolischen Phase durchgeführt, sodass sich aus den endokardialen Markierungen endsystolisches und enddiastolisches linksventrikuläres Volumen (LVESV, LVEDV) sowie aus der Differenz zwischen endo- und epikardialer Markierung das Myokardvolumen ergab. Aus der Differenz zwischen enddiastolischem und endsystolischem LV-Volumen wurde das Schlagvolumen (SV) bestimmt:

$SV \text{ in ml} = LVEDV - LVESV.$

Die Ejektionsfraktion errechnet sich aus dem Verhältnis zwischen dem Schlagvolumen und dem enddiastolischen LV-Volumen und entspricht dem prozentualen Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen LV-Volumen:

$$\text{EF in \%} = 100 \times (\text{LVEDV} - \text{LVESV}) / \text{LVEDV}$$

Mit Kenntnis der Herzfrequenz (HF) konnte daraus das Herzminutenvolumen (Cardiac Output = CO) bestimmt werden:

$$\text{Cardiac Output in l/min} = \text{SV} \times \text{HF}$$

Zur Bestimmung der linksventrikulären Myokardmasse (in g) wurde in der enddiastolischen Phase die Differenz zwischen dem epikardialen und endokardialen Ventrikelvolumen ermittelt und dieses mit dem spezifischen Gewicht von Myokard (1,05 g/ml) multipliziert.

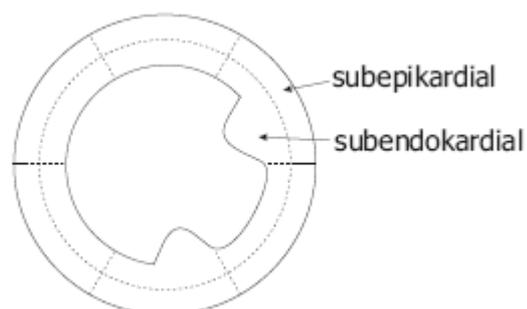
$$\text{Linksventrikuläre Myokardmasse (LVM)} = \text{myokardiales Volumen (in ml)} \times 1,05 \text{ g/ml.}$$

#### 4.4.3.3.2 Semiquantifizierung der myokardialen First Pass-Perfusion

Die Daten wurden auf eine separate Auswertekonsole übertragen. Das Postprocessing erfolgte mit der Software Mass Version 6 (Medis, Leiden, Niederlande). Die Myokardperfusion der drei kurzen Achsen (apikal, basal, midventrikulär) wurde bei jeder Visite getrennt für Adenosin- und Ruhebedingungen ausgewertet. Da die adenosinvermittelte Vasodilatation in Subendokard und Subepikard aufgrund der differentiellen Prädilatation unterschiedlich ausgeprägt sein kann, wurden sowohl Ruheperfusion als auch die Responsivität auf Adenosin im Rahmen der Stressuntersuchung getrennt für Subendokard und Subepikard erfasst. Um die intraindividuelle Dynamik für beide Myokardanteile nach Lipidapherese in einem integrativen Parameter zu beschreiben, erfolgte die Bildung einer Ratio aus EER-Ruhe und EER-Stress (EER-Stress/EER-Ruhe). Die Auswertung wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

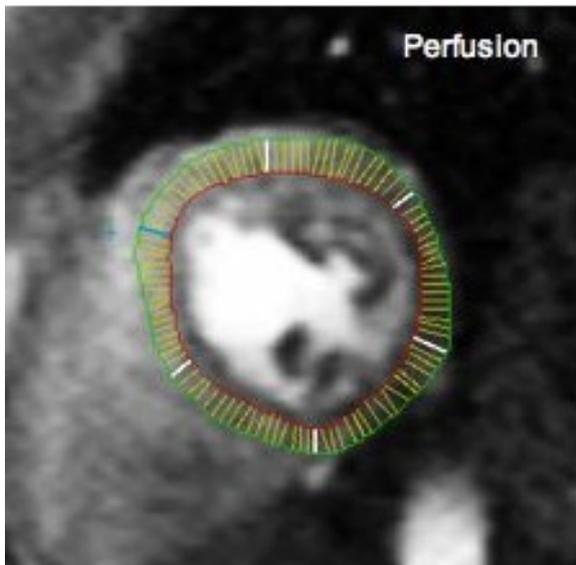
- visuelle Beurteilung der Bildqualität hinsichtlich Artefaktüberlagerung, Fehltriggerung, atemanhängiger Partialvolumeneffekte etc. für jede Schicht; war eine diagnostische Bildqualität nicht gegeben, wurde die betreffende Schicht von der weiteren Analyse ausgeschlossen.
- manuelles Einzeichnen der endokardialen und epikardialen Myokardgrenzen und Zuordnung der Schichten nach einem standardisierten Segmentmodell [Cerqueira, Weissman, Dilsizian et al., 2002]; die anteriore Insertionsstelle des rechten Ventrikels (RV) diente dabei als Referenzpunkt (siehe Abbildung 7).
- Erstellung von Signalintensitäts-Zeit-Kurven (SI/t) für jedes myokardiale Segment (siehe Abbildung 8a) + 8b))
- Durchführung einer baseline-Korrektur, bei der alle myokardialen post-Kontrast-Werte durch die prä-Kontrast-Werte dividiert wurden, um Inhomogenitäten der phased-array-Oberflächenempfangsspule zu korrigieren
- Berechnung der Anstiegssteilheit der Signalintensität/Zeit aus den linearen Anteilen des Graphen mittels eines software-immanenten fitting-Verfahrens und Angabe als „absolute upslope“ (AU)
- Ermittlung der Mittelwerte der AU aller Segmente getrennt nach Schichten
- Trennung des Myokards mittels der Mass-Software in die subendokardiale versus subepikardiale Hälfte und Berechnung der absolute upslopes für die subendokardialen sowie subepikardialen 50% des Myokards ( siehe Abb. 6)
- Bildung der Endo-/Epi-Ratio (EER)
- Erfassung der intraindividuellen Dynamik der EER unter Adenosin versus Ruhe in der Ratio EER-Stress/EER-Ruhe (EER-S/R)

Abb. 6: Darstellung der subendo- und subepikardialen Hälfte der linksventrikulären Wand



Die Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung der Trennung in subendo- versus subepikardiale Hälfte der LV-Wand.

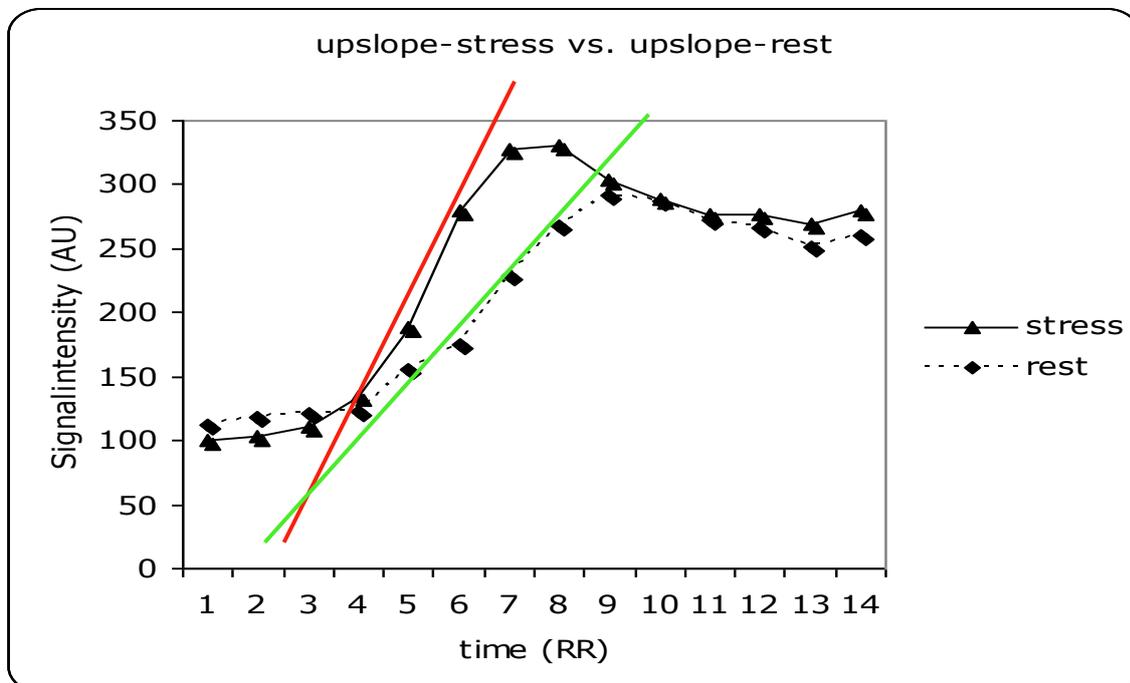
Abb. 7: Myokardiale Segmentation



In Abb. 7 ist ein „Screenshot“ der Auswertesoftware dargestellt (MASS, Medis™, Leiden, Niederlande) mit Segmentation des Myokards in 6 äquianguläre Segmente; Darstellung der Perfusion. Die Insertionsstelle des rechten Ventrikels dient jeweils als Referenzpunkt (blau).

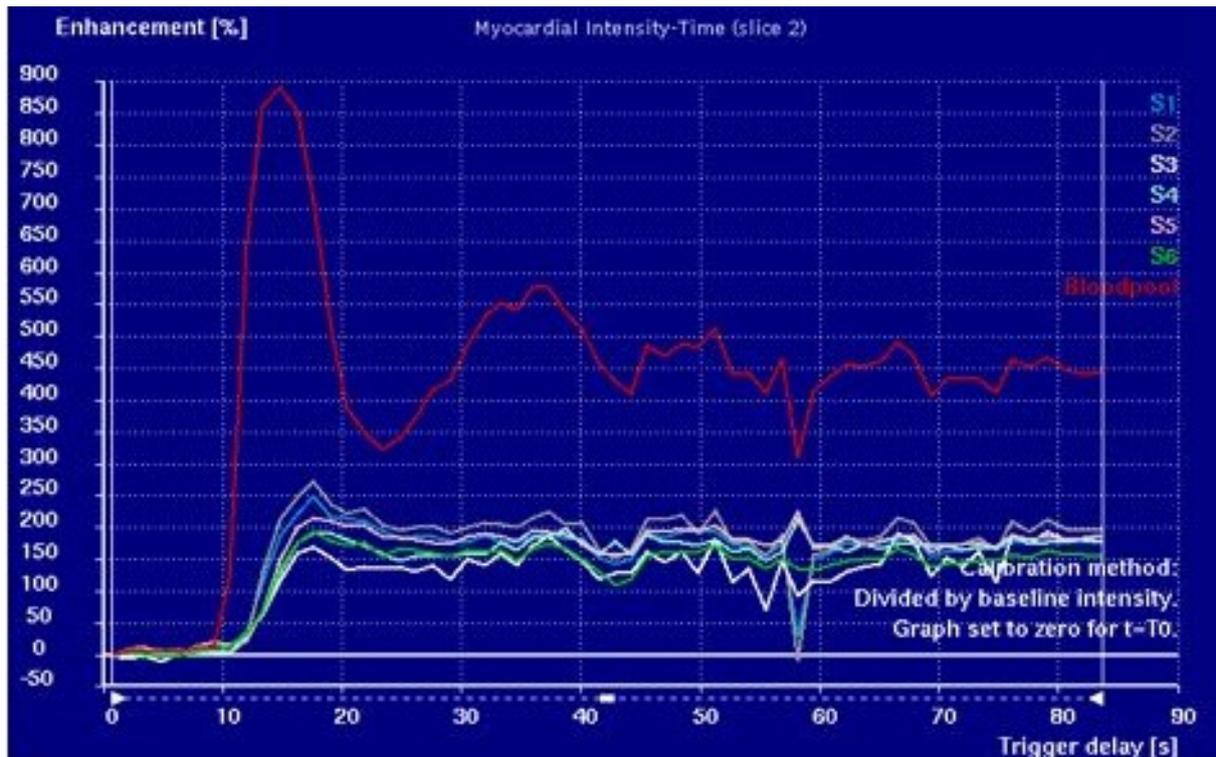
Abb. 8: Signalintensitäts-/Zeitkurven der myokardialen Perfusion

Abb. 8a) Exemplarische Signalintensitäts-/Zeitkurve



Die Abbildung 8a) stellt eine exemplarische Signalintensitäts-/Zeitkurve der myokardialen First Pass-Perfusion von 0,1mmol/kg Körpergewicht Gadolinium-DTPA dar. X-Achse: Zeit (time) in Herzzyklen (RR); Y-Achse: Signalintensität in arbitrary units (AU). Geraden: linearer Fit der Anstiegssteilheit, grün: Ruhe (rest); rot: Adenosinstress (stress)

Abb. 8b): Typische Signalintensitäts-/Zeitkurve für sechs Myokardsegmente



Die Graphik stellt eine typische Signal-Zeit-Analyse für die 6 Segmente dar (farbkodiert Segment 1-6). Zudem ist die Einwaschkinetik des Kontrastmittels in der LV-Höhle abgebildet (rot).

#### 4.4.4 Lipidfiltration

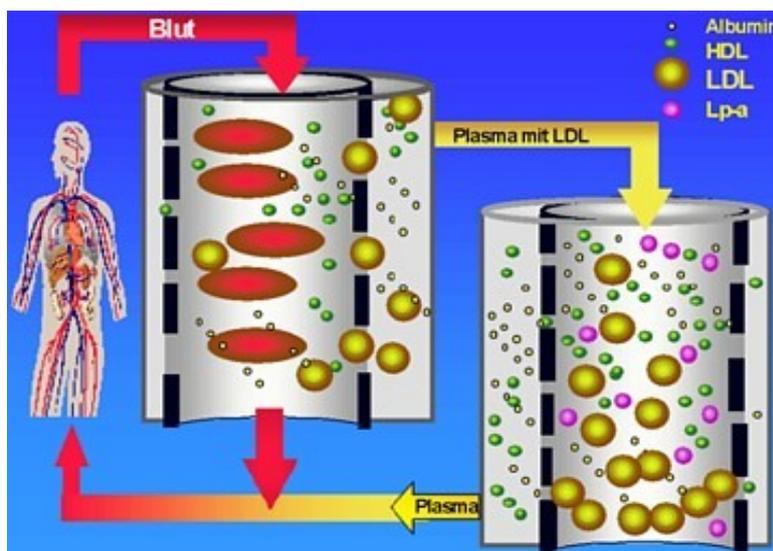
In Abbildung 9 ist das Prinzip der Lipidfiltration schematisch dargestellt. Das Blut wurde einer Kubitalvene des Patienten entnommen und mit Hilfe einer Blutpumpe durch den Plasmaseparator gefördert (Plasmaflo® der Firma Asahi Medical, Tokyo, Japan). In einem ersten Schritt erfolgte die Trennung des Blutes in Plasma und zelluläre Bestandteile. Die zellreiche Komponente wurde über die venöse Kammer und eine zweite, am anderen Arm liegende Kubitalvene dem Patienten direkt zurückgegeben, das gewonnene Plasma dann mittels einer zweiten Pumpe über eine vorgeschaltete Heizung in den Lipidfilter eingeleitet. In diesem Filter wurden hochmolekulare Substanzen mit einem Durchmesser von 25 bis 40 nm, wie LDL-Cholesterin, Lipoprotein(a) und Triglyceride, zurückgehalten, während kleinere Proteine den Filter ungehindert passieren konnten. Anschließend wurde das gereinigte Plasma dem Patienten über die zweite Infusionsnadel gemeinsam mit den zellulären Bestandteilen zurückgegeben.

Zur Antikoagulation wurde Heparin initial als Bolus von 5000 IE und nachfolgend kontinuierlich intravenös mit 3000 IE/h verabreicht.

Die Durchführung der Lipidapherese erfolgte mit dem Gerätetechniksystem „Octo Nova“ der Firma Diamed Medizintechnik GmbH, Köln, Deutschland. Der Verlust von HDL-Cholesterin und anderen hochmolekularen Proteinen wie z.B. Immunglobulinen konnte hierbei durch den Einsatz eines vollsynthetischen Lipidfilters EC-50 (Asahi Medical, Tokyo, Japan) deutlich verringert werden. Dieser zeichnet sich im Vergleich zu früher angewandten Filtern durch eine verbesserte Trenncharakteristik bei kleinerem Füllvolumen und größerer Oberfläche aus. Durch die Einführung des Gerätesystems Octo Nova wurde die Filtration ferner bei einer Temperatur von 38,5°C ermöglicht. Daraus resultiert eine verbesserte Filtrationsleistung aufgrund der bei höherer Temperatur herabgesetzten Viskosität. Pro Behandlung wurde 3000 ml Plasma prozessiert.

Die Therapie dauerte je nach Blut- und Plasmafluss im Mittel zwei Stunden.

Abb. 9: Prinzip der Lipidfiltration



Das Blut wird über einen Plasmaseparator geleitet und in Plasma und zelluläre Bestandteile getrennt. Das Plasma wird anschließend durch den Lipidfilter geleitet. Hochmolekulare Substanzen wie LDL, Lp(a) und Fibrinogen werden zurückgehalten, während kleinere Moleküle wie Albumin den Filter ungestört passieren können. Das so gereinigte Plasma wird wieder mit den Blutzellen vereinigt und dem Patienten zurückgegeben [Klingel, Mausfeld, Fassbender et al., 2004].

#### 4.5 Statistische Berechnung

Die einzelnen Variablen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Abweichungen von der Normalverteilung geprüft. Da keine signifikanten Abweichungen auftraten, erfolgte eine Analyse aller Werte mittels parametrischer Inferenzstatistiken.

Für den Vergleich der Ausgangswerte bei Visite V1 sowie den Vergleich der Werte der Nachuntersuchung (Visite V4) zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe kam der t-Test zur Anwendung. Da die Richtung des potentiellen Mittelwertunterschiedes hypothesengeleitet vorgegeben war, wurden einseitige Signifikanzwerte berechnet. Neben der Verwendung im Gruppenvergleich wurden die gleichen Werte auch für die Analyse des Zeitverlaufs verwendet, dementsprechend wurden die p-Werte für multiples Testen nach der Bonferroni-Methode korrigiert.

Da in der Kontrollgruppe die Studie nur zwei Visitermine (Visite V2 und V3) vorsah, kam für beide Gruppen der paarweise t-Test für die Analyse von Unterschieden zwischen Visite V2 und V3 zur Anwendung. Innerhalb der Untersuchungsgruppe mit mehreren Visiterminen wurden zusätzlich in einer ANOVA (analysis of variance) mit Messwertwiederholung die Kontraste der einzelnen Nachuntersuchungen gegenüber dem Ausgangswert auf Signifikanz geprüft. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Daten in den Tabellen wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung oder in Prozent angegeben; die graphische Darstellung erfolgte als Boxplot.