

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin
STIFTUNG BÜRGERLICHEN RECHTS

DISSERTATION

Vergleichende histomorphometrische Analyse des interstitiellen Herz-
gewebes nach Herztransplantation.

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie Barabasch (geb. Kretschmer)

aus Riesa

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	3
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....	4
Zusammenfassung.....	8
1 Vorbemerkung zur Herztransplantation	11
2 Einführung.....	14
2.1 Kollagene Fasern im Myokard	14
2.2 Die Dialektik des interstitiellen Gewebes im Myokard.....	15
2.3 Veränderungen der histologischen Myokardstruktur nach HTx	16
3 Zielstellung.....	21
4 Studienpopulation	23
5 Material und Methoden.....	25
5.1 Probengewinnung und histologische Aufbereitung.....	25
5.2 Histomorphometrische Messungen	27
5.3 Erhebung weiterer histologischer Parameter	29
5.4 Statistische Auswertung	31
6 Ergebnisse	31
6.1 Messbare Gewebeschnitte für Fibrose, Kollagen Typ III und IV	31
6.2 Quantitative Messungen im Verlauf nach HTx.....	32
6.2.1 <i>Fibrose</i>	33
6.2.2 <i>Kollagen Typ III</i>	35
6.2.3 <i>Kollagen Typ IV</i>	36
6.3 Vergleich der dargestellten Strukturen	37
6.3.1 <i>Vergleich von Fibrose und Kollagen Typ III</i>	37
6.3.2 <i>Gegenüberstellung aller drei Parameter</i>	38
6.4 Vergleich der histomorphometrischen Ergebnisse anhand des Alters	40
6.4.1 <i>Beziehung zwischen Empfänger- und Spenderalter</i>	40
6.4.2 <i>Altersstruktur der Studienpopulation zum Zeitpunkt der HTx</i>	44
6.5 Abhängigkeit von der spenderinduzierten Beschaffenheit der EZM	50
6.6 Abhängigkeit von der Ischämiezeit bei HTx.....	53
6.7 Abhängigkeit von Abstoßungsreaktionen	57
6.7.1 <i>Zelluläre Abstoßung</i>	57
6.7.2 <i>Humorale Abstoßung</i>	64

6.8 Abhängigkeit von morphologischen Befundergebnissen	68
6.8.1 Morphologie der Myozyten	68
6.8.2 Morphologie des Gefäßendothels	71
6.8.3 Mikrovaskulopathie	73
6.9 Lineares Regressionsmodell	74
7 Diskussion	77
7.1 Diskussion von Material und Methodik	77
7.2 Diskussion der Ergebnisse	79
7.2.1 Verlauf der dargestellten interstitiellen Strukturen in fünf Jahren nach HTx	79
7.2.1.1 Gesamtfibrose	79
7.2.1.2 Kollagen Typ III und IV	81
7.2.1.3 Geschlecht und Überlebensstatus	84
7.2.2 Möglicher Einfluss des Alterns	84
7.2.3 Mögliche Einflussfaktoren auf die Dynamik von Gesamtfibrose, Kollagen Typ III und IV	87
7.2.3.1 Spenderinduzierte Ausgangsbedingungen bei HTx	87
7.2.3.2 Ischämiedauer	89
7.2.3.3 Zelluläre und humorale Abstoßungsreaktionen	90
7.2.3.4 Kardiomyozytenhypertrophie	92
7.2.3.5 Veränderungen der Endothelzellen	93
7.2.3.6 Veränderungen der terminalen Gefäße	94
7.2.3.7 Regressionsmodell	94
7.2.3.8 Immunsuppression	95
7.2.4 Klinische Relevanz der quantitativen Veränderungen nach HTx	96
7.2.4.1 Bisherige Hypothesen	96
7.2.4.2 Echokardiografische Parameter zur Überprüfung der klinischen Relevanz	97
8 Limitationen	98
8.1 Statistische Power	98
8.2 Bedeutung von Kollagen Typ I	99
8.3 Definition einer Vergleichsgruppe	99
9 Schlussfolgerungen	103
Literaturverzeichnis	107
Anhang	124
Eidesstattliche Versicherung	133
Lebenslauf	134
Publikationen	136
Danksagung	141

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACR	acute cellular rejection – akute zelluläre Abstoßung
AMR	antibody-mediated rejection – akute antikörpervermittelte/ humorale/ vaskuläre Abstoßung
BM	Basalmembran
Bx	Biopsie
CyA	Cyclosporin A
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
EMB	Endomyokardbiopsien
EZM	extrazelluläre Matrix
FU	Follow Up
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMZ	Herzmuskelzellen
HTx	Herztransplantation
HLA	Human Leukocyte Antigen
IMEG	intramyokardiales Elektrokardiogramm
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
IVUS	intravaskulärer Ultraschall
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMF	Mycophenolat Mofetil
µm	Mikrometer
mm ²	Quadratmillimeter
µm ²	Quadratmikrometer
MVP	Mikrovaskulopathie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Patienten
ns	nicht signifikant
Null Bx	Null Biopsie
p	Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$)
PINP	Procollagen I
PIIINP	Procollagen III
RV	rechter Ventrikel

RV-EMB	rechtsventrikuläre Endomyokardbiopsien
SA	Standardabweichung
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinasen – Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen
TVP	Transplantatvaskulopathie

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1:	Veränderungen des interstitiellen Myokards und der Morphologie von Herzmuskelzellen nach HTx	17
Tabelle 2:	Patientenpopulation (n = 78)	24
Tabelle 3:	Anzahl der Biopsien pro FU	26
Tabelle 4:	Anzahl der messbaren Biopsien für Fibrose, Kollagen Typ III und IV pro FU	32
Tabelle 5:	Anzahl der in die Statistik eingegangenen Gewebeproben pro FU	32
Tabelle 6:	mittlerer Gehalt von Fibrose (%) innerhalb des Normbereiches ($\leq 9\%$) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	33
Tabelle 7:	Einteilung der Studienpopulation anhand der Differenz zum Spenderalter	40
Tabelle 8:	Einteilung der Studienpopulation anhand des Alters bei HTx	45
Tabelle 9:	mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose, Kollagen Typ III und IV (%) in Abhängigkeit von den Ausgangsbedingungen bei HTx (Null Biopsie)	50
Tabelle 10:	nachgewiesene zelluläre Abstoßungsreaktionen pro FU	58
Tabelle 11:	nachgewiesene antikörpervermittelte Abstoßungsreaktionen pro FU	65
Tabelle 12:	Signifikanz der Unterschiede zwischen dem mittleren Gehalt von Gesamtfibrose und Kollagen Typ III in Abhängigkeit von einer Herzmuskelzellvergrößerung	71
Tabelle 13:	Morphologie des Endothels in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	72
Tabelle 14:	Anteil der Einflussfaktoren an Veränderungen des mittleren Gesamtgehaltes von Fibrose, Kollagen Typ III und IV	75
Tabelle 15:	individueller Beitrag der Einflussfaktoren zu Veränderungen des mittleren Gesamtgehaltes von Fibrose, Kollagen Typ III und IV	76
Tabelle 16:	Kontrollgruppen in Studien zum myokardialen Interstitium im postoperativen Verlauf nach HTx	101
Abbildung 1:	Kollagen Typ III	27
Abbildung 2:	Kollagen Typ IV	27
Abbildung 3:	Schnitteinstellung	28

Abbildung 4: Anlernphase.....	28
Abbildung 5: Segmentierungsphase	28
Abbildung 6: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose, reiner Fibrose und Narbengewebe (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	34
Abbildung 7: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4).....	35
Abbildung 8: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4).....	36
Abbildung 9: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit vom Geschlecht in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	37
Abbildung 10: Verhältnis von Kollagen Typ III im Vergleich zur Gesamtfibrose in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4; $p = 0,029$).....	38
Abbildung 11: Variationskoeffizienten für die Mittelwerte von Gesamtfibrose, Kollagen Typ III und IV (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4).....	39
Abbildung 12: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in Abhängigkeit von der Altersdifferenz zwischen Transplantatempfänger und -spender in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	41
Abbildung 13: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in Abhängigkeit von der Altersdifferenz zwischen Transplantatempfänger und -spender in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	43
Abbildung 14: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit von der Altersdifferenz zwischen Transplantatempfänger und -spender in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	44
Abbildung 15: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in Abhängigkeit vom Patientenalter bei HTx in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	46
Abbildung 16: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in Abhängigkeit vom Patientenalter bei HTx in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	48
Abbildung 17: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit vom Patientenalter bei HTx in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	49
Abbildung 18: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in fünf Jahren post HTx in Abhängigkeit von der Ischämiezeit (Null Bx bis FU 4).....	54
Abbildung 19: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) im fünften Jahr nach HTx bei Patienten mit überdurchschnittlich langer vs. kürzerer Ischämiezeit.....	54
Abbildung 20: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in fünf Jahren post HTx in Abhängigkeit von der Ischämiezeit (Null Bx bis FU 4).....	55
Abbildung 21: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in der Frühphase (30 Tage) nach HTx bei Patienten mit überdurchschnittlich langer vs. kürzerer Ischämiezeit.....	55

Abbildung 22: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in fünf Jahren post HTx in Abhängigkeit von der Ischämiezeit (Null Bx bis FU 4).....	57
Abbildung 23: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4) in Abhängigkeit von einer ACR	59
Abbildung 24: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) bei Patienten ohne ACR vs. mindestens einmaliger ACR in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	60
Abbildung 25: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4) in Abhängigkeit von einer ACR	61
Abbildung 26: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) bei Patienten ohne ACR vs. mindestens einmaliger ACR in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	62
Abbildung 27: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4) in Abhängigkeit von einer ACR	63
Abbildung 28: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) bei Patienten ohne ACR vs. mindestens einmaliger ACR in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	64
Abbildung 29: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose, Kollagen III und IV (%) bei Patienten ohne AMR* in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4; $p < 0,001$).....	66
Abbildung 30: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose, Kollagen III und IV (%) bei Patienten mit AMR* in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4; $p < 0,001$)	66
Abbildung 31: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) bei Patienten mit maximal leicht ausgeprägter vs. moderater bis schwerer Myozytenhypertrophie in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	69
Abbildung 32: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) bei Patienten mit maximal leicht ausgeprägter vs. moderater bis schwerer Myozytenhypertrophie in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	70
Abbildung 33: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) bei Patienten mit unauffälligem vs. prominentem Endothel zum FU 1 in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4).....	72
Abbildung 34: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit von einer Mikrovasculopathie in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	74

Tabellen und Abbildungen im Anhang

Tabelle A 1: Klassifizierung der akuten zellulären Rejektion gemäß ISHLT	127
Abbildung A 1: Befundbericht für die histomorphometrische Vermessung von Fibrose.....	124
Abbildung A 2: Befundbericht für die histomorphometrische Vermessung von Kollagen Typ III.....	125
Abbildung A 3: Befundbericht für die histomorphometrische Vermessung von Kollagen Typ IV.....	126

Abbildung A 4:	Diagnose einer antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion im Deutschen Herzzentrum Berlin	128
Abbildung A 5:	mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in Abhängigkeit vom Geschlecht in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU4).....	129
Abbildung A 6:	mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in Abhängigkeit vom Überlebensstatus in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	129
Abbildung A 7:	mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in Abhängigkeit vom Geschlecht in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4).....	130
Abbildung A 8:	mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in Abhängigkeit vom Überlebensstatus in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	130
Abbildung A 9:	mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit vom Überlebensstatus in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)	131
Abbildung A 10:	mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4) in Abhängigkeit von einer AMR innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx	131
Abbildung A 11:	mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4) in Abhängigkeit von einer AMR innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx	132
Abbildung A 12:	mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4) in Abhängigkeit von einer AMR innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx	132

Zusammenfassung

Sophie Barabasch. Vergleichende histomorphometrische Analyse des interstitiellen Herzgewebes nach Herztransplantation.

Das interstitielle Bindegewebe (extrazelluläre Matrix – EZM) des Myokards besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und III, während Kollagen Typ IV in den Basalmembranen kardialer Fibroblasten und Herzmuskelzellen lokalisiert ist. Nach Herztransplantation unterliegt die myokardiale EZM kontinuierlichen Umbauprozessen. Aufgrund heterogener Studiendesigns ist bisher nur unzureichend beschrieben, welcher Dynamik diese Strukturanpassungen unterliegen.

Ziel der Dissertation war es daher, die Veränderungen von Fibrose sowie Kollagen Typ III und IV quantitativ im fünfjährigen Zeitraum nach Herztransplantation zu erfassen und die Aussagekraft ihrer histologischen Aufbereitungsverfahren gegenüberzustellen. Zusätzlich wurde das Einflusspotenzial verschiedenster Faktoren auf die postoperativen Veränderungen der EZM untersucht. In diese Analyse flossen neben histopathologischen Phänomenen insbesondere die spenderinduzierte Ausgangsbeschaffenheit des Myokards bei Herztransplantation, die Ischämiezeit sowie das Patienten- und Spenderalter ein.

Zur Auswertung gelangen 274 rechtsventrikuläre Endomyokardbiopsien (EMB) von 77 Patienten, die zwischen 2003 und 2006 eine primäre Herztransplantation im Deutschen Herzzentrum Berlin erhielten. Die Probengewinnung erfolgte bei Herztransplantation sowie 30 Tage, 1 Jahr, 3 Jahre und 5 Jahre danach. Zur Probenaufbereitung kamen standardisierte Verfahren (Fibrose: Sirius-Rot-Färbung, Kollagen Typ III und IV: Immunhistochemie mittels monoklonaler Antikörper) zum Einsatz. Mithilfe einer Computer-gestützten Bilddatenanalyse wurde die mittlere Rate der drei Komponenten in einem Bereich von einem Quadratmillimeter pro EMB histomorphometrisch vermessen. Weitere histologische Parameter wurden im Rahmen der Routine-Befundung erhoben.

Bereits bei Transplantation zeigte die interstitielle Struktur erhebliche Schwankungen innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs. Im postoperativen Untersuchungsverlauf stieg die durchschnittliche Fibroserate vornehmlich im ersten Jahr an und zeigte darüber hinaus einen eher stabilen Verlauf. Der mittlere Kollagen-III-Gehalt sank zwar im ersten Jahr nach Herztransplantation geringfügig ab, stieg anschließend jedoch statistisch signifikant bis zum fünften postoperativen Jahr. Der durchschnittliche Anteil an Kollagen IV nahm im gesamten Beobachtungszeitraum kontinuierlich und statistisch signifikant zu. Daher ist davon auszugehen, dass die Unterscheidung kollagener Subtypen ein differenziertes Abbild der interstitiellen Umbauprozesse nach Herztransplantation vermitteln kann als die Sirius-Rot gefärbte Gesamtfibrose.

In Unterscheidung des Patientenalters bei Transplantation bzw. der Altersdifferenz zum Organspender zeigten sich keine statistisch plausiblen Hinweise, dass ein jüngeres Spender- oder Patientenalter mit einem protektiven Effekt verbunden sei.

Weder zelluläre Abstoßungsreaktionen noch pathologische Veränderungen der Herzmuskelzellen nahmen einen statistisch signifikanten Einfluss auf die postoperative Wertentwicklung der Fibrose, sowie Kollagen III und IV. Demgegenüber tendierten Patienten mit antikörpervermittelten Abstoßungsreaktionen bzw. mikrovaskulopathischen Veränderungen langfristig zu höheren Fibrose- bzw. Kollagen-III- und Kollagen-IV-Raten.

Zur abschließenden Klärung, ob die dargestellten Veränderungen spezifischen Anpassungen der interstitiellen EZM nach Herztransplantation Ausdruck verleihen oder physiologisches Alterungsphänomen sind, fehlen vergleichbare Studien.

Sophie Barabasch. Histomorphometric analysis of the interstitial myocardium after heart transplantation.

Major components of the myocardial extracellular matrix (ECM) are collagen type I and type III. Furthermore, collagen type IV is located in the basement membranes of cardiac fibroblasts and myocytes. Structural remodeling of the collagenous matrix is a continuous process after heart transplantation. Unfortunately previous trials are too heterogeneous to achieve consent about its dynamism.

Therefore the aim of this dissertation was to measure fibrosis, collagen type III and IV quantitatively in endomyocardial biopsy specimens (EMB) over a period of five years after heart transplantation and to analyze the prognostic value of immunohistochemistry staining compared to the Sirius-red staining of fibrosis used routinely. Furthermore the possible influence of different factors (histopathological phenomena, myocardial structure at the time of transplantation, age of donor and patient at the time of transplantation) on the postoperative changes in the ECM were analyzed.

In total, 274 EMB of 77 patients who underwent a heart transplantation between 2003 and 2006 were evaluated on the date of their transplantation, 4 weeks, 1 year, 3 years and 5 years after heart transplantation. Computer-based histomorphometrical analyses were used to measure the mean rates of collagen III, IV and myocardial fibrosis in an area of 1 mm² for each EMB.

The interstitial ECM of the myocardium showed a substantial fluctuation in its structure already at the time of transplantation. Especially in the first year the postoperative course of the mean fibrosis showed an increasing rate, whereas for the long-term period the rate remained quite stable.

Collagen III showed a slight decrease in the first postoperative year, but increased significantly over the period. Collagen IV rose even more clearly and continuously. In comparison of the different staining methods, immunohistochemistry seems to reflect the structure of the interstitial ECM better than Sirius-red staining.

With respect to the age there was no statistically significant evidence that a younger age of the patient or donor could have a protective effect.

Neither acute cellular rejections nor pathological changes in the size of cardiac myocytes had a statistically significant influence on the course of the ECM-components.

Whereas patients with antibody-mediated rejection or microvasculopathy tend to have higher rates of fibrosis, collagen III or IV.

Finally it remains unclear if the measured structural changes in the ECM are specific for the post-operative course after heart transplantation or have to be seen as physiological aging of the myocardium.

1 Vorbemerkung zur Herztransplantation

Die chronische Herzinsuffizienz ist ungeachtet der kontinuierlichen Optimierung konservativer und chirurgischer Therapien nach wie vor mit einer hohen Mortalität verbunden.¹⁻³ Insbesondere im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz lässt sich das Langzeitüberleben oftmals nur durch eine orthotope Herztransplantation (HTx) sichern.⁴⁻⁶

Seit der ersten humanen HTx durch Christiaan Barnard im Jahre 1967 konnte die postoperative Prognose durch stetige Forschungsbestrebungen und Erfahrungen aus der klinischen Praxis signifikant verbessert werden.^{5,7} Internationale Registerdaten bestätigen einen Anstieg des mittleren Gesamtüberlebens von 8,5 Jahren für erwachsene Patienten, die zwischen 1982 und 1992 herztransplantiert wurden, auf 10,9 Jahre für Patienten mit HTx im aktuellen Zeitraum.⁸ Der Fortschritt in den Überlebensraten ließ sich zunächst auf die Einführung immunsuppressiver Therapieprotokolle mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CyA) zurückführen. Weitere Erfolge wurden durch eine strenge Indikationsprüfung der HTx-Kandidaten, umfassende Standards in der Auswahl geeigneter Organspender, eine hochausgereifte operative Technik und die stetige Weiterentwicklung immunsuppressiver Medikamente erzielt.^{5,9-11} Im früh- und langfristigen Verlauf treten dennoch Komplikationen auf, die das Überleben nach HTx einschränken. Transplantatversagen sowie Infektionen und Abstoßungsreaktionen (Rejektionen) limitieren die Prognose hauptsächlich im ersten postoperativen Jahr. Im weiteren Verlauf wird das Bild häufiger Komplikationen durch pathologische Veränderungen der epikardialen und mikrovaskulären Gefäßbahn des Herzens (Transplantat- und Mikrovaskulopathie) bzw. eine erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen bestimmt.^{5,6,12,13}

Zur Minimierung der postoperativen Risiken liegt ein besonderer Schwerpunkt auf der sorgfältigen Nachsorge nach Transplantation. Durch ein engmaschiges Nachsorgeprotokoll und die optimale Führung der Patienten in einem interdisziplinären Team kann ein möglicher Transplantatverlust frühzeitig erkannt und entsprechende Therapiemaßnahmen eingeleitet werden.^{14,15} In der klinischen Routine werden eine Reihe nicht-invasiver Methoden angewendet, um die Funktion des Transplantats zu beurteilen. Dazu gehören regelmäßige echokardiografische Kontrollen und das intramyokardiale Elektrokardiogramm (IMEG).^{6,15,16} Zur vollständigen Transplantatevaluation bedarf es jedoch ebenso regelmäßiger Kontrollen mittels Koronarangiografie und intravaskulärem Ultraschall (IVUS), um Aussagen zur koronaren Versorgung und insbesondere zu vaskulopathischen Veränderungen treffen zu können.^{9,17,18} Auch die Diagnose von Abstoßungsreaktionen ist allein auf Basis von klinischen Befunden kaum möglich. Bei Rejektionsprozessen treten histologische Veränderungen in der Regel frühzeitiger auf als klinische Hinweise. Zudem äußern sich

letztere eher unspezifisch in Zeichen einer linksventrikulären Dysfunktion, atrialen Herzrhythmusstörungen oder unklaren gastrointestinalen Beschwerden aufgrund eines erhöhten zentralvenösen Drucks.^{19, 20}

Einen deutlichen Fortschritt in der Abstoßungsdiagnostik erzielten Caves und Kollegen im Jahre 1972. Durch die Modifizierung des zehn Jahre zuvor durch Sakakibara und Konno eingeführten Biopsiekatheters (Bioptom) wurden endomyokardiale Gewebeprobe fortan einfacher und sicherer aus dem rechtsventrikulären Myokard entnommen. In der anschließenden histologischen Begutachtung konnten Abstoßungsvorgänge früher als zuvor erkannt werden, sodass Rejektionstherapien bzw. Anpassungen der Immunsuppression schneller und effizienter eingeleitet wurden.²¹⁻²³ Aufgrund der erhöhten Inzidenz von Abstoßungsvorgängen im frühen Verlauf nach HTx und deren negative Auswirkungen auf das Langzeitüberleben empfehlen internationale Richtlinien insbesondere im ersten postoperativen Jahr serielle Probenentnahmen in kurzen Zeitintervallen. Im weiteren Zeitverlauf sollten Endomyokardbiopsien (EMB) in mehrmonatigen Abständen bzw. in Abhängigkeit klinischer Hinweise durchgeführt werden. Im Falle einer Abstoßung sollten ein bis zwei Wochen nach erfolgter Behandlung Kontrollbiopsien entnommen werden, um den Therapieerfolg zu bewerten.^{19, 24, 25} Derart regelmäßige Gewebeentnahmen erscheinen als vertretbar, da die Rate schwerwiegender lebensbedrohlicher Komplikationen, wie eine Perforation des rechten Ventrikels (RV) bzw. Koronarfsteln, mit < 1% sehr niedrig ist. Eine mit 6% etwas häufigere Komplikation stellt die Beschädigung der Trikuspidalklappe und eine damit verbundene Trikuspidalklappeninsuffizienz dar.^{19, 26, 27}

Der Stellenwert von EMB über das fünfte Jahr nach HTx hinaus wird für klinisch stabile Patienten hinterfragt, da akute Abstoßungsreaktionen im Langzeitverlauf nach HTx selten sind. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Risiko einer gestörten Transplantatfunktion auch im postoperativen Langzeitverlauf durch wiederholte (chronische) Abstoßungsepisoden stark ansteigt. Zudem können aktuell diskutierte, nicht-invasive Methoden im Hinblick auf ihre spezifische Aussagekraft für histopathologische Veränderungen kaum mit dem Potenzial der EMB konkurrieren. Aufgrund dessen gilt die Biopsie unter gegenwärtigen wissenschaftlichen Erkenntnissen weiterhin als Goldstandard in der Überwachung postoperativer Transplantatkomplikationen.²⁸⁻³² So lassen sich nicht nur zelluläre Abstoßungsreaktionen sicher diagnostizieren. Auch zur Feststellung antikörpervermittelter Abstoßungsprozesse, die sich weitaus gravierender auf die Hämodynamik des Transplantatherzens auswirken können, sind EMB unerlässlich.^{25, 33} Weiterhin können transplantatassoziierte Veränderungen der Gefäße und deren Folgen für die Transplantatfunktion abgeschätzt werden.^{6, 9, 12}

Die Bedeutung bioptischer Befunde für eine stetige Prognoseverbesserung nach HTx ist also keineswegs zu unterschätzen. Durch die routinemäßige Erhebung stehen vielfältige histologische Parameter in sehr großen Mengen und über einen langen Zeitverlauf hinweg zur Verfügung. Zudem minimieren international validierte und langjährig angewandte Klassifizierungssysteme die Interobserver-Variabilität der Befundung. Dadurch sind histologische Veränderungen unter klar definierten Bedingungen objektivierbar. Somit birgt die Auswertung von EMB ein bedeutsames Potenzial, um ein besseres Verständnis für transplantatpathologische Vorgänge zu entwickeln. Darauf aufbauend können bestehende Strategien des postoperativen Komplikations- und Risikomanagements kritisch hinterfragt werden. Möglicherweise ergeben sich daraus neue Ansatzpunkte zur Therapieverbesserung. Diese verlängern letztendlich nicht nur das zu erwartende Überleben nach Transplantation, sondern tragen auch erheblich zur Steigerung der Lebensqualität für die Patienten und zu effektiveren Behandlungsstrukturen bei.

2 Einführung

2.1 Kollagene Fasern im Myokard

Die Herzmuskelzellen (HMZ, Myozyten) werden durch interstitielles Bindegewebe gestützt. Dieses ist in einem komplexen Fasernetzwerk organisiert und stellt circa 12% des Gewebavolumens im humanen Myokard.^{34,35} Den hauptsächlichen Anteil an der sogenannten extrazellulären Matrix (EZM) bildet Kollagen.³⁶ Die kollagene Anordnung verläuft dabei in einem dreidimensionalen Geflecht aus drei Schichten. Das Epimysium erstreckt sich unterhalb des Endothels von Epi- bzw. Endokard. In dieser Schicht sind die relativ langen Kollagenfasern parallel zu den Myozyten ausgerichtet und halten Druckkräften effektiv stand. Dadurch werden die kontraktile HMZ vor einer möglichen Überdehnung geschützt. Im darunter gelegenen Perimysium ermöglicht die wellenförmige Anordnung von Kollagen in sehnenartigen Fibrillen (Fasern) eine Aggregation der HMZ zu Bündeln. In der innersten Schicht, dem Endomysium, umhüllen Kollagenfasern einzelne Myozyten und verbinden sie auf diese Weise mit ihrer Umgebung bzw. angrenzenden Kapillaren. So können die Kontraktionskräfte aus den Herzkammern durch laterale Zell-Zell-Kontakte auf Zellebene übertragen werden.^{3, 35, 37-39}

Mit einem Anteil von 85% ist Kollagen Typ I Hauptbestandteil der myokardialen EZM.^{3, 37, 40} Durch die Ausrichtung in dicken, balkenartigen Fasern ist es ebenso reißfest wie Stahl und ähnlich stark mit Zugkräften belastbar.^{2, 3, 41} Kollagen Typ III stellt mit 11% das zweithäufigste fibrilläre Kollagen im Myokard dar.^{3, 37} Dabei verbinden sich lose angeordnete Bündel feiner Fasern zu retikulären Netzwerken und vermitteln dadurch vor allem Elastizität im Endomysium.⁴²⁻⁴⁴ Im Gegensatz dazu ist Kollagen Typ IV dimer organisiert. Es befindet ausschließlich in der Basalmembran (BM) kardialer Fibroblasten und Myozyten und richtet sich dort fischnetzartig aus. Durch die Verknüpfung der BM mit den restlichen Anteilen der EZM spielt Kollagen Typ IV eine besondere Rolle während der Kraftübertragung in der systolischen und diastolischen Herzaktion.^{35, 45-48} Das verbleibende kardiovaskuläre Kollagen besteht zu geringen Anteilen aus Kollagen Typ V und VI. Im Myokard ist es mit anderen Kollagengruppen und koronaren Gefäßen vernetzt.^{36, 43}

2.2 Die Dialektik des interstitiellen Gewebes im Myokard

Das extrazelluläre Kollagenetzwerk ist das essentielle Grundgerüst für die Pumpfunktion des Herzens. Zwar hat es nur einen Anteil von 4% an der Gesamtheit myokardialer Proteine. Durch seine effektive Anordnung innerhalb der EZM und die komplexe Vernetzung mit anderen Komponenten des Myokards trägt es jedoch entscheidend zum Erhalt von Form und Größe des Herzens bei. Die EZM gibt myokardialen und vaskulären Zellen mechanischen Halt und optimiert die Kraftübertragung zwischen HMZ und Ventrikeln in der Systole. In der Diastole trägt das kollagene Netzwerk aufgrund seiner Zugbelastbarkeit wesentlich zur Ausdehnung und Entspannung des myokardialen Gewebes bei.^{3, 35, 36, 49, 50}

Durch das dynamische Zusammenspiel zwischen Fibroblasten als kollagenproduzierende Zellen und kollagenabbauenden Matrix-Metalloproteinasen (MMP) unterliegen Kollagenfasern einem kontinuierlichen Auf- und Abbau, der sehr sensibel auf eine Vielzahl mechanischer und chemischer Stimuli reagiert.³⁹ Dabei können bereits geringe Veränderungen des Kollagengehaltes bzw. der Kollagenstruktur die reibungslose Ausführung der mechanischen Herzaktion beeinträchtigen. Ein unverhältnismäßiger Verlust an Kollagenfasern kann zu einer Auflockerung des zellulären Zusammenhalts und folglich zu einer erhöhten Dehnbarkeit des Herzgewebes führen. Daraus folgt eine chronische Dilatation und Verformung der Ventrikel, die die Pumpleistung des Herzens negativ beeinflusst.^{36, 51} Dahingegen resultiert ein zunehmender Kollagenanteil bzw. eine verstärkte Vernetzung in einer erhöhten Steifheit des Myokards, da die Gesamtheit der Kollagenfasern eher unelastisch ist. Dabei spiegelt sich die überschießende Akkumulation kollagener Fasern morphologisch in einer Fibrose wieder, die in zwei Erscheinungsformen differenziert werden kann.^{2, 40} Die Bildung reparativer Ersatzfibrose gleicht den Verlust von Herzmuskelzellen aus und wird anhand mikroskopischer Vernarbungen im Myokard sichtbar. Das entstehende Narbengewebe ist zwar faserreich und kann den mechanischen Zusammenhalt der Gewebearchitektur sichern. Aufgrund des geringen Gehaltes an Zellen und Kapillaren ist die Funktion der betroffenen Areale jedoch eingeschränkt.^{2, 40} Dahingegen tritt die reaktive interstitielle Fibrose ohne vorangegangenen Zellverlust auf. Sie beruht auf einer gestörten Regulation zwischen Kollagenproduktion und -abbau. Entweder kann die Syntheseleistung der Fibroblasten gesteigert sein oder eine Zunahme der Fibroblastenzahl selbst mündet in eine übermäßig hohe Ansammlung kollagener Fasern im myokardialen Interstitium. Bei starker Ausprägung ist sie häufig mit perivaskulären fibrotischen Läsionen assoziiert.^{2, 36, 39, 52-55}

In der Untersuchung des klinischen Einflusses von fibrotischen Läsionen auf die Funktionsfähigkeit des Herzens nehmen die Arbeiten von Weber et al.^{2, 3, 56} eine Vorreiter-Stellung ein. Durch

fibrotische Veränderungen sinkt die Dehnungsfähigkeit der Herzmuskelzellen, sodass das myokardiale Gewebe eine unnatürliche Steifheit erhält.^{2, 3, 56, 57} Besonders die diastolische Funktion des Herzens leidet unter dem eingeschränkten Bewegungsumfang der Kardiomyozyten.^{56, 58} Eine derartige Funktionseinschränkung wird oft durch eine Hypertrophie des Herzens kompensiert und kann weiterführend eine systolische Schwäche und somit eine globale Herzinsuffizienz nach sich ziehen.^{36,50,51,56,58} Weiterhin wird fibrotischen Läsionen eine proarrhythmogene Wirkung zugeschrieben, sodass das Risiko des plötzlichen Herztodes steigt.⁵⁹

2.3 Veränderungen der histologischen Myokardstruktur nach HTx

Histologische Untersuchungen zu myokardialen Umbauvorgängen nach HTx sind bisher über unterschiedlich lange postoperative Zeiträume hinweg durchgeführt worden. Dabei wird die Vergleichbarkeit durch heterogene Studiendesigns und geringe Fallzahlen erschwert. Die folgende Tabelle 1 stellt die bisherigen Erkenntnisse zu Umstrukturierungen der EZM und Veränderungen der HMZ im rechtsventrikulären Myokard herztransplantiertter Patienten gegenüber. Dabei werden die verwendeten Darstellungsmethoden ebenso aufgezeigt wie die unterschiedliche Länge des Beobachtungszeitraumes nach HTx.

Tabelle 1: Veränderungen des interstitiellen Myokards und der Morphologie von Herzmuskelzellen nach HTx

<i>Referenz</i>	<i>n</i>	<i>Zeit nach HTx</i>	<i>Interstitium</i>	<i>HMZ</i>	<i>Färbemethodik</i>	<i>Vermessung</i>
Koch et al. (2006) ⁶⁰	58	14 Tage	Statistisch signifikante Zunahme der endo- und perimysialen Fibrose in der ersten Woche post HTx	Stetige Zunahme des HMZ-Durchmessers, statistisch signifikanter Unterschied zwischen HTx und zweiter Woche post HTx	Modifizierte Trichrom-Färbung nach Masson	Punktzählverfahren
Schacherer et al. (1999) ⁶¹	20	2 Monate	Statistisch signifikante Zunahme von Kollagen Typ I, keine signifikante Zunahme von Kollagen Typ III und IV	Nicht untersucht	Immunperoxidase-Reaktion, Kontrastfärbung mit Haematoxylin	Computergestützt, kollagene Fläche pro Zelle in Quadratmikrometern
Tazelaar et al. (1990) ⁶²	2	4 bzw. 18 Monate	Keine statistisch signifikante Veränderung von Kollagen Typ I, III und IV	Nicht untersucht	Monoklonale Antikörper	Semiquantitativ mit Immunfluoreszenz
Vanhoutte et al. (2013) ⁶³	39	8 Monate	Statistisch signifikant höherer Fibrosegehalt im achten verglichen mit dem ersten Monat post HTx	Nicht untersucht	Sirius-Rot-Färbung	Keine Angaben
Schnabel et al. (1993) ⁶⁴	12	12 Monate	Statistisch signifikante Zunahme der perimysialen Fibrose auf etwa das 5,8 fache, der endomysialen Fibrose auf etwa das 2,8 fache	Abnahme des HMZ-Anteils um etwa 10%	Keine Angaben	Punktzählverfahren
Schnabel et al. (1994) ⁶⁵	/	12 Monate	Statistisch signifikante Zunahme der Fibrose auf etwa das 2,8 fache	Statistisch signifikante Zunahme des HMZ-Durchmessers um etwa 30%	Keine Angaben	Punktzählverfahren
Fornes et al. (1996) ¹³	20	Im Mittel 24 Monate	Relativ konstanter Kollagengehalt in interstitiellem, perivaskulärem und narbigem Gewebe	Nicht untersucht	Sirius-Rot-Färbung	Computergestützt in 20 Gesichtsfeldern

<i>Referenz</i>	<i>n</i>	<i>Zeit nach HTx</i>	<i>Interstitialium</i>	<i>HMZ</i>	<i>Färbemethodik</i>	<i>Vermessung</i>
Schupp et al. (2006) ⁶⁶	28	36 Monate	Statistisch signifikante Abnahme von Kollagen Typ I, III und IV ab dem ersten Jahr post HTx	Nicht untersucht	monoklonale Mausantikörper, Kontrastfärbung mit Fast-Red und Haemalaun	Punktzählverfahren
Armstrong et al. (2000) ⁶⁷	66	48 Monate	Mittlerer Fibrosegehalt steigt bei Patienten mit längerem Überleben signifikant früher als bei Patienten mit kürzerem Überleben. Ab dem 2. Jahr post HTx liegt Fibrose in beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau	Statistisch signifikante Zunahme des HMZ-Durchmessers, beginnt bei Patienten mit kürzerem Überleben < 5 Jahre signifikant früher als bei Patienten mit einem längerem Überleben post HTx	Trichrom-Färbung nach Masson	Computergestützt in einem Gesichtsfeld
Armstrong et al. (1998) ⁶⁸	50	72 Monate	Frühzeitige Zunahme der Fibrose in den ersten beiden Monaten post HTx, keine statistisch signifikanten Unterschiede über den 2. Monat post HTx hinaus	Kontinuierliche Zunahme des HMZ-Durchmessers ab dem 6. Monat post HTx, ab dem 24. Monat statistisch signifikant größer als Baseline im 6. Monat post HTx	Trichrom-Färbung nach Masson	Lichtmikroskopisch in einem Gesichtsfeld
Boni (2014) ⁶⁹	855	72 Monate	Starker Anstieg des mittleren Fibrosegehaltes in den ersten fünf Monaten post HTx, im weiteren Verlauf rückläufig	Nicht untersucht	Sirius-Rot-Färbung	Computergestützt in 12 Gesichtsfeldern
Prochno und Meyer (1992) ⁷⁰	13	Keine Angaben	Sehr starke Fibrose, starke Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten	Konstanter Verlauf bei nahezu allen Patienten, keine HMZ-Hypertrophie	Domagk-Färbung	Keine Angaben
Nozynski et al. (2007) ^{71*}	15	120 Monate	Deutliche Zunahme der Fibrose im ersten Jahr post HTx, anschließend schwach abnehmender Tendenz	Schwankende HMZ-Durchmesser mit eher abnehmender Tendenz, keine signifikanten Unterschiede im Studienverlauf	Trichrom-Färbung nach Masson	Computergestützt in mindestens 30 Gesichtsfeldern

<i>Referenz</i>	<i>n</i>	<i>Zeit nach HTx</i>	<i>Interstitialium</i>	<i>HMZ</i>	<i>Färbemethodik</i>	<i>Vermessung</i>
Gramley et al. (2009) ⁷²	57	120 Monate	Kontinuierliche Zunahme des mittleren Fibrosegehaltes, ab dem 2. Jahr nach HTx statistisch signifikant	Statistisch signifikanter Verlust an HMZ mit zunehmender Hypertrophie der verbleibenden HMZ	Sirius-rot-Färbung	Computergestützt in mindestens 2 Gesichtsfeldern

*keine Angaben zur Lokalisation der entnommenen Gewebeproben; HMZ – Herzmuskelzellen; HTx – Herztransplantation, n – Anzahl an Patienten

In Zusammenschau der Ergebnisse bisheriger Studien anhand von Tabelle 1 bleibt weiterhin unklar, in welchem tatsächlichen Ausmaß sich quantitative Anpassungen der interstitiellen Struktur nach Herztransplantation vollziehen. Mögliche Unterschiede zwischen der frühzeitigen und langfristigen postoperativen Phase bleiben auch nach aktueller Studienlage kaum beurteilbar. Gleichzeitig ist nicht eindeutig, ob die kollagenen Subtypen gleichermaßen an den Architekturveränderungen teilhaben. Auch im Hinblick auf Veränderungen von Form und Anzahl der HMZ ist kein Konsens erreicht worden. Zudem ist nur unzureichend geklärt, welchen Einfluss weitere histologische Phänomene, wie zum Beispiel Abstoßungsreaktionen, möglicherweise auf die Entwicklung des myokardialen Interstitiums nach HTx ausüben. Ferner liegen keine Erkenntnisse darüber vor, inwiefern das Alter von Transplantatspender und -empfänger auf die Umbauvorgänge der myokardialen EZM nach HTx einwirken. So bleibt unbeantwortet, ob die beschriebenen Umstrukturierungen Ausdruck spezifischer Anpassungen nach HTx sind und somit grundsätzlich einem anderen Muster unterliegen als im myokardialen Interstitium herzgesunder Patienten. Sie könnten stattdessen jedoch auch physiologischen Alterungsvorgängen entsprechen, die keinen pathologischen Einfluss auf die Transplantatfunktion nehmen. Somit sind trotz verschiedenster Forschungsarbeiten der letzten 2 Jahrzehnte bisher noch keine allgemeingültigen Aussagen zur klinischen Bedeutsamkeit von Veränderungen der interstitiellen Myokardarchitektur nach Herztransplantation treffbar.

3 Zielstellung

Mit der Biopsie steht ein großes Materialreservoir zur Verfügung, um interstitielle Veränderungen nach HTx zu analysieren. Aufgrund international geltender Richtlinien zur Entnahme und standardisierten Aufbereitung können die Gewebeproben unter im Vorfeld einheitlich definierten Bedingungen untersucht werden.^{28, 73} Zudem ermöglichen spezielle immunhistochemische Methoden bzw. gewebespezifische Färbeverfahren klare Aussagen zu individuellen Veränderungen einzelner Komponenten der myokardialen Mikrostruktur. Dabei ist eine differenzierte Betrachtung des interstitiellen Herzgewebes ebenso durchführbar wie die Beurteilung der zellulären Morphologie. Nur so können für die kardiale Funktion potenziell bedeutsame Umbauvorgänge in der Gewebearchitektur nach Herztransplantation erkannt und quantitativ erfasst werden.

Gegenstand dieser Arbeit ist es daher, Darstellungsmethoden des interstitiellen Myokards nach HTx zu vergleichen und auf ihre Korrelationsfähigkeit mit weiteren histologischen Befunden im Rahmen der routinemäßigen Posttransplantationsnachsorge zu überprüfen. Im Vordergrund steht hierbei, die Entwicklung myokardialer Fibrose im Langzeitverlauf nach HTx über fünf Jahre hinweg quantitativ zu bewerten und der immunhistochemischen Darstellung von Kollagen Typ III und IV gegenüberzustellen.

In diesem Rahmen soll die vorliegende Arbeit folgende Fragen klären:

- Lassen sich im postoperativen Verlauf nach Herztransplantation quantitative Veränderungen der myokardialen Fibrose sowie von Kollagen Typ III und IV im rechtsventrikulären Myokardgewebe nachweisen?
- Wie gestaltet sich das Verhältnis zwischen Fibrose und Kollagen Typ III im Untersuchungszeitraum?
- Kann eine Beziehung zwischen den interstitiellen Veränderungen von Fibrose, Kollagen Typ III und IV und dem Patientengeschlecht bzw. Überlebensstatus zum Zeitpunkt der Datenerhebung festgestellt werden?
- Welchen Einfluss nimmt das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Herztransplantation bzw. die Altersdifferenz zwischen Empfänger und Spender auf den Verlauf der interstitiellen Fibrose bzw. von Kollagen Typ III und IV?
- Welche Beziehung besteht zwischen der spenderabhängigen Ausgangsbeschaffenheit der interstitiellen Architektur zum Zeitpunkt der Transplantation bzw. der Ischämiezeit bei Herztransplantation und dem Verlauf von Fibrose, Kollagen Typ III und IV im postoperativen Zeitraum?

- Lassen sich weitere bioptische Parameter (Abstoßungsreaktionen, strukturelle Veränderungen von Herzmuskelzellen und intramyokardialen Gefäßen) mit dem Verlauf von Fibrose, Kollagen Typ III und IV korrelieren?
- Entsprechen die ermittelten Verläufe von Fibrose, Kollagen Typ III und IV physiologischen Alterungsvorgängen oder sind sie als spezifische Anpassungsvorgänge nach Herztransplantation zu werten?
- Wie ist die klinische Relevanz der erzielten Ergebnisse einzuschätzen?

4 Studienpopulation

Das Deutsche Herzzentrum Berlin (DHZB) verfügt über eines der größten Transplantationsprogramme in Deutschland. Hier wurden von April 1986 bis Dezember 2012 insgesamt 1.717 Herztransplantationen durchgeführt.¹⁶ Zur Untersuchung der Fragestellungen wurden insgesamt 78 Patienten ausgewählt, die sich zwischen Juni 2003 und August 2006 einer primären HTx am DHZB unterzogen. Bei den Patienten handelte es sich um Teilnehmer an der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten prospektiven Studie „Erarbeitung von Prognosefaktoren für die Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation“ (TVP-Studie).⁷⁴ Für den Einschluss in die Studie mussten folgende Kriterien vorliegen:

- orthotope HTx,
- Alter bei HTx \geq 18 Jahre,
- schriftliche Einwilligung in die Studienteilnahme.

Die Ausschlusskriterien umfassten:

- Alter bei HTx $<$ 18 Jahre,
- höhergradige AV-Blockaden ohne implantierten Schrittmacher,
- Klaustrophobie,
- Schwangerschaft und Stillzeit.

Der Beobachtungszeitraum der TVP-Studie erstreckte sich auf 5 Jahre nach HTx. Die Erhebungen wurden zu folgenden Zeitpunkten durchgeführt (Follow Up - FU):

- FU 1 = 30 Tage,
- FU 2 = 1 Jahr,
- FU 3 = 3 Jahre,
- FU 4 = 5 Jahre post HTx.

Jedes FU beinhaltete nicht-invasive und invasive Diagnostikverfahren. Morphologische und funktionelle Parameter der Herzkranzgefäße wurden anhand von koronarangiografischen Gefäßfunktionstesten und IVUS (bei FU1, FU2 und FU4) erhoben. Während der Herzkatheteruntersuchung wurden rechtsventrikuläre EMB (RV-EMB) über einen Zugang in der Femoralvene entnommen. Ihre Analyse erfolgte mithilfe von lichtmikroskopischen, immunhistochemischen und molekularpathologischen Methoden. Für eine kleinere Gruppe an Studienpatienten lagen zusätzlich Gewebeproben aus dem Spenderherzen während des Transplantationsvorganges (Null Biopsie – Null Bx) vor.

Aufgrund des persönlichen Wunsches der Patienten, medizinischer Indikation bzw. Tod verringerte sich die Anzahl der Studienteilnehmer konsekutiv von ursprünglich 78 Patienten auf:

- 77 Patienten zum FU 1,
- 69 Patienten zum FU 2,
- 57 Patienten zum FU 3.
- 46 Patienten schlossen die Studie mit einem FU 4 ab.

Männer stellten mit 86% die Mehrheit der Patientengruppe (67/78 vs. Frauen 11/78 \approx 14%). Somit spiegelte die Geschlechterverteilung ein typisches Kollektiv von Transplantatempfängern wider.⁶ In 36% der Fälle (28/78) wurde die Wartezeit bis zur Transplantation mit einem links- bzw. biventrikulären Unterstützungssystem überbrückt. Hauptindikationen für eine HTx waren die dilatative Kardiomyopathie (54/78 \approx 69%) sowie koronare Herzerkrankung (18/78 \approx 23%). Die mittlere Ischämiezeit während des Transplantationsvorganges lag mit 211 ± 49 Minuten über den durchschnittlichen Werten von unter zwei Stunden im europäischen Transplantationsgebiet.²⁴ Das mittlere Alter aller Patienten betrug zum Zeitpunkt der Transplantation $50,2 \pm 12,2$ Jahre. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren 57 von 78 Patienten (\approx 73%) am Leben. Während 30% der Männer (20/67) verstorben waren, lag die Todesrate der Frauen bei 9% (1/11). Einen Überblick über die wichtigsten prä-, peri- und postoperativen Daten der Patienten sowie über Charakteristika der Transplantatspender gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Patientenpopulation (n = 78)

<i>Geschlecht</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • männlich • weiblich 	<ul style="list-style-type: none"> • 86% (67/78) • 14% (11/78)
<i>Bridging bis zur HTx mittels Assist Device</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • gesamt <ul style="list-style-type: none"> ○ linksventrikuläres System ○ biventrikuläres System 	<ul style="list-style-type: none"> • 36% (28/78) <ul style="list-style-type: none"> ○ 71% (20/28) ○ 29% (8/28)
<i>Alter zum Zeitpunkt der HTx (MW \pm SA, in Jahren)</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • gesamt <ul style="list-style-type: none"> ○ männlich ○ weiblich* 	<ul style="list-style-type: none"> • $50,2 \pm 12,2$ <ul style="list-style-type: none"> ○ $49,9 \pm 12,5$ ○ $51,4 \pm 10,8$
<i>Indikationen zur HTx</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • dilatative Kardiomyopathie • koronare Herzerkrankung • andere 	<ul style="list-style-type: none"> • 69% (54/78) • 23% (18/78) • 8% (6/78)
<i>Ischämiezeit (MW \pm SA, in Minuten)</i>	$211,2 \pm 49,6$
<i>Reperfusionzeit (MW \pm SA, in Minuten)</i>	$187,4 \pm 66,5$

<p><i>Überleben post-HTx (Stand: 01.03.2013)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Anteil verstorbenen Patienten <ul style="list-style-type: none"> ○ gesamt <ul style="list-style-type: none"> ▪ männlich ▪ weiblich • Todesursachen <ul style="list-style-type: none"> ○ Transplantatversagen/Graftsklerose ○ Infektion/Sepsis ○ maligne Ursachen ○ Unbekannt ○ andere 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 27% (21/78) ▪ 30% (20/67) ▪ 9% (1/11) ○ 24% (5/21) ○ 14% (3/21) ○ 14% (3/21) ○ 19% (4/21) ○ 29% (6/21)
<p><i>Spender</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Geschlecht <ul style="list-style-type: none"> ○ männlich ○ weiblich ○ Geschlechter-Match Spender – Empfänger • Alter zum Todeszeitpunkt (MW ± SA, in Jahren) • Todesursachen <ul style="list-style-type: none"> ○ intrazerebrale Blutung ○ Schädelhirntrauma ○ zerebraler Insult ○ zerebrale Hypoxie ○ andere 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 64% (50/78) ○ 36% (28/78) ○ 71% (55/78) • 40,9 ± 12,4 ○ 44% (34/78) ○ 30% (23/78) ○ 9% (7/78) ○ 6% (5/78) ○ 11% (9/78)
<p><i>CMV Status</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Empfänger positiv • Spender positiv • CMV-Match Spender – Empfänger 	<ul style="list-style-type: none"> • 60% (47/78) • 64% (50/78) • 53% (41/78)

* Altersunterschied zwischen den Geschlechtern: $p = 0,691$; CMV – Cytomegalievirus; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; SA – Standardabweichung

Weitere demografische Daten, wie die HLA-Typisierung bzw. HLA-Antikörper, werden aufgrund fehlender Vergleichsdaten nicht für die Untersuchungen der Dissertation verwendet.

5 Material und Methoden

5.1 Probengewinnung und histologische Aufbereitung

Das Untersuchungsmaterial bestand aus 274 RV-EMB. Diese wurden im Rahmen der Studienuntersuchungen zwischen dem 17.06.2003 und 10.01.2012 entnommen. Tabelle 3 listet die Anzahl an Biopsien auf, die pro FU zur Verfügung standen.

Tabelle 3: Anzahl der Biopsien pro FU

<i>Art des FU</i>	<i>Anzahl an Biopsien (n = 274)</i>
Null Bx	9% (25/274)
FU 1	28% (77/274)
FU 2	25% (69/274)
FU 3	21% (57/274)
FU 4	17% (46/274)
<i>gesamt</i>	100% (274/274)

FU – Follow Up; n – Anzahl an Biopsien; Null Bx – Null Biopsie

Lagen gemäß den Standards der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) mindestens 3 Gewebeproben pro FU vor, galten die entnommenen EMB als interpretationsfähig.⁷³ Die Proben wurden zunächst in 4%iger Formalinlösung fixiert. Nach Einbettung des Gewebematerials in Paraffin wurde es unter gekühlten Bedingungen 3 Mikrometer (μm) dick zugeschnitten und im darauffolgenden Wasserbad auf Objektträger gebracht. Sobald die Proben getrocknet, entparaffiniert und in destilliertem Wasser gespült waren, wurden die gewünschten Färbungen durchgeführt.

Zur Darstellung der Fibrose wurde jeweils ein Gewebeschnitt mittels Picro-Sirius-Rot-Färbung behandelt. Die dazu verwendete 1%ige Sirius-Rot-Lösung bestand aus Pikrinsäure und je nach Lieferverfügbarkeit aus dem Farbstoff Sirius F3BA bzw. 4B der Firma Chroma. Fibrotische Anteile und Narbengewebe stellten sich dabei rot dar. Das sonnengelb angefärbte Cytoplasma hob sich deutlich davon ab. Kernstrukturen färbten sich durch Gegenfärbung mittels Haematoxylin blauschwarz.

Bis April 2004 erfolgte die immunhistochemische Aufbereitung von Kollagen Typ III und Typ IV manuell auf Basis einer Alkalischen-Phosphatase-Reaktion. Nach Automatisierung der Färbung im April 2004 wurde die Avidin-Biotin-Methode verwendet. Dabei kamen IgG-Maus-Antikörper zum Einsatz:

- Kollagen III – Anfärbung des interstitiellen Bindegewebes, Klon HWD1.1 (monoklonaler Antikörper, Firma BioGenex)
- Kollagen IV – Anfärbung der Basallaminae, Klon COL-94 (monoklonaler Antikörper, Firma BioGenex).

Beide Kollagene erhielten eine rote Färbung, während sich Kernstrukturen durch Gegenfärbung mit Haematoxylin blauschwarz abhoben. Das restliche Bindegewebe war durch entsprechende

Vorbehandlung komplett ausgewaschen. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen beispielhafte Ergebnisse der Kollagen III und IV-Färbung.

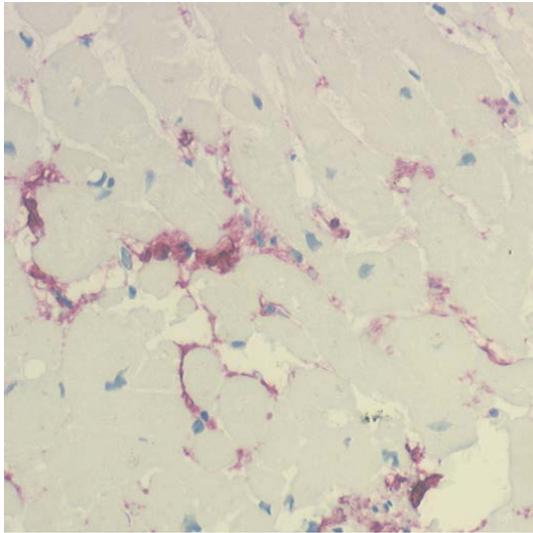


Abbildung 1: Kollagen Typ III

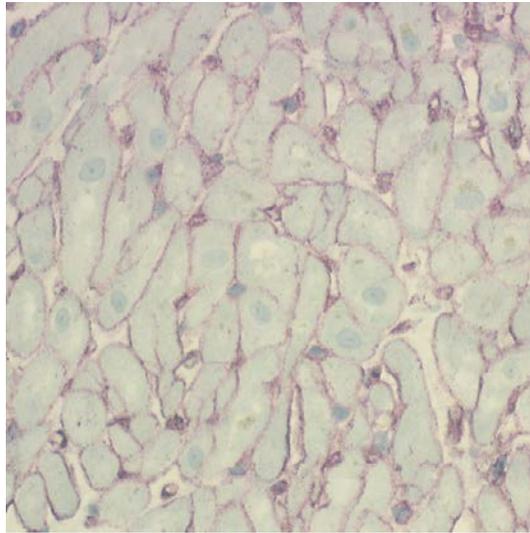


Abbildung 2: Kollagen Typ IV

5.2 Histomorphometrische Messungen

Pro Biopsie wurden jeweils drei Präparate ausgewertet (Fibrosefärbung mittels Sirius-Rot, immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ III bzw. Typ IV). Die Vermessung aller Schnitte erfolgte nach einem einheitlichen Prinzip unter Verwendung eines automatisierten Analysesystems mikroskopischer Bilder der Firma Carl Zeiss. Das Präparat wurde auf ein Axioskop (Olympus) aufgelegt und mit einem Objektiv von 20x, einem Projektiv von 10x und einem Tubus von 1,0 eingestellt. Die Übertragung des Bildes auf einen Computerbildschirm erfolgte über eine CCD Kamera der Marke Sony mit einer Vergrößerung von 1,0. Anschließend bearbeitete die Software KS 400 (Version 2.3, Carl Zeiss Visions) die erfassten Bilddaten mit einem Farbsegmentierungsprogramm. In jedem Gewebeschnitt unterschieden sich die Rottöne der gefärbten Strukturen in ihrer Intensität. Daher war es vor Auswertung eines jeden Präparates notwendig, die Software manuell auf die Erkennung des entsprechenden Rottones einzustellen („Anlernphase“). Nach erfolgreichem Anlernen des Farbsegmentierungssystems wurden rot dargestellte Strukturen in einen grünen Farbton transferiert („Segmentierungsphase“). Anschließend konnte die quantitative Messung erfolgen. Die folgenden Abbildungen 3 bis 5 zeigen die einzelnen Schritte der Farbsegmentierung.

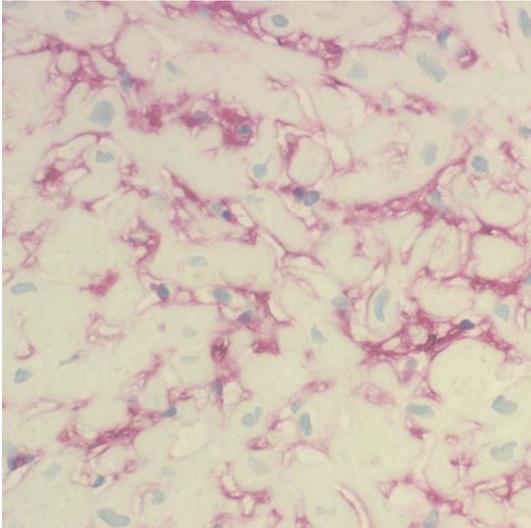


Abbildung 3: Schnitteinstellung

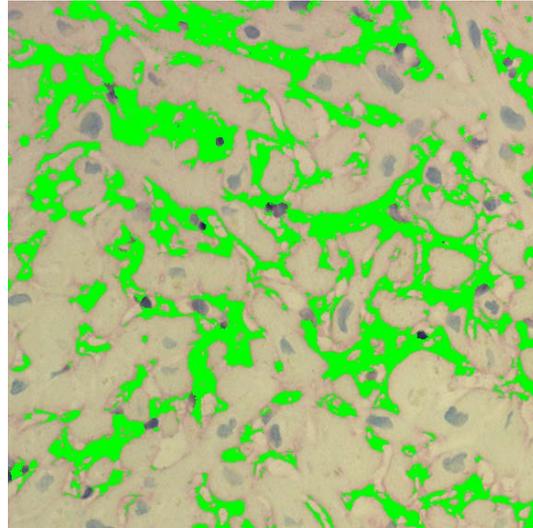


Abbildung 4: Anlernphase

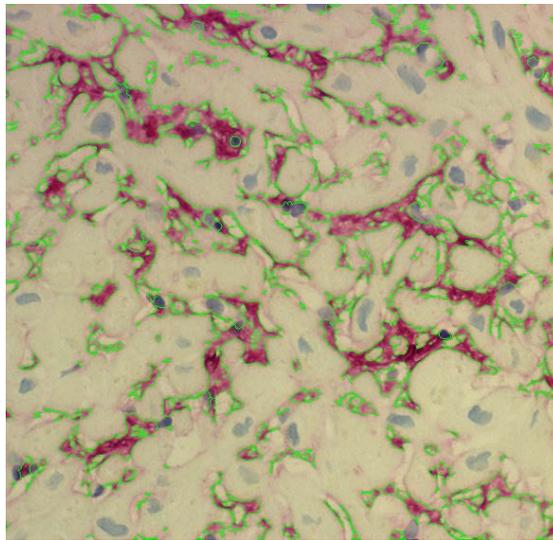


Abbildung 5: Segmentierungsphase

Für jede RV-EMB wurden zufällig nacheinander 12 Gesichtsfelder eingestellt, um einen Bereich von einem Quadratmillimeter (mm^2) pro Messvorgang zu erfassen. Bei sehr kleinen Präparaten waren überlappungsfreie Messungen nicht immer realisierbar, sodass in Einzelfällen weniger als 12 Messwerte für die Analyse herangezogen wurden. Bei jeder Einzelmessung mussten die dargestellten Strukturen mindestens 80% des Gesichtsfelds ausfüllen, sodass möglichst wenig optisch freie Flächen über den Schnitttrand hinaus sichtbar waren.

Bei der Ausmessung der Präparate wurden folgende Parameter erhoben:

- Gesamtfläche der fibrotischen Strukturen in Quadratmikrometern (μm^2) und in Prozent (%),
- Strukturkonglomerate über $30 \mu\text{m}^2$ wurden als narbiges Gewebe erfasst und als Anteil an der Gesamtfibrose in Prozent (%) angegeben,
- Anteil der reinen Fibrose (Gesamtfibrose abzüglich Narbengewebe) in Quadratmikrometern (μm^2) und in Prozent (%),
- Anteil von Kollagen Typ III in Quadratmikrometern (μm^2) und in Prozent (%) im Vergleich zur Gesamtfläche des Gesichtsfeldes,
- Anteil von Kollagen Typ IV in Quadratmikrometern (μm^2) und in Prozent (%) im Vergleich zur Gesamtfläche des Gesichtsfeldes.

Zur Auswertung des Messvorganges stand das im DHZB entwickelte Makro BGW7 (nach Diplom-Ingenieur Betz und Prof. Dr. sc med. Meyer) zur Verfügung. Für jedes ausgemessene Präparat wurde ein standardisierter Befundbericht erstellt. In diesem Bogen wurden der individuelle Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SA) aus den 12 Einzelmessdaten (in μm^2 und %) anhand des Programmes Microsoft Excel (Version 1997) berechnet. Zusätzlich wurden die 12 Absolutwerte (μm^2) der Gesamtfibrose, reinen Fibrose sowie von Kollagen Typ III und IV in einem Säulendiagramm aufgeführt. Beispielhafte Befundberichte sind mit den Abbildungen A1 (Fibrose), A2 (Kollagen III) und A3 (Kollagen IV) im Anhang hinterlegt.

Für die Fibrose sprechen einige Studien von einem Normalgehalt von $\leq 10\%$.^{60, 71} Im DHZB wird ein Wert von bis zu 9% als physiologischer Fibroseanteil angesehen. Für den Gehalt von Kollagen Typ III und IV liegen keine physiologischen Richtwerte vor.

5.3 Erhebung weiterer histologischer Parameter

Im Zuge der Routine-Befundung erfolgte die lichtmikroskopische und immunhistologische Untersuchung der entnommenen RV-EMB anhand von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE).

Zur Beurteilung morphologischer Veränderungen der Herzmuskelzellen standen fünf Ausprägungsgrade zur Verfügung:

- Grad 0 = keine Hypertrophie,
- Grad 1 = milde Hypertrophie,
- Grad 2 = moderate Hypertrophie,
- Grad 3 = schwer ausgeprägte Hypertrophie,
- Grad 4 = gleichzeitige Hypertrophie und Atrophie.

In die Analyse der terminalen Strombahn flossen die vaskuläre Reaktion von Endothelzellen und die Wandstärke der Gefäß-Media als die dem Endothel folgende, mehrzellige Schicht ein. Zur Beschreibung der Befunde entwickelte Prof. Dr. sc med. R. Meyer ein semiquantitatives Klassifizierungssystem:

- Grad 0 = Endothel unauffällig (Zelldurchmesser < Durchmesser der Endothelzellkerne); Media-Wand unauffällig (Radius Gefäßlumen > Wanddurchmesser)
- Grad 1 = Endothel prominent (Zelldurchmesser = Durchmesser der Endothelzellkerne); geringfügige Verdickung der Media-Wand durch Proliferation
- Grad 2 = Endothel stark geschwollen (Zelldurchmesser > Durchmesser der Endothelzellkerne); starke Verdickung der Media-Wand durch Proliferation

Bei einer starken Verdickung der medialen Gefäßwand (Grad 2) liegt eine Transplantatvaskulopathie der terminalen Strombahn (Mikrovaskulopathie – MVP), vor. Sie ist als prognostisch ungünstiger Faktor für das Langzeitüberleben nach Herztransplantation bewiesen.^{12, 75}

Das Ausmaß der akuten zellulären Abstoßung (ACR – acute cellular rejection) wurde gemäß den ISHLT-Empfehlungen anhand von HE-Färbungen bewertet.^{28, 73} Durch die Erweiterung des Graduierungssystems um den DHZB-spezifischen Grad 01A wurden morphologisch erkennbare Vorstufen einer ACR abgedeckt. Die histologische Charakterisierung der ACR-Grade gibt Tabelle A1 im Anhang wieder.

Neben zellulären Rejektionsprozessen können auch antikörpervermittelte Abstoßungsvorgänge nach HTx beobachtet werden. Die antikörpervermittelte oder auch humorale bzw. vaskuläre Abstoßung (AMR – antibody-mediated rejection) stellt sich im Biopat vor allem durch geschwollene Endothelzellen, interstitielle Ödeme sowie Ablagerungen von Immunglobulinen bzw. Komplement in den Gefäßen dar.^{28, 76} Trotz vielfältiger internationaler Bemühungen herrscht bisher kein Konsens zur optimalen Befundung in EMB.^{28, 73, 77} Im DHZB wurde die AMR-Diagnose anhand des immunhistochemischen Nachweises der Immunglobuline IgA, IgM und IgG und des Endothelzellmarkers CD31 gestellt. Außerdem wurden die Komplementfaktoren C3c und C1q einbezogen. Als Hilfsparameter diente der Komplementmarker C4d. Eine AMR galt als sicher, sobald IgA, IgM, IgG sowie CD31 und C1q bzw. C3c in Zusammenschau mit C4d nachgewiesen wurden. Ein Verdacht auf eine AMR bestand bei positivem Nachweis von C4d trotz negativer Immunglobuline. Das Vorgehen zur AMR-Diagnostik wird durch Abbildung A4 im Anhang schematisch illustriert

5.4 Statistische Auswertung

Für eine genauere Datenanalyse wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit anhand aller Einzelmesswerte berechnet. Der bereits durch das Makro BGW7 bestimmte Mittelwert und seine Standardabweichung pro Biopsie wurden nicht einbezogen. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Auswertungsprogrammes PASW Statistics 18 für Microsoft Windows. Zur Beschreibung demografischer Angaben und histologischer Befunde wurden deskriptive Statistikmethoden eingesetzt. Korrelationen zwischen verschiedenen Parametern wurden anhand des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und eines linearen Regressionsmodells herausgearbeitet. Da die morphometrischen Messwerte keiner Normalverteilung unterlagen, erfolgte der Vergleich der Messwerte anhand des Friedman- und Wilcoxon-Tests. Der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test für zwei unabhängige Stichproben wurde für die Signifikanzprüfung von Unterschieden zwischen gebildeten Subpopulationen verwendet. Die statistische Signifikanz nominaler Variablen wurde mittels Cochran-Q-Test überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ galt als statistisch signifikant.

6 Ergebnisse

6.1 Messbare Gewebeschnitte für Fibrose, Kollagen Typ III und IV

Für die einzelnen Strukturen lag zu den definierten Erhebungszeitpunkten jeweils eine unterschiedliche Anzahl an messbaren Proben vor. In einigen Fällen konnten die Gewebeschnitte nicht mehr aufgefunden werden oder die Präparate enthielten nicht ausreichend Material zur Aufarbeitung. Zudem stellte sich die Färbung einiger Gewebeproben als qualitativ unzureichend für die histomorphometrischen Untersuchungen heraus. Zum FU 1 waren die meisten Gewebeproben für alle drei Färbungen auswertbar. Für die Null Biopsie war jeweils die geringste Anzahl an Schnitten vorhanden. Tabelle 4 gibt die Anzahl an auswertbaren EMB pro Komponente und Untersuchungszeitpunkt an.

Tabelle 4: Anzahl der messbaren Biopsien für Fibrose, Kollagen Typ III und IV pro FU

<i>Zeitpunkt</i>	<i>Gesamt</i>	<i>Fibrose</i>	<i>Kollagen Typ III</i>	<i>Kollagen Typ IV</i>
Null Bx	25/274 (9%)	19/242 (7%)	20/260 (8%)	23/258 (9%)
FU 1	77/274 (28%)	72/242 (28%)	74/260 (28%)	71/258 (28%)
FU 2	69/274 (25%)	67/242 (26%)	67/260 (26%)	67/258 (25%)
FU 3	57/274 (21%)	56/242 (22%)	55/260 (21%)	54/258 (21%)
FU 4	46/274 (17%)	42/242 (17%)	44/260 (17%)	43/258 (17%)
<i>gesamt</i>	274 (100%)	256 (100%)	260 (100%)	258 (100%)

FU – Follow Up; Null Bx – Null Biopsie

Die Analyse sollte neben dem individuellen Messverlauf der Fibrose und Kollagen Typ III bzw. IV auch Vergleiche der Strukturkomponenten untereinander ermöglichen. Durch die unterschiedliche Anzahl an vorliegenden Schnitten ergab sich jedoch die Gefahr der Ergebnisverzerrung, sobald mögliche Ausreißer der Messwerte nur für eine der untersuchten Strukturen vorlägen. Daher wurden die folgenden Auswertungen immer auf Basis der RV-EMB berechnet, für die Messungen aller drei EZM-Komponenten möglich waren. Daraus ergab sich folgende Anzahl an Gewebeproben pro FU (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Anzahl der in die Statistik eingegangenen Gewebeproben pro FU

<i>Zeitpunkt</i>	<i>Anzahl</i>
Null Bx	8% (18/242)
FU 1	27% (66/242)
FU 2	27% (66/242)
FU 3	22% (54/242)
FU 4	16 % (38/242)
<i>gesamt</i>	100% (242/242)

FU – Follow Up; Null Bx – Null Biopsie

6.2 Quantitative Messungen im Verlauf nach HTx

Die folgende Ergebnisdarstellung der quantitativen Vermessungen bezieht sich ausschließlich auf die prozentualen Anteile der Fibrose, Kollagen Typ III und IV. Bisherige Studien, auf die im Diskussionsteil der Arbeit eingegangen wird, beziehen sich ebenso auf Prozentwerte. Da die Messergebnisse in μm^2 nicht mit den Analysen anderer Forschungsgruppen verglichen werden können, sind sie im Ergebnisteil nicht aufgeführt. Zudem beschränken sich weiterführende statistische

Analysen im Hinblick auf verschiedene Einflussfaktoren oder Subpopulationen auf die ermittelte Gesamtfibrose. Die reine Fibrose sowie das Narbengewebe werden aufgrund einer fehlenden Vergleichbarkeit mit anderen Studien ausgeschlossen.

6.2.1 Fibrose

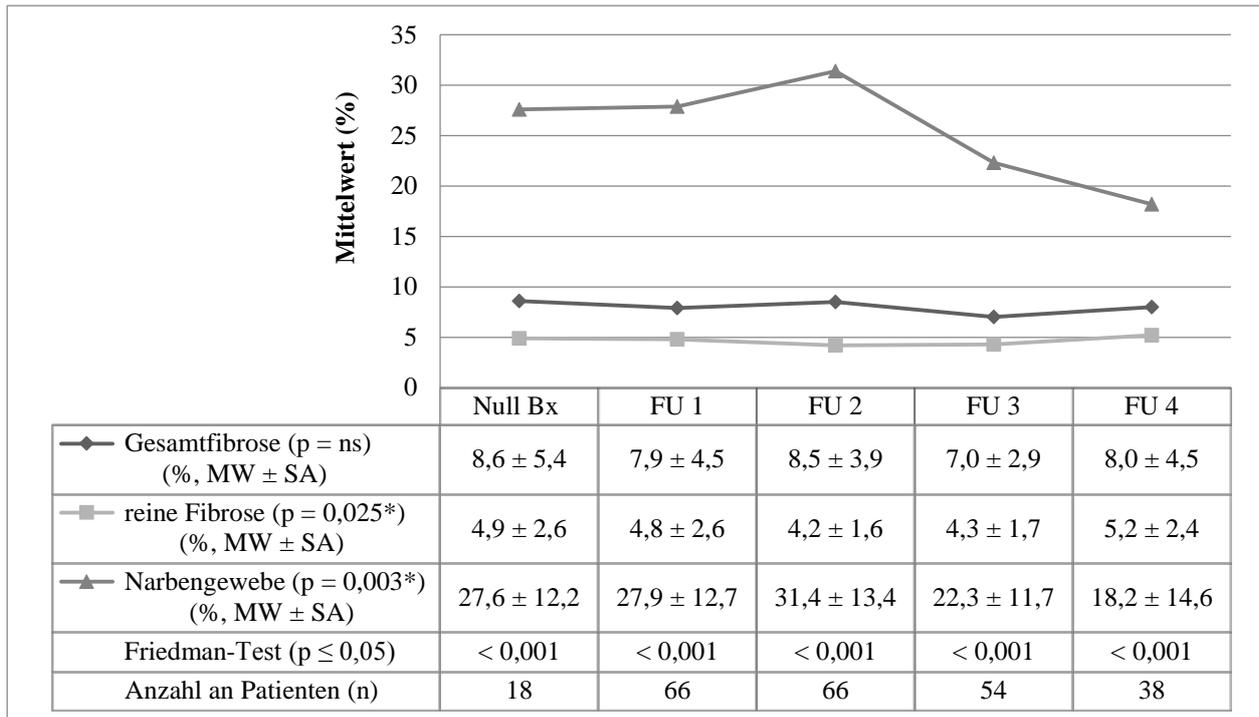
Zu allen Untersuchungszeitpunkten lag der gemessene Fibrosegehalt für die Mehrheit der Gewebeproben im definierten Normbereich von < 9% (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: mittlerer Gehalt von Fibrose (%) innerhalb des Normbereiches ($\leq 9\%$) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

<i>Fibrose (MW in %)</i>	<i>Null Bx (n = 18)</i>	<i>FU 1 (n = 66)</i>	<i>FU 2 (n = 66)</i>	<i>FU 3 (n = 54)</i>	<i>FU 4 (n = 38)</i>
$\leq 9\%$	67% (12/18)	68% (45/66)	65% (43/66)	80% (43/54)	66% (25/38)
10 – 20%	28% (5/18)	29% (19/66)	33% (22/66)	20% (11/54)	32% (12/38)
$\geq 21\%$	5% (1/18)	3% (2/66)	2% (1/66)	/	2% (1/38)
<i>gesamt</i>	100% (18/18)	100% (66/66)	100% (66/66)	100% (54/54)	100% (38/38)

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; Null Bx – Null Biopsie; % – Prozent

Die mittlere Fibrose-Rate zeigte im Beobachtungszeitraum einen fluktuierenden Verlauf. Im Vergleich zur intraoperativ entnommenen Null Bx gingen die Durchschnittswerte für die Gesamtfibrose und den Anteil an reiner Fibrose innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx (FU1) leicht zurück. Dahingegen stieg der mittlere Narbenanteil geringfügig an. Im ersten postoperativen Jahr (FU 2) erreichten sowohl die mittlere Gesamtfibrose ($8,5 \pm 3,9\%$) als auch das Narbengewebe ($31,4 \pm 13,4\%$) ihren Höchstwert. Der Anteil der reinen Fibrose ging weiter zurück auf $4,2 \pm 1,6\%$. Im mittelfristigen Verlauf (FU 3) lag die mittlere Gesamtfibrose auf ihrem niedrigsten Niveau ($7,0 \pm 2,9\%$). Da auch der gemessene Narbenanteil zurückging, stabilisierte sich der Stand der reinen Fibrose. Während die Gesamtfibrose im fünften Jahr post HTx (FU 4) auf dem Messniveau von FU 1 lag, zeigte die reine Fibrose bedingt durch einen deutlichen Rückgang des Narbengewebes ihren höchsten Wert nach Transplantation ($5,2 \pm 2,4\%$). Sowohl die Wertentwicklung der reinen Fibrose und des Narbenanteils als auch der Wertevergleich pro FU waren für den postoperativen Zeitverlauf statistisch signifikant. Abbildung 6 stellt die Fibrosemessung für den gesamten Untersuchungszeitraum vergleichend gegenüber.



* für den Zeitraum nach HTx

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 6: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose, reiner Fibrose und Narbengewebe (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

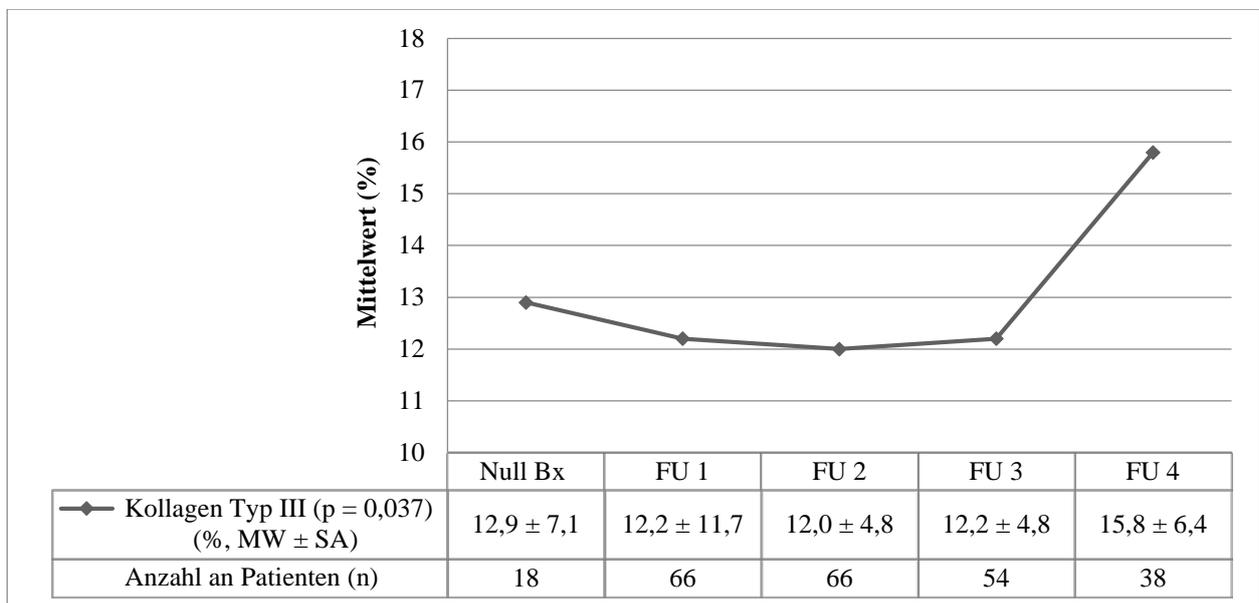
In Unterscheidung des Patientengeschlechts ließen sich mit Ausnahme von FU 2 keine statistisch signifikanten Unterschiede im Verlauf der mittleren Gesamtfibrose darstellen. Die Messwerte der Männer erreichten bereits im ersten Jahr nach HTx mit $8,9 \pm 4,0\%$ ihren Höchstwert. Der mittlere Fibrosegehalt bei den Frauen lag zu diesem Zeitpunkt nur bei $6,4 \pm 2,2\%$ ($p = 0,040$). Im weiteren Verlauf stieg er konsekutiv an ($p = 0,026$) und erreichte seinen höchsten Wert im fünften Jahr nach HTx ($9,8 \pm 3,6\%$).

In Abhängigkeit vom Überlebensstatus zum Zeitpunkt der Datenerhebung ergaben sich keine entscheidenden Unterschiede. Die mittlere Gesamtfibrose zeigte sowohl in der Gruppe der bereits verstorbenen als auch der noch lebenden Patienten einen ähnlichen Werteverlauf wie in der gesamten Patientenpopulation (siehe Abbildung 6).

Die Abbildungen A5 und A6 im Anhang geben die mittlere Gesamtfibrose in Prozent in Abhängigkeit vom Patientengeschlecht bzw. Überlebensstatus wider.

6.2.2 Kollagen Typ III

Der mittlere Prozentgehalt an Kollagen Typ III zeigte innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage einen leichten Rückgang von $12,9 \pm 7,1\%$ (Null Bx) auf $12,2 \pm 11,7\%$ (FU 1). Im Verlauf des ersten Jahres sanken die Messwerte weiter geringfügig ab, stabilisierten sich zum FU 3 mit $12,2 \pm 4,8\%$ jedoch wieder mittelfristig auf einem mit dem ersten postoperativen Untersuchungszeitpunkt vergleichbaren Niveau. Bis zum fünften Jahr post HTx steigerte sich der mittlere Kollagen-III-Gehalt deutlich. Dabei ergab sich eine statistische Signifikanz von $p = 0,037$ für den in Abbildung 7 veranschaulichten Beobachtungszeitraum.



FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 7: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

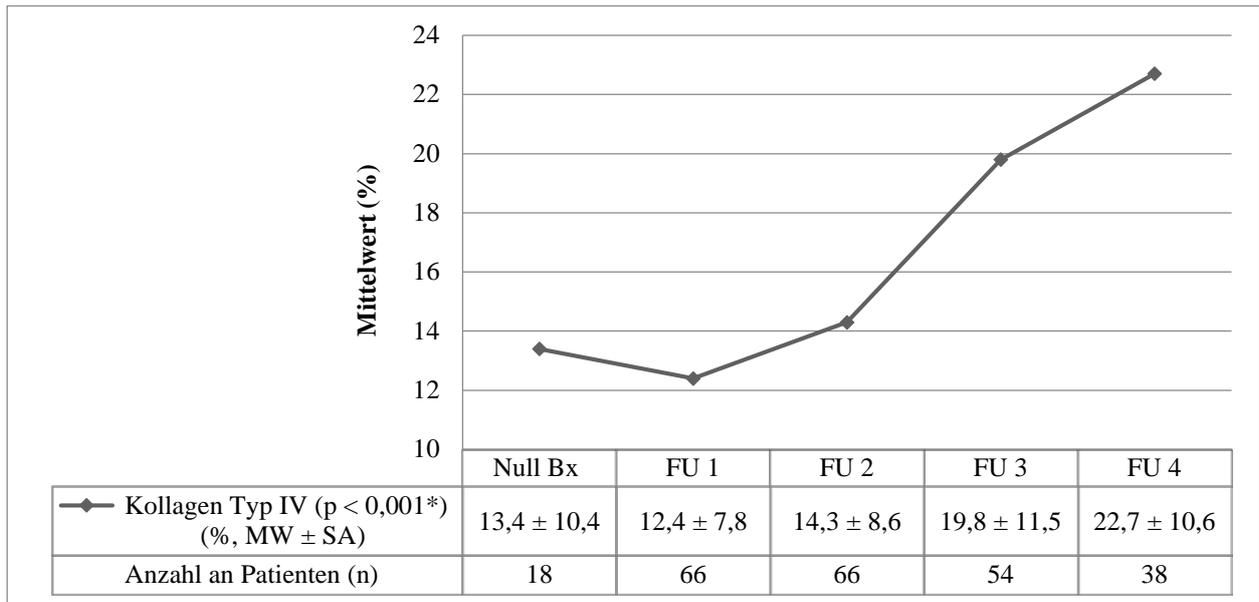
In Abhängigkeit vom Patientengeschlecht ergaben sich ausschließlich in der Frühphase nach HTx statistisch signifikante Unterschiede im Messverlauf von Kollagen Typ III. Zum FU 1 war bei 80% der Frauen ein mittlerer Kollagen-III-Gehalt von $< 10\%$ nachweisbar, während 60% der männlichen Studienpopulation Mittelwerte von $> 10\%$ erreichten ($p = 0,047$).

Im Vergleich von lebenden und verstorbenen Studienprobanden konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Durchschnittsrate an Kollagen Typ III ist in den Abbildungen A7 und A8 im Anhang jeweils nach Geschlecht bzw. Überlebensstatus gegenübergestellt.

6.2.3 Kollagen Typ IV

Analog zu den anderen EZM-Komponenten verzeichnete auch das Basalmembran-ständige Kollagen Typ IV im 30-tägigen Verlauf nach HTx einen geringfügigen Rückgang von $13,4 \pm 10,4\%$ (Null Bx) auf $12,4 \pm 7,8\%$ (FU 1). Anschließend zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Mittelwerte auf maximal $22,7 \pm 10,6\%$ im fünften postoperativen Jahr ($p < 0,001$). Abbildung 8 veranschaulicht die Progression der mittleren Kollagen-IV-Rate für den gesamten Untersuchungszeitraum.

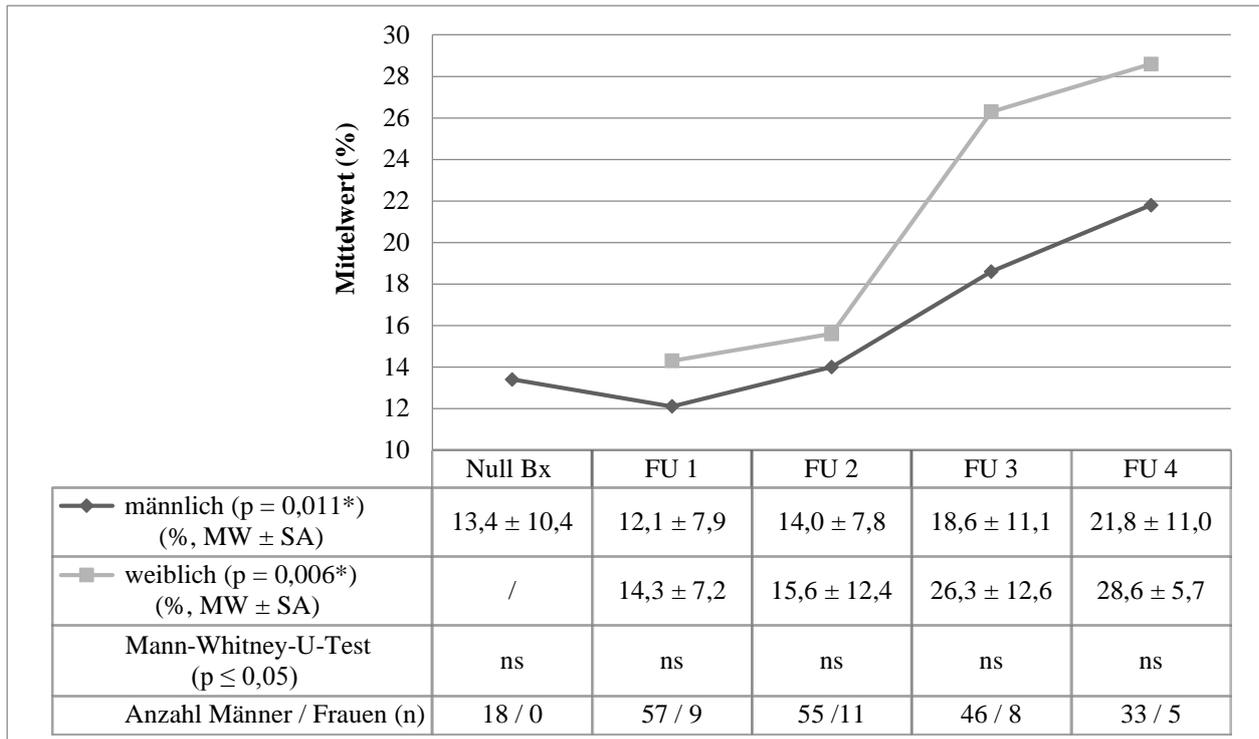


* für den Zeitraum nach HTx

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 8: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Die kontinuierliche Zunahme des mittleren Kollagen-IV-Gehaltes zeigte sich sowohl bei Männern als auch Frauen (Männer: $p = 0,011$; Frauen: $p = 0,006$; siehe Abbildung 9). Zum abschließenden FU 4 wiesen die weiblichen Studienpatienten dabei ein stärker ausgeprägtes Kollagen Typ IV auf als die Männer. So lag der Durchschnittswert bei allen Frauen über einem Mittel von 20%, während er bei der Mehrheit der Männer (55%) mit einem Wert unterhalb von 20% gemessen wurde ($p = 0,014$).



* für den Zeitraum nach HTx

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 9: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit vom Geschlecht in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

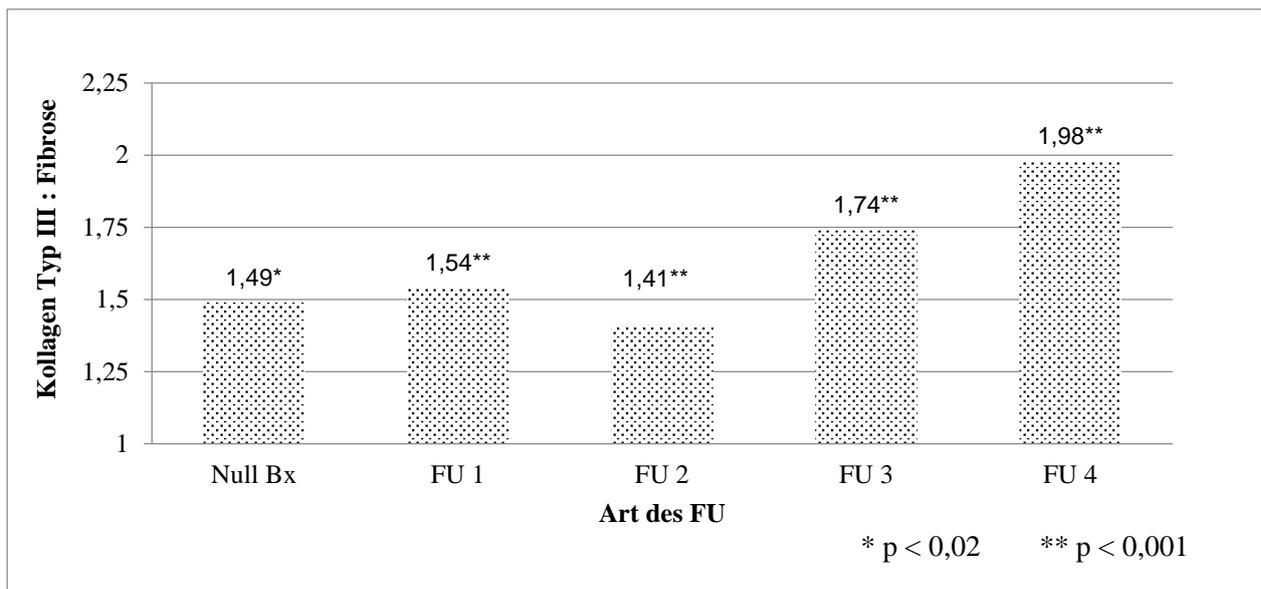
In Unterscheidung des Überlebensstatus erwies sich der mittlere Anteil an Kollagen Typ IV zur Null Bx bei den verstorbenen Patienten als signifikant niedriger als bei den Lebenden ($5,6 \pm 4,6\%$ vs. $16,4 \pm 10,5\%$; $p = 0,021$). Im postoperativen Zeitraum nahm der Messwert in beiden Gruppen stetig zu (lebende Patienten: $p < 0,001$; verstorbene Patienten: $p = 0,255$). Aus Abbildung A9 im Anhang geht hervor, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen lebenden und verstorbenen Patienten herausgearbeitet werden konnten.

6.3 Vergleich der dargestellten Strukturen

6.3.1 Vergleich von Fibrose und Kollagen Typ III

Die Ergebnisse der Sirius-Rot gefärbten Gesamtfibrose wurden anhand des Wilcoxon-Tests mit dem immunhistochemisch aufbereiteten Kollagen Typ III verglichen. Im gesamten Beobachtungszeitraum überstiegen die Mittelwerte des interstitiellen Kollagens dabei die der myokardialen Fibrose ($p = 0,029$). Bereits zum Zeitpunkt der HTx wurden Kollagen-III-Fasern um das 1,49fache stärker nachgewiesen als fibrotische Läsionen ($p < 0,02$). Im ersten postoperativen Jahr zeigte sich

dieses Verhältnis weitestgehend konstant mit Werten von 1,54 (FU 1) bzw. 1,41 (FU 2; $p < 0,001$). Für den mittel- und langfristigen Verlauf nahm die Tendenz zugunsten von Kollagen III weiterhin zu. Zum FU 3 ging der durchschnittliche Fibrosegehalt leicht zurück. Dahingegen stieg die mittlere Rate an Kollagen Typ III an, sodass sich das Verhältnis beider Strukturen auf 1,74 belief ($p < 0,001$). Im fünften Jahr nach HTx nahm der mittlere Kollagen-III-Gehalt noch einmal stärker zu als die durchschnittliche Gesamtfibrose. Zum FU 4 überstieg der Anteil von Kollagen Typ III somit den Anteil der Gesamtfibrose um das 1,98fache ($p < 0,001$). Abbildung 10 stellt das Verhältnis beider Strukturen im Untersuchungsverlauf dar.



FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau

Abbildung 10: Verhältnis von Kollagen Typ III im Vergleich zur Gesamtfibrose in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4; $p = 0,029$)

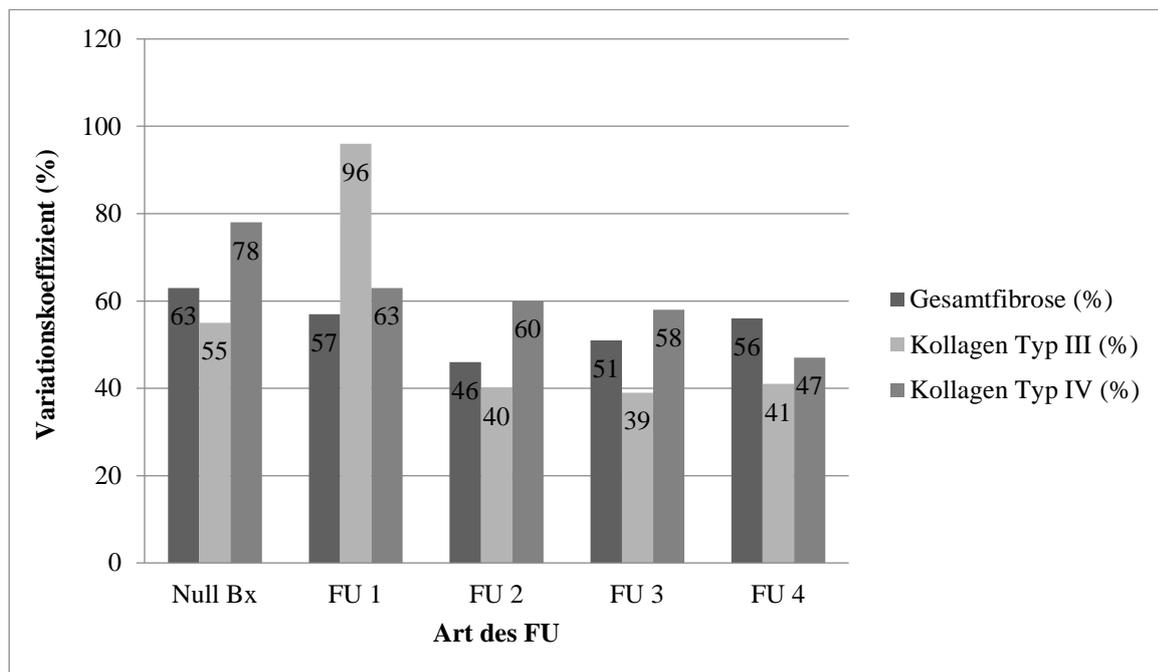
Anhand des Korrelationskoeffizienten nach Spearman ergab sich zwischen den beiden gemessenen EZM-Komponenten sowohl zum Zeitpunkt der HTx (Null Bx) als auch im ersten und fünften Jahr nach HTx (FU 2 und FU 4) ein relativ stark ausgeprägter, positiver Zusammenhang (Null Bx: $r = 0,609$; $p = 0,007$ vs. FU 2: $r = 0,541$; $p < 0,001$ vs. FU 4: $r = 0,449$; $p = 0,005$).

6.3.2 Gegenüberstellung aller drei Parameter

Im gesamten Untersuchungszeitraum nahm der durchschnittliche Anteil an Kollagen Typ III und IV deutlicher zu als die Gesamtfibrose ($p = 0,008$). Die mittlere Rate der Sirius-Rot gefärbten Fibrose blieb auf einem relativ gleichbleibenden Niveau von minimal 7,0% (FU 3) bis hin zu 8,6% (Null Bx, siehe Abbildung 6 im Abschnitt 6.2.1). In der immunhistochemischen Färbung von Kollagen Typ III zeigte sich demgegenüber eine stetige Steigerung der gemessenen Mittelwerte von

12,0% im ersten Jahr nach HTx (FU 2) bis auf 15,8% zum abschließenden FU 4 (siehe Abbildung 7 im Abschnitt 6.2.2). Infolgedessen erhöhte sich das Verhältnis zwischen Kollagen Typ III und der Gesamtfibrose im fünften Jahr nach Transplantation auf eine nahezu doppelte Rate an kollagenen Fasern (siehe Abbildung 10 im Abschnitt 6.3.1). Der mittlere Anteil an Kollagen Typ IV stieg im postoperativen Verlauf noch deutlicher und erreichte zu allen Erhebungszeitpunkten die höchsten Messwerte der drei Parameter. Beginnend bei durchschnittlich 12,4% (FU 1) wurde im langfristigen Zeitverlauf eine mittlere Rate von 22,7% (FU 4) gemessen (siehe Abbildung 8 im Abschnitt 6.2.3). Dies entspricht einer Steigerung um das 1,8fache.

Zum Vergleich der Mittelwertstreuung aller drei Parameter wurde der Variationskoeffizient angewendet. Er berechnet sich aus der Standardabweichung des Mittelwertes dividiert durch selbigen und kann in Prozent angegeben werden. Als unabhängiger Parameter trifft er Aussagen über die Streubreite der gemessenen Werte und dient zur Normierung der entsprechenden Standardabweichung. Die unterschiedliche Ausprägung der Variationskoeffizienten zwischen der mittleren Gesamtfibrose und den beiden Kollagentypen wird anhand von Abbildung 11 in einem Säulendiagramm veranschaulicht.



FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; Null Bx – Null Biopsie; % – Prozent

Abbildung 11: Variationskoeffizienten für die Mittelwerte von Gesamtfibrose, Kollagen Typ III und IV (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Zum Transplantationszeitpunkt (Null Bx) unterlag Kollagen Typ III der niedrigsten Streuung der drei EZM-Komponenten (55% vs. Gesamtfibrose: 63% vs. Kollagen Typ IV: 78%). Im anschließenden Beobachtungszeitraum variierte das Verhältnis der ermittelten Streubreiten stark. So stieg

der Variationskoeffizient für Kollagen Typ III innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx deutlich an und unterlag mit einem Faktor von 96% einer sehr starken Variabilität. Im Gegensatz dazu nahmen die Streubreiten der Gesamtfibrose (57%) und Kollagen Typ IV (63%) ab. Über das erste Jahr nach HTx hinaus hielt sich die Streuung von Kollagen Typ III relativ konstant auf einem Niveau von 40% und wies somit die geringste Streuung unter den Parametern auf. Dahingegen sanken die Streubreiten der Gesamtfibrose und von Kollagen IV auch mittelfristig (FU 2, FU 3). Im fünften Jahr nach HTx reduzierte sich der Variationskoeffizient von Kollagen Typ IV auf 47%. Demgegenüber verzeichnete die mittlere Gesamtfibrose einen Anstieg der Streubreite und zeigte somit langfristig die ausgeprägteste Streuung der drei Parameter (56% vs. Kollagen III: 41%).

6.4 Vergleich der histomorphometrischen Ergebnisse anhand des Alters

6.4.1 Beziehung zwischen Empfänger- und Spenderalter

Nach der quantitativen Entwicklung von Fibrose, Kollagen Typ III und IV wurde analysiert, ob eine Beziehung zwischen den ermittelten Messverläufen und dem Alter des Transplantatspenders besteht. Anhand der Relation von Spender- und Patientenalter zum Zeitpunkt der HTx wurden drei Untergruppen gebildet. Empfänger mit einer Altersdifferenz von ± 10 Jahren zu ihrem Organspender wurden als gleichaltrig angesehen. Die weiteren Subgruppen setzten sich aus den Patienten zusammen, die mindestens 10 Jahre jünger bzw. älter als ihre Spender waren. Die letztgenannte Gruppe stellte dabei mit ca. 47% den größten Anteil (siehe Tabelle 7).

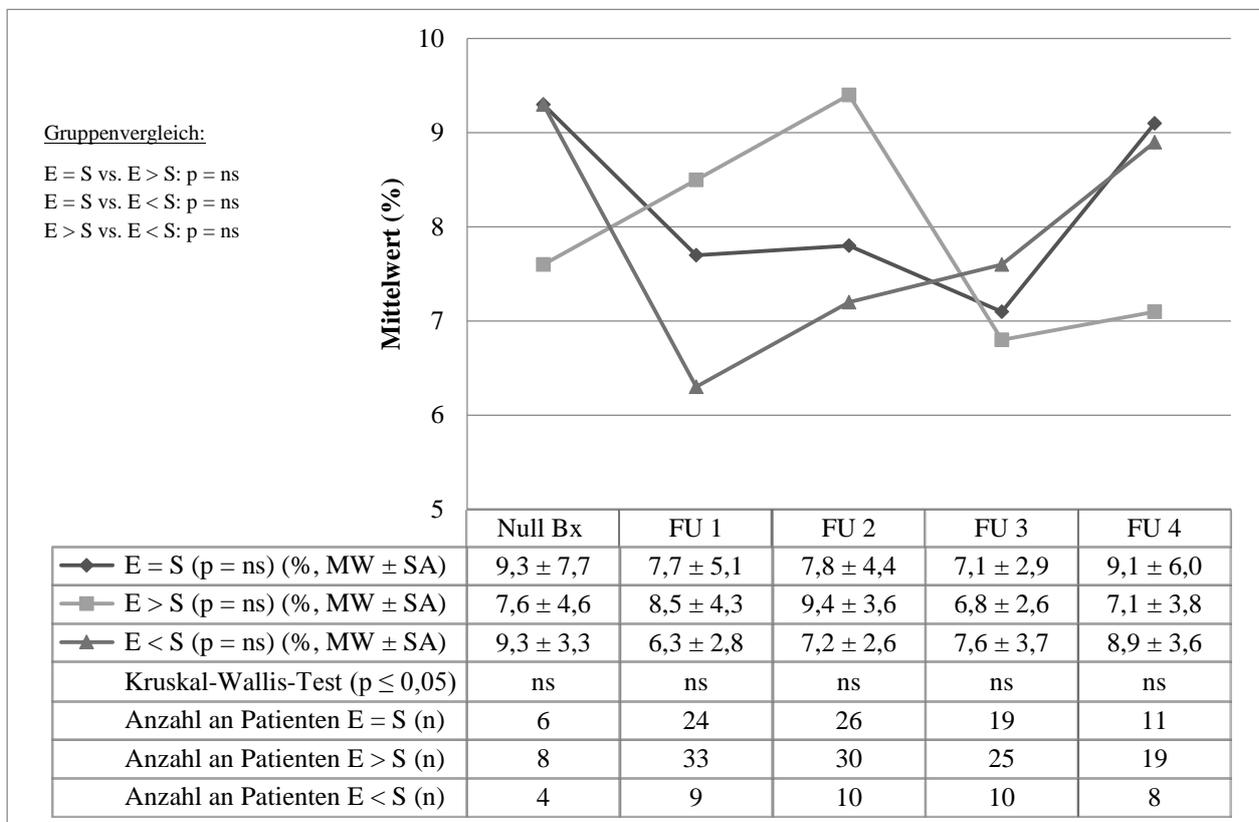
Tabelle 7: Einteilung der Studienpopulation anhand der Differenz zum Spenderalter

<i>Gruppe</i>	Empfänger (E) – Spender (S)	<i>Anzahl (n = 78)</i>
E = S	E und S gleichen Alters	40% (31/78)
E > S	E > 10 Jahre älter als S	47% (37/78)
E < S	E > 10 Jahre jünger als S	13% (10/78)
<i>gesamt</i>		100% (78/78)

E – Empfänger; n – Anzahl an Patienten; S – Spender

Der Verlauf der mittlere Gesamtfibrose gestaltete sich in den Gruppen sehr unterschiedlich. Zum Zeitpunkt der HTx war sie bei den älteren Transplantatempfängern mit $7,6 \pm 4,6\%$ geringer ausgeprägt als in der gleichaltrigen und jüngeren Gruppe ($9,3 \pm 7,7\%$ und $9,3 \pm 3,3\%$). Während die Messwerte der beiden letztgenannten Gruppen innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx sanken, stieg der Anteil fibrotischer Läsionen in der älteren Gruppe an. Auch im weiteren Verlauf setzte

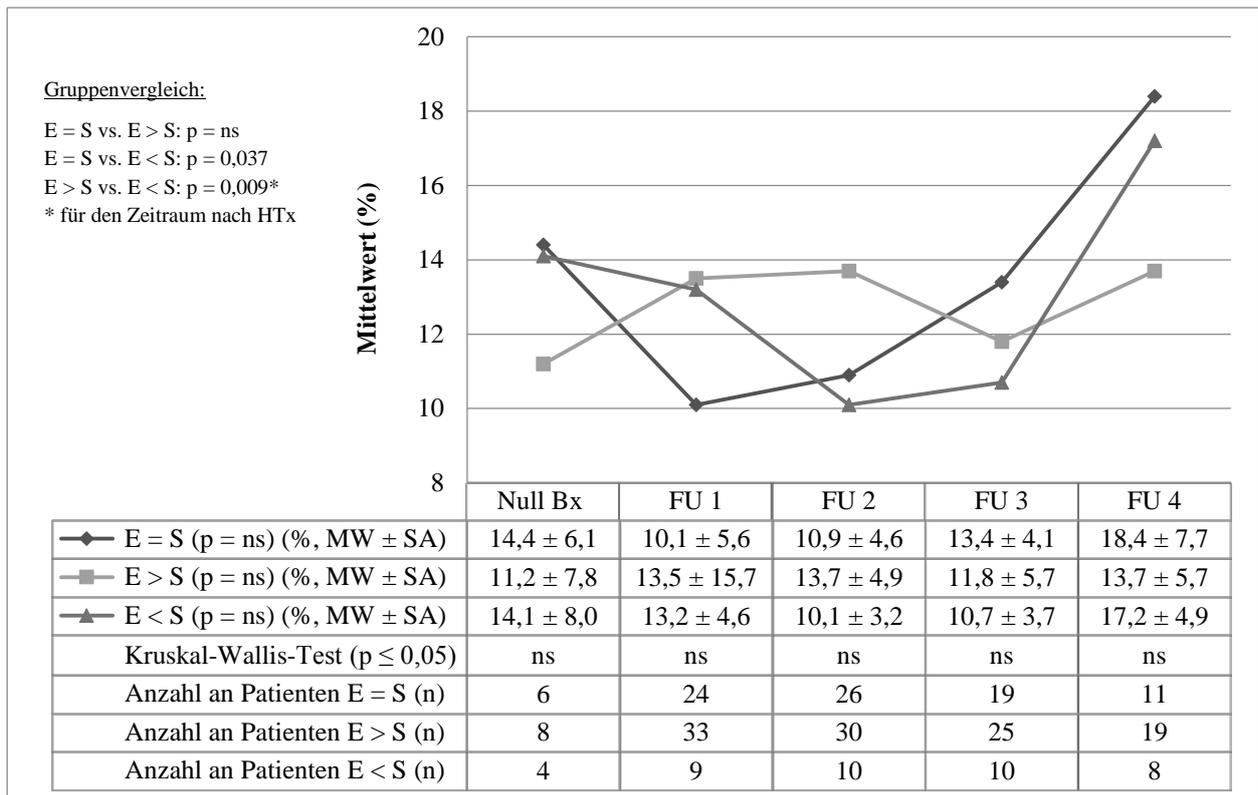
sich dieser Trend fort, sodass die älteren Empfänger zum FU 2 mit $9,4 \pm 3,6\%$ einen deutlich höheren Mittelwert zeigten als die beiden Vergleichsgruppen (gleichaltrige Empfänger: $7,8 \pm 4,4\%$; jüngere Empfänger: $7,2 \pm 2,6\%$). In allen drei Gruppen stiegen die Mittelwerte bis zum fünften Jahr post HTx an. Dabei waren fibrotische Veränderungen in der gleichaltrigen Subgruppe am stärksten ausgeprägt ($9,1 \pm 6,0\%$). Die durchschnittliche Fibroserate der jüngeren Transplantatempfänger lag mit $8,9 \pm 3,6\%$ auf einem ähnlichen Level. Mit $7,1 \pm 3,8\%$ nahm die mittlere Gesamtfibrose in der älteren Gruppe den geringsten Wert an. Es ergaben sich weder für den Verlauf innerhalb der Untergruppen noch für die ermittelten Unterschiede eine statistische Signifikanz. Abbildung 12 veranschaulicht den Verlauf des mittleren Fibrosegehaltes in Unterscheidung der Altersdifferenz zwischen Empfänger und Spender.



E – Empfänger; FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; S – Spender; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 12: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in Abhängigkeit von der Altersdifferenz zwischen Transplantatempfänger und -spender in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Die Entwicklung des Kollagen-III-Gehaltes zeigte innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx einen ähnlichen Trend wie der oben dargestellte Verlauf der mittleren Gesamtfibrose. Die Mittelwerte der gleichaltrigen und jüngeren Empfänger lagen bei HTx auf einem vergleichbaren Messniveau ($14,4 \pm 6,1\%$ bzw. $14,1 \pm 8,0\%$). Dahingegen präsentierte die ältere Gruppe mit $11,2 \pm 7,8\%$ den tiefsten Messwert zum Zeitpunkt der HTx. Während des ersten postoperativen Jahres stieg der durchschnittliche Kollagen-III-Gehalt der älteren Gruppe leicht an und stabilisierte sich mit $13,5 \pm 15,7\%$ (FU 1) bzw. $13,7 \pm 4,9\%$ (FU 2) auf einem höheren Level als in den anderen Subgruppen, deren Messwerte absanken. So erreichte der mittlere Anteil von Kollagen Typ III im ersten Jahr nach HTx sowohl bei den gleichaltrigen als auch jüngeren Empfängern den individuell geringsten Stand im postoperativen Beobachtungszeitraum ($10,9 \pm 4,6\%$ bzw. $10,1 \pm 3,2\%$). Ab dem dritten Jahr nach HTx zeichnete sich für die letztgenannten Empfängergruppen ein steigender Trend ab. Dahingegen ließ die mittlere Rate an Kollagen Typ III in der älteren Gruppe nur geringfügige Schwankungen erkennen. Zum FU 4 erreichte der Kollagen-III-Anteil bei den Gleichaltrigen mit $18,4 \pm 7,7\%$ den höchsten Anteil im Gruppenvergleich. Die Biopsien der älteren Transplantatempfänger wiesen mit $13,7 \pm 5,7\%$ den geringsten Gehalt auf. Weder für die individuellen Verläufe noch die generellen Unterschiede zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten konnte eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Der Vergleich zwischen gleichaltrigen und jüngeren Empfängern sowie zwischen Jüngeren und Älteren war allerdings statistisch signifikant ($p = 0,037$ bzw. $p = 0,009$). Abbildung 13 verdeutlicht den Messverlauf des mittleren Kollagen Typ III in Abhängigkeit von der Altersdifferenz.

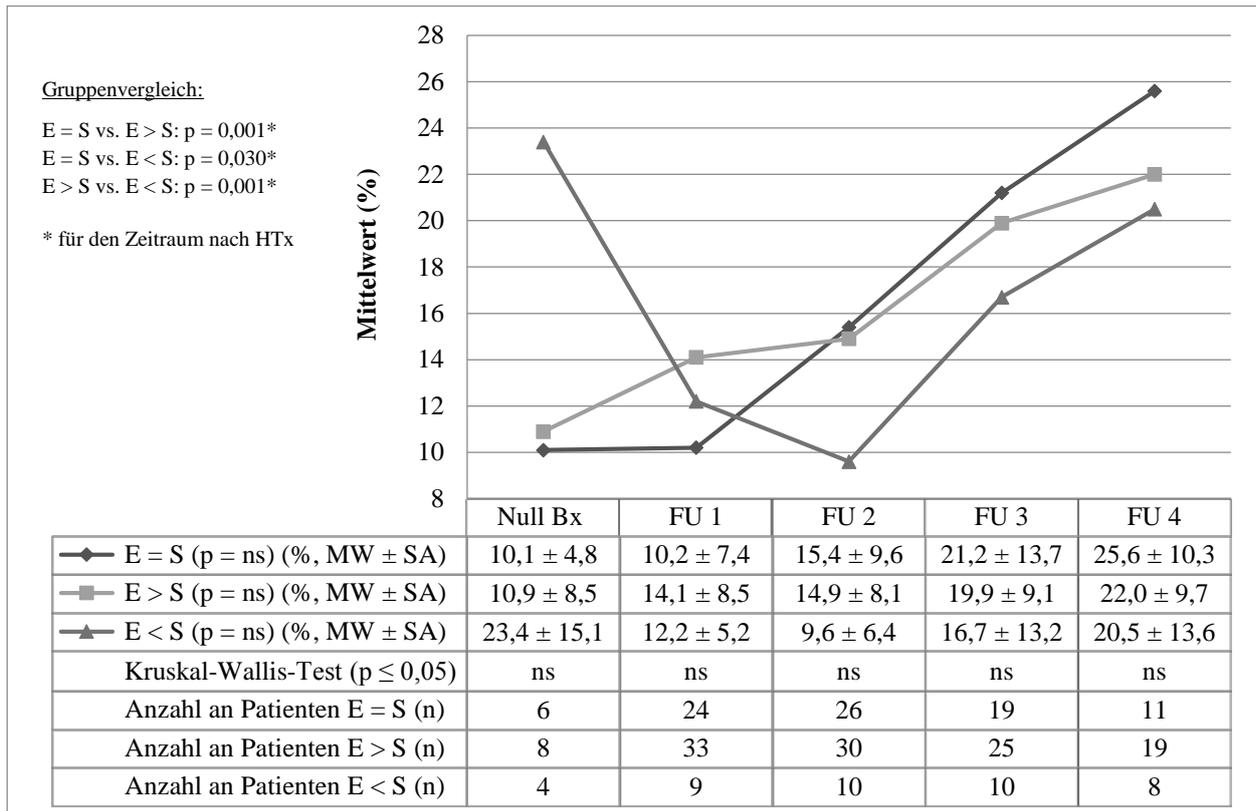


E – Empfänger; FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; b – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; S – Spender; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 13: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in Abhängigkeit von der Altersdifferenz zwischen Transplantatempfänger und -spender in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Hinsichtlich Kollagen Typ IV zeigten alle drei Gruppen ähnliche postoperative Verlaufstrends. Zum Zeitpunkt der HTx lag der mittlere Kollagen-IV-Anteil in der jüngeren Empfängergruppe deutlich über den anderen Subgruppen ($23,4 \pm 15,1\%$ vs. ältere Empfänger: $10,9 \pm 8,5\%$ vs. gleichaltrige Empfänger: $10,1 \pm 4,8\%$). Durch eine konsekutive Reduktion der Mittelwerte im ersten postoperativen Jahr wiesen die Gewebeproben jüngerer Transplantatempfänger zum FU 2 den geringsten Anteil an Kollagen Typ IV auf ($9,6 \pm 6,4\%$). Dahingegen verzeichnete die Gruppe der älteren Empfänger innerhalb des ersten postoperativen Jahres eine kontinuierliche Zunahme der gemessenen Werte. Zum FU 2 lag der mittlere Gehalt an Kollagen IV mit $14,9 \pm 8,1\%$ in dieser Gruppe nur geringgradig unter der gleichaltrigen Gruppe ($15,4 \pm 9,6\%$). Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich in allen drei Gruppen ein steigender Trend, sodass im fünften postoperativen Jahr der jeweils individuelle Höchstwert erreicht wurde. Im Vergleich zur Null Bx nahm der durchschnittliche Kollagen-IV-Gehalt in der gleichaltrigen Gruppe dabei um das 2,5fache zu und lag mit $25,6 \pm 10,3\%$ über dem ermittelten Anteil der älteren ($22,0 \pm 9,7\%$) und jüngeren Gruppe ($20,5 \pm$

13,6%). Die Wertentwicklung der älteren Patientengruppe war statistisch signifikant, während sich die Verläufe der beiden anderen Gruppen und die Messwertunterschiede zu den FUs als statistisch nicht signifikant herausstellten. Ein Vergleich der generellen Entwicklung des Kollagen-IV-Anteils zwischen gleichaltrigen und jüngeren ($p = 0,001$), gleichaltrigen und älteren ($p = 0,030$) sowie jüngeren und älteren Transplantatempfängern ($p = 0,001$) konnte jedoch als statistisch plausibel bewiesen werden. Abbildung 14 stellt die Entwicklung von Kollagen Typ IV unter Berücksichtigung der Altersunterschiede zwischen Empfänger und Spender bei HTx gegenüber.



E – Empfänger; FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; b – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; S – Spender; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 14: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit von der Altersdifferenz zwischen Transplantatempfänger und -spender in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

6.4.2 Altersstruktur der Studienpopulation zum Zeitpunkt der HTx

Es sollte untersucht werden, ob das Patientenalter bei Transplantation möglicherweise unabhängig vom Alter des Spenders Einfluss auf die postoperative Entwicklung der drei EZM-Komponenten nimmt. Dazu wurde die Studienpopulation in eine junge ($\geq 18, < 40$ Jahre), mittelalte ($\geq 40, \leq 59$

Jahre) und ältere (≥ 60 Jahre bei HTx) Patientengruppe eingeteilt. Dabei war die Mehrheit der Patienten (59%) bei ihrer Transplantation zwischen 40 und 59 Jahren alt (siehe Tabelle 8).

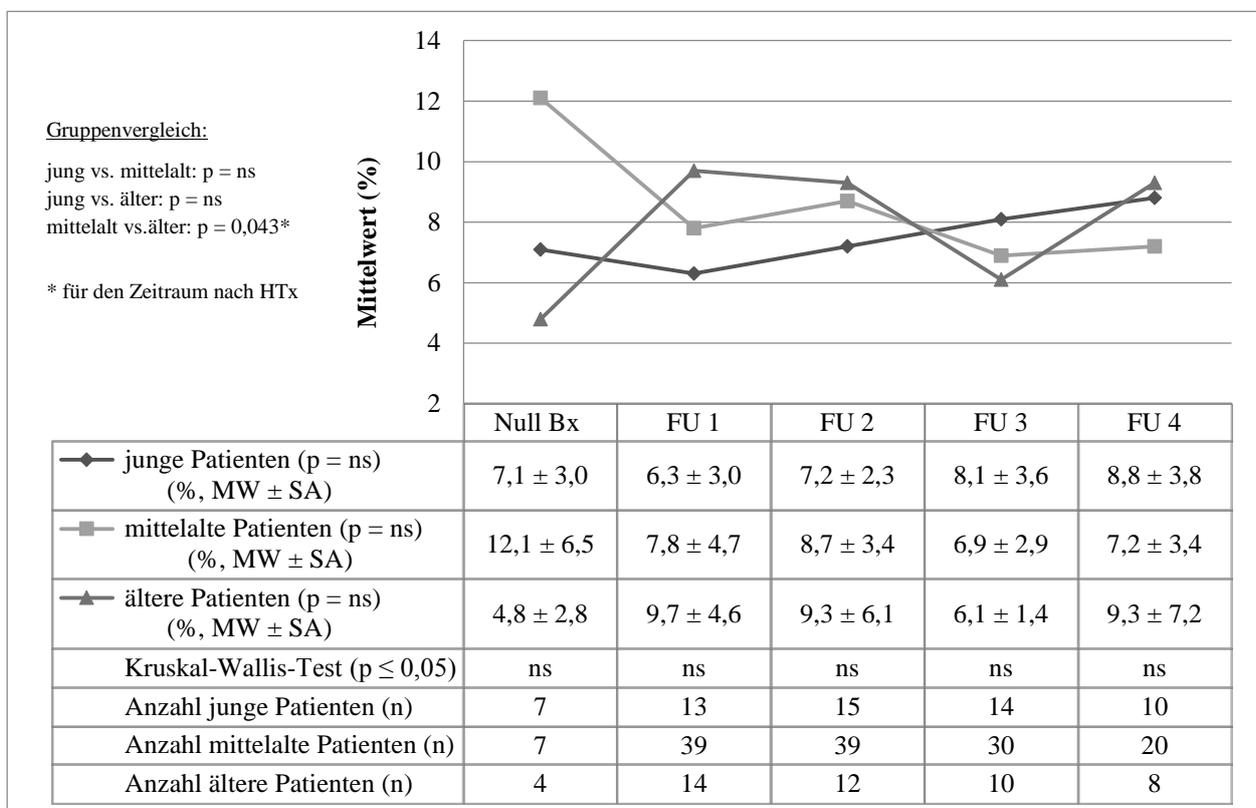
Tabelle 8: Einteilung der Studienpopulation anhand des Alters bei HTx

<i>Gruppe</i>	<i>Alter zum Zeitpunkt der HTx</i>	<i>Anzahl an Patienten (n = 78)</i>
Jung	$\geq 18, < 40$ Jahre	19% (15/78)
Mittelalt	$\geq 40, \leq 59$ Jahre	59% (46/78)
Älter	≥ 60 Jahre	22% (17/78)
<i>gesamt</i>		100% (78/78)

HTx – Herztransplantation; n – Anzahl an Patienten; % – Prozent

Die postoperative Entwicklung des mittleren Fibrosegehaltes stellte sich in den Altersgruppen unterschiedlich dar. Die Gruppe der unter 40 Jährigen zeigte nach einem Rückgang fibrotischer Läsionen von $7,1 \pm 3,0\%$ (Null Bx) auf $6,3 \pm 3,0\%$ (FU 1) den geringsten Anteil an Fibrose im kurzfristigen postoperativen Intervall. Im weiteren Verlauf stieg die durchschnittliche Gesamtfibrose in dieser Gruppe jedoch kontinuierlich an und erreichte zum FU 4 ihren Höchstwert von $8,8 \pm 3,8\%$. Im langfristigen Zeitraum entwickelten Patienten, die zum Zeitpunkt ihrer Transplantation unter 40 Jahre alt waren, somit im Durchschnitt statistisch signifikant mehr Fibrose als die Gesamtpopulation ($8,0 \pm 4,5\%$; siehe Abbildung 6 im Abschnitt 6.2.1; $p < 0,001$). In der Gruppe der Patienten zwischen 40 und 59 Jahren ähnelte der Verlauf der mittleren Fibrose der in Abschnitt 6.2.1 dargestellten Gesamtpopulation. Bei HTx wiesen sie mit $12,1 \pm 6,5\%$ den höchsten Stand an mittlerer Fibrose im Altersvergleich auf. In den ersten postoperativen Wochen (FU 1) sank die Fibroserate deutlich ab ($7,8 \pm 4,7\%$) und zeigte im weiteren Verlauf schwankende Werte. So wurde der postoperative Höchststand bereits im ersten Jahr nach HTx erreicht (FU 2: $8,7 \pm 3,4\%$). Zum FU 3 wurde ein individueller Tiefststand von $6,9 \pm 2,9\%$ vermessen, der auf einem gleichen Niveau mit der mittleren Fibroserate der Gesamtpopulation lag ($7,0 \pm 2,9\%$; siehe Abbildung 6 im Abschnitt 6.2.1). Im fünften Jahr nach HTx verzeichnete der durchschnittliche Fibrosegehalt in der mittelalten Patientengruppe einen geringfügigen Anstieg auf $7,2 \pm 3,4\%$. Damit lag er weiterhin unter dem Ausgangsergebnis bei Transplantation und stellte sich statistisch signifikant niedriger dar als in der Gesamtpopulation ($8,0 \pm 4,5\%$; siehe Abbildung 6 im Abschnitt 6.2.1; $p < 0,001$). Die Patienten, die zum Zeitpunkt der HTx bereits mindestens 60 Jahre alt waren, wiesen nicht nur im Gruppenvergleich den niedrigsten Fibrosegehalt bei HTx auf, sondern lagen auch signifikant unter der durchschnittlichen Fibroserate der Gesamtpopulation ($4,8 \pm 2,8\%$ vs. $8,6 \pm 5,4\%$; siehe Abbildung 6 im Abschnitt 6.2.1; $p = 0,041$). Kurzfristig nach HTx stieg der Anteil fibrotischer

Läsionen in der älteren Patientengruppe stark signifikant an und lag zum FU 1 auf einem individuellen Höchststand von $9,7 \pm 4,6\%$ ($p < 0,001$). Bis zum dritten Jahr nach HTx sank der mittlere Anteil der Gesamtfibrose bei den älteren Patienten wieder ab, bewegte sich im fünften Jahr nach HTx mit $9,3 \pm 7,2\%$ jedoch wieder auf einem ähnlichen Messniveau wie im ersten postoperativen Jahr. Im Vergleich zur gesamten Patientenpopulation stellte sich dies als statistisch signifikant erhöht heraus ($8,0 \pm 4,5\%$; siehe Abbildung 6 im Abschnitt 6.2.1; $p = 0,009$). Die individuellen Messverläufe und die Unterschiede zwischen den Altersgruppen zu den einzelnen FUs ließen sich nicht als statistisch signifikant herausarbeiten. Lediglich der postoperative Wertevergleich zwischen mittelalten und älteren Patienten zeigte sich signifikant ($p = 0,043$). Abbildung 15 fasst den Werteverlauf der mittlere Fibrose im Altersvergleich der Patienten zusammen.



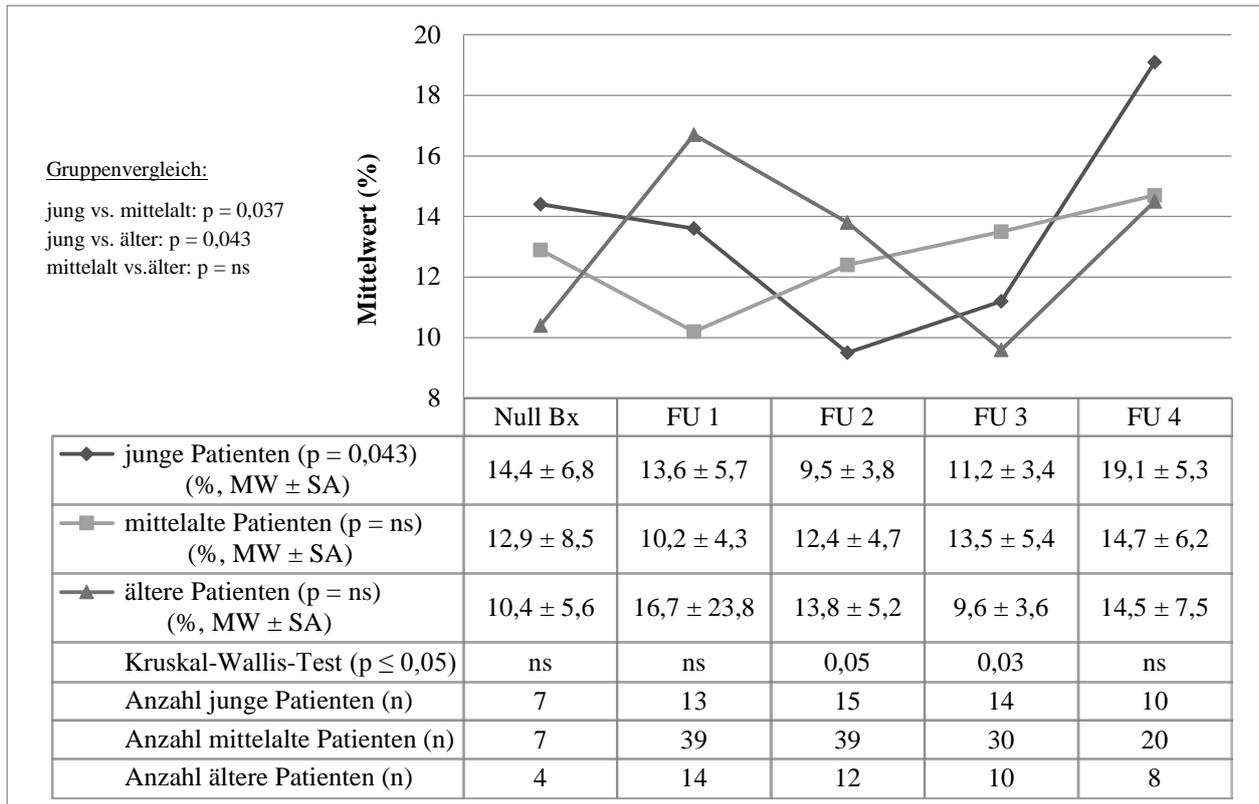
FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 15: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in Abhängigkeit vom Patientenalter bei HTx in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Auch die Entwicklung der mittleren Rate an Kollagen Typ III gestaltete sich in allen drei Patientengruppen unterschiedlich. Analog zur Gesamtpopulation (siehe Abschnitt 6.2.2) sanken die Messwerte der jungen Patienten während des ersten postoperativen Jahres bis auf $9,5 \pm 3,8\%$ (FU

2). Im weiteren Verlauf nahm der Mittelwert für Kollagen III in den Biopsien der jungen Patientengruppe kontinuierlich zu und lag im fünften postoperativen Jahr mit einem Höchststand von $19,1 \pm 5,3\%$ statistisch signifikant über dem Wert der Gesamtpopulation ($15,8 \pm 6,4\%$; siehe Abbildung 7 im Abschnitt 6.2.2; $p < 0,001$). Im langfristigen Gruppenvergleich bildeten Patienten, die zum Transplantationszeitpunkt unter 40 Jahre alt waren, somit nicht nur mehr Fibrose sondern auch mehr interstitielles Kollagen Typ III aus als Patienten, die über 40 Jahre alt waren. Der durchschnittliche Kollagen-III-Gehalt in der Patientengruppe zwischen 40 und 59 Jahren nahm nach einem Rückgang innerhalb der ersten 30 Tage im weiteren Zeitverlauf nach HTx kontinuierlich zu. Zum abschließenden FU 4 lag der durchschnittliche Anteil von Kollagen Typ III bei mittelalten Patienten mit $14,7 \pm 6,2\%$ dennoch statistisch signifikant unter der gesamten Patientengruppe ($15,8 \pm 6,4\%$; siehe Abbildung 7 im Abschnitt 6.2.2; $p < 0,001$). Der kollagene Werteverlauf bei älteren Patienten zeigte sich eher fluktuierend. In ihrer Null Bx wiesen sie mit $10,4 \pm 5,6\%$ noch den geringsten Anteil an Kollagen Typ III im Gruppenvergleich auf. Innerhalb der ersten postoperativen Wochen erreichten die Messwerte jedoch einen Spitzenstand von $16,7 \pm 23,8\%$. Somit lag dieser 30 Tage nach HTx nicht nur deutlich über den beiden jüngeren Patientengruppen, sondern auch statistisch signifikant über der gesamten Patientenpopulation ($12,2 \pm 11,7\%$; siehe Abbildung 7 im Abschnitt 6.2.2; $p = 0,021$). Anschließend nahm der mittlere Anteil an Kollagen Typ III in den Gewebeproben der älteren Patienten kontinuierlich ab. Im fünften Jahr nach HTx zeigten sie unter langfristigen Bedingungen mit durchschnittlich $14,5 \pm 7,5\%$ die geringste Rate im Altersvergleich. Auch im Vergleich mit der Gesamtpopulation entwickelten ältere Patienten im fünfjährigen postoperativen Verlauf statistisch signifikant weniger Kollagen Typ III ($15,8 \pm 6,4\%$; siehe Abbildung 7 im Abschnitt 6.2.2; $p = 0,001$).

Die Analyse ergab für die Wertentwicklung der jungen Patientengruppe eine Signifikanz von $p = 0,043$. Auch die Unterschiede zwischen den Gruppen zum FU2 und FU 3 sowie der Vergleich zwischen jungen und mittelalten bzw. jungen und alten Patienten ließen sich als statistisch signifikant beweisen. Abbildung 16 zeigt die Werteverläufe von Kollagen Typ III entsprechend der gebildeten Altersgruppen.



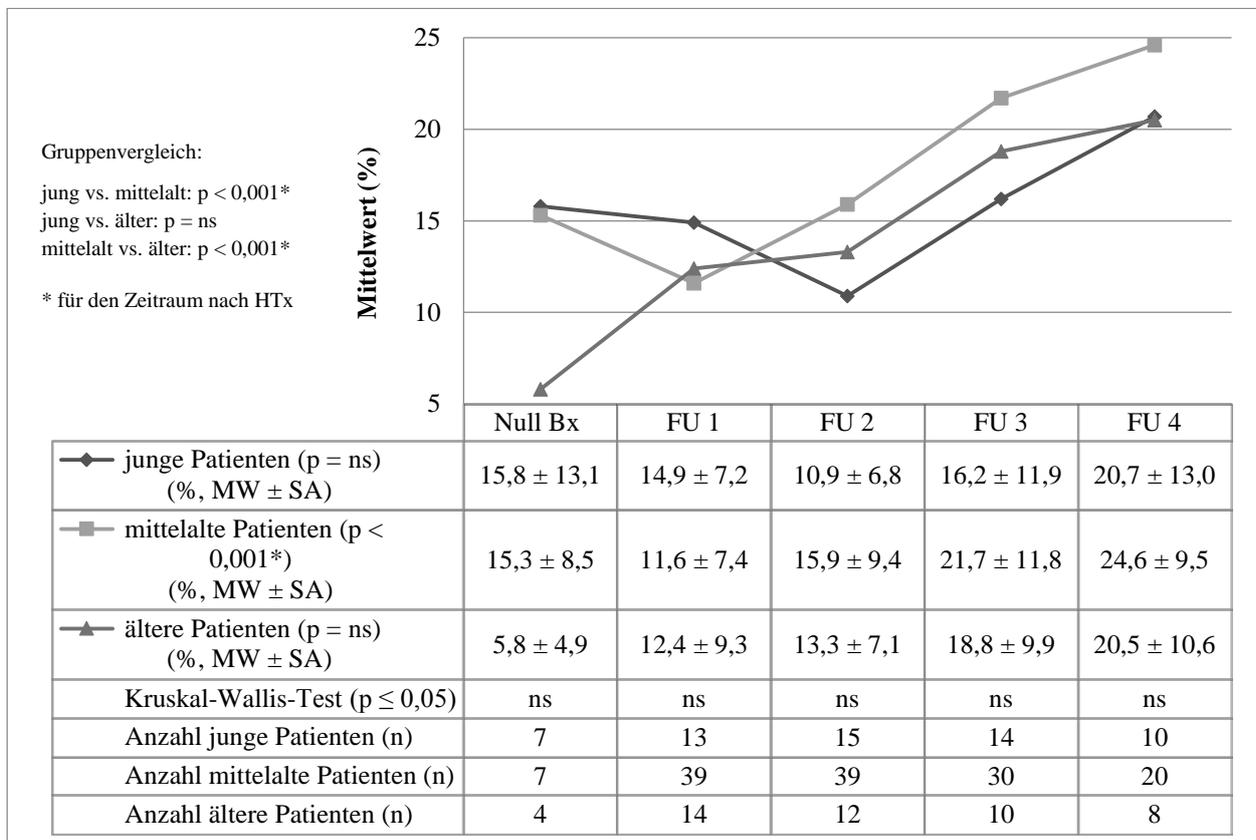
FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 16: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in Abhängigkeit vom Patientenalter bei HTx in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Ebenso unterschiedlich entwickelten sich die mittlere Rate an Kollagen Typ IV in Abhängigkeit der drei Altersklassen. Im Vergleich zum Transplantationszeitpunkt ($15,8 \pm 13,1\%$) nahm der durchschnittliche Kollagen-IV-Gehalt bei den unter 40jährigen Patienten im ersten Jahr nach HTx auf $10,9 \pm 6,8\%$ (FU 2) ab. Im mittel- und langfristigen Verlauf ließ diese Gruppe steigende Wertetrends erkennen. Im fünften Jahr nach HTx lag der mittlere Anteil an Kollagen Typ IV mit $20,7 \pm 13,0\%$ dennoch statistisch signifikant unter der Gesamtpopulation ($22,7 \pm 10,6\%$; siehe Abbildung 8 im Abschnitt 6.2.3; $p = 0,001$). Die Wertentwicklung mittelalter Patienten glich dem Verlauf der gesamten Studienpopulation (siehe Abbildung 8 im Abschnitt 6.2.3). Nach einem statistisch signifikanten Rückgang der mittleren Kollagen-IV-Rate von $15,3 \pm 8,5\%$ (Null Bx) auf $11,6 \pm 7,4\%$ zum FU 1 ($p < 0,001$), stiegen die Messwerte im weiteren postoperativen Verlauf kontinuierlich an. Zum FU 4 zeigte sich Kollagen Typ IV in der mittelalten Gruppe mit $24,6 \pm 9,5\%$ im Altersgruppenvergleich am stärksten ausgeprägt und überstieg statistisch signifikant den langfristigen Messwert der Gesamtpopulation ($22,7 \pm 10,6\%$; siehe Abbildung 8 im Abschnitt 6.2.3; $p < 0,001$). Die Kollagen-IV-Werte in der älteren Patientengruppe stiegen innerhalb der ersten 30 Tage

nach HTx sprunghaft von $5,8 \pm 4,9\%$ (Null Bx) auf $12,4 \pm 9,3\%$ (FU 1; $p < 0,001$) an. Auch im weiteren postoperativen Verlauf setzte sich dieser Trend fort. Im fünften Jahr nach HTx wiesen die Biopsien älterer Patienten mit $20,5 \pm 10,6\%$ dennoch den geringsten Anteil an Kollagen Typ IV im Altersvergleich auf und bildeten somit auch statistisch signifikant weniger Kollagen IV aus als die Gesamtpopulation ($22,7 \pm 10,6\%$; siehe Abbildung 8 im Abschnitt 6.2.3; $p = 0,001$).

Zwar war der postoperative Messverlauf für die mittelalte Patientengruppe statistisch plausibel ($p < 0,001$). Für jüngere und ältere Patienten konnte die Auswertung jedoch keine statistische Signifikanz erreichen. Auch der Vergleich zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten ergab keine statistische Signifikanz. Dahingegen stellten sich die Unterschiede zwischen jungen und mittelalten sowie mittelalten und älteren Patienten mit $p < 0,001$ als statistisch signifikant für den postoperativen Zeitraum dar. Abbildung 17 vergleicht den Verlauf der Messwerte entsprechend des Alters.



FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 17: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit vom Patientenalter bei HTx in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

6.5 Abhängigkeit von der spenderinduzierten Beschaffenheit der EZM

Bereits zu Lebzeiten der Organspender war die interstitielle Myokardstruktur aufgrund zahlreicher Einflussfaktoren kontinuierlichen Veränderungsprozessen unterworfen. Daher ließen sich zum Zeitpunkt der Transplantation (Null Bx) unterschiedlich hohe Anteile an Fibrose bzw. Kollagen Typ III und IV nachweisen. Daraus ergab sich die Fragestellung, welchen Einfluss die morphologischen Ausgangsbedingungen zum Zeitpunkt der HTx möglicherweise auf die Dynamik der interstitiellen Veränderungen im postoperativen Zeitverlauf nehmen. Dazu wurden die vorliegenden Null Biopsien entsprechend ihres Anteils an Gesamtfibrose, Kollagen Typ III und IV in drei Untergruppen (Mittelwert $\leq 5\%$ vs. $6 - 10\%$ vs. $> 10\%$) eingeteilt. Anschließend wurde die Wertentwicklung der drei Komponenten im kurz- und langfristigen postoperativen Verlauf (30 Tage, 1 Jahr und 5 Jahre nach HTx) verglichen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose, Kollagen Typ III und IV (%) in Abhängigkeit von den Ausgangsbedingungen bei HTx (Null Biopsie)

Mittlere Gesamtfibrose (%)				
<i>Null Bx</i> (MW in %)	<i>30 Tage post HTx</i> (MW \pm SA; %)	<i>1 Jahr post HTx</i> (MW \pm SA; %)	<i>5 Jahre post HTx</i> (MW \pm SA; %)	<i>Friedmann-Test</i> ($p \leq 0,05$)
$\leq 5\%$	4,5 \pm 2,4 (n = 4)	8,2 \pm 3,2 (n = 5)	8,0 \pm 5,6 (n = 3)	ns
6 – 10%	6,0 \pm 2,0 (n = 6)	8,3 \pm 1,9 (n = 6)	6,0 \pm 0 (n = 1)	ns
> 10%	8,5 \pm 3,1 (n = 4)	7,8 \pm 4,0 (n = 4)	12,0 \pm 2,8 (n = 2)	ns
<i>Wilcoxon-Test</i> ($p \leq 0,05$)	ns	ns	ns	
<u>Vergleich der Gruppen:</u>		<u>Korrelation nach Spearman:</u>		
$\leq 5\%$ vs. $6 - 10\%$: ns		ns		
$\leq 5\%$ vs. $> 10\%$: ns				
$6 - 10\%$ vs. $> 10\%$: ns				
Mittleres Kollagen Typ III (%)				
<i>Null Bx</i> (MW in %)	<i>30 Tage post HTx</i> (MW \pm SA; %)	<i>1 Jahr post HTx</i> (MW \pm SA; %)	<i>5 Jahre post HTx</i> (MW \pm SA; %)	<i>Friedmann-Test</i> ($p \leq 0,05$)

$\leq 5\%$	4,5 ± 0 (n = 1)	10,8 ± 0 (n = 1)	/	ns
6 – 10%	9,5 ± 3,7 (n = 3)	11,2 ± 4,1 (n = 4)	12,7 ± 2,2 (n = 2)	ns
> 10%	11,7 ± 2,8 (n = 10)	10,0 ± 3,0 (n = 10)	21,6 ± 5,9 (n = 4)	0,050
<i>Wilcoxon-Test</i> ($p \leq 0,05$)	ns	ns	ns	
<u>Vergleich der Gruppen:</u>		<u>Korrelation nach Spearman:</u>		
$\leq 5\%$ vs. 6 – 10%: ns		Null Bx: 5 Jahre post HTx		
$\leq 5\%$ vs. > 10%: 0,050		r = 0,828		
6 – 10% vs. > 10%: 0,015		p = 0,042		
Mittleres Kollagen Typ IV (%)				
<i>Null Bx</i> (MW in %)	<i>30 Tage post HTx</i> (MW ± SA; %)	<i>1 Jahr post HTx</i> (MW ± SA; %)	<i>5 Jahre post HTx</i> (MW ± SA; %)	<i>Friedmann-Test</i> ($p \leq 0,05$)
$\leq 5\%$	15,8 ± 10,1 (n = 3)	8,3 ± 2,7 (n = 4)	45,2 ± 0 (n = 1)	ns
6 – 10%	10,4 ± 12,8 (n = 2)	18,6 ± 1,3 (n = 2)	33,1 ± 0 (n = 1)	ns
> 10%	12,2 ± 7,0 (n = 9)	15,6 ± 8,7 (n = 9)	22,0 ± 4,3 (n = 4)	ns
<i>Wilcoxon-Test</i> ($p \leq 0,05$)	ns	ns	ns	
<u>Vergleich der Gruppen:</u>		<u>Korrelation nach Spearman:</u>		
$\leq 5\%$ vs. 6 – 10%: ns		Null Bx: 5 Jahre post HTx		
$\leq 5\%$ vs. > 10%: 0,039		r = -0,845		
6 – 10% vs. > 10%: 0,039		p = 0,034		

HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Biopsien; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; % - Prozent; p – Signifikanzniveau; r – Korrelationskoeffizient nach Spearman; SA – Standardabweichung; vs. - versus

Patienten, deren Spenderherz bei Transplantation im Mittel maximal 5% Fibrose aufwies, entwickelten im 30tägigen Verlauf nach HTx die geringste Fibrose-Rate (4,5 ± 2,4%). Dahingegen zeigten Patienten, deren Gewebeproben bereits bei HTx mehr als 10% Fibrose enthielten, auch in der postoperativen Frühphase den höchsten Anteil an Fibrose (8,5 ± 3,1%; $p = 0,090$). Dieser Trend

setzte sich bis ins fünfte Jahr nach HTx fort. So wurde für Patienten mit hohen Fibrose-Werten in der Null Bx auch postoperativ ein deutlich höherer Fibrosegehalt nachgewiesen als für Patienten mit niedrigeren Ausgangswerten. Dabei ergab sich jedoch weder in der Unterscheidung der Gruppen zu den einzelnen Erhebungszeitpunkten, noch in den individuellen Werteverläufen eine statistische Signifikanz. Auch mithilfe des Koeffizienten nach Spearman konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Ausgangsbedingungen bei HTx und dem weiteren postoperativen Verlauf erarbeitet werden.

Ein ähnliches Bild zeichnete sich für das interstitielle Kollagen Typ III ab. In den Gewebeproben von Patienten mit einem mittleren Kollagengehalt unter 5% in der Null Bx ließ sich auch 30 Tage später statistisch signifikant weniger Kollagen III nachweisen als bei Patienten mit einer durchschnittlichen Kollagen-III-Rate von $> 10\%$ bei HTx ($4,5 \pm 0\%$ vs. $11,7 \pm 2,8\%$; $p = 0,038$). Im Verlauf des ersten postoperativen Jahres verzeichneten Patienten mit Ausgangswerten von $> 10\%$ jedoch den geringsten Anteil an interstitiellem Kollagen Typ III. Langfristig zeigte sich allerdings ein gegenläufiger Trend, sodass die Patienten mit den höchsten Kollagenwerten in der Null Bx auch 5 Jahre nach HTx den höchsten Anteil an mittlerem Kollagen Typ III aufwiesen. Der Werteverlauf in dieser Gruppe war mit $p = 0,050$ statistisch signifikant. Auch der Vergleich mit Patienten mit einer geringeren Kollagen-III-Rate bei Transplantation zeigte statistisch signifikante Ergebnisse. In der Korrelationsanalyse nach Spearman ergab sich eine stark positive, statistisch signifikante Korrelation zwischen den kollagenen Ausgangswerten bei HTx und der langfristigen postoperativen Wertentwicklung ($r = 0,828$; $p = 0,042$).

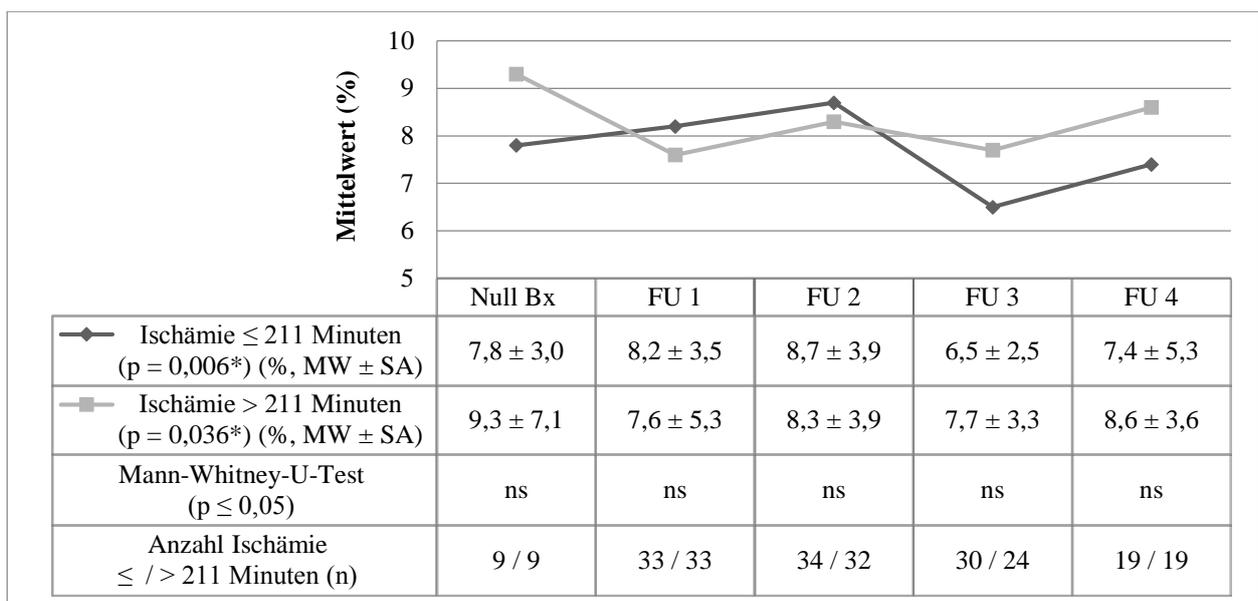
Innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx nahm die mittlere Rate des BM-ständigen Kollagen Typ IV in der Gruppe mit dem geringsten Ausgangswert bei Transplantation ($\leq 5\%$) am deutlichsten auf $15,8 \pm 10,1\%$ zu. Im weiteren Verlauf des ersten postoperativen Jahres ging Kollagen Typ IV in dieser Gruppe jedoch stark zurück auf $8,3 \pm 2,7\%$ und lag damit statistisch signifikant unter dem Ergebnis der Patienten mit Ausgangswerten von 6-10% ($18,6 \pm 1,2\%$; $p = 0,003$) und $> 10\%$ ($15,6 \pm 8,7\%$; $p = 0,043$) bei HTx. Im fünften Jahr nach HTx stieg der durchschnittliche Anteil von Kollagen IV in der Patientengruppe mit dem niedrigsten Wert bei HTx erheblich auf $45,2 \pm 0\%$. Dahingegen wiesen Patienten mit dem höchsten Ausgangsgehalt in der Null Bx den geringsten Durchschnittswert von $22,0 \pm 4,3\%$ auf. Zwar ließ sich für die individuelle Wertentwicklung der Gruppen keine statistische Signifikanz nachweisen. Ein Vergleich zwischen Patienten mit Ausgangswerten von $\leq 5\%$ und $> 10\%$ bzw. 6 – 10% und $> 10\%$ erbrachte jedoch eine statistische Signifikanz von $p = 0,039$. Die Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte einen stark negativen, statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem mittleren Kollagen-IV-Gehalt bei HTx und der Wertentwicklung im fünften postoperativen Jahr ($r = -0,845$; $p = 0,034$).

6.6 Abhängigkeit von der Ischämiezeit bei HTx

Weiterführend wurde die Ischämiezeit während des Transplantationsvorganges in die Analyse möglicher Einflussfaktoren einbezogen. Anhand des Korrelationskoeffizienten nach Spearman konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Ischämiezeit und dem Anteil fibrotischer Läsionen im mittel- und langfristigen postoperativen Zeitraum abgeleitet werden (FU3: $r = 0,305$; $p = 0,025$; FU4: $r = 0,357$; $p = 0,028$). Für Kollagen Typ III zeigte sich demgegenüber nur innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx eine schwach positive Assoziation mit der Ischämiezeit (FU 1: $r = 0,265$; $p = 0,032$). Eine Korrelationsanalyse für Kollagen Typ IV ergab zu keinem Erhebungszeitpunkt einen statistisch plausiblen Zusammenhang.

In Anlehnung an die mittlere Ischämiezeit von $211,2 \pm 49,6$ Minuten (siehe Tabelle 2 in Abschnitt 4) wurde die Studienpopulation in zwei Untergruppen geteilt. So konnte der postoperativen Werteverlauf der drei EZM-Komponenten bei Patienten mit einer Ischämiezeit von ≤ 211 Minuten ($n = 38/78$; 49%) und Patienten mit einer höheren Ischämiezeit von > 211 Minuten ($n = 40/78$; 51%) verglichen werden.

Bereits zum Zeitpunkt der HTx ließ sich in Herzen mit einer längeren Ischämiezeit ein höherer Anteil an fibrotischen Läsionen nachweisen als bei Spenderherzen mit kürzerer Ischämiezeit ($9,3 \pm 7,1\%$ vs. $7,8 \pm 3,0\%$). Im anschließenden postoperativen Zeitraum entsprach die Fluktuation der Messwerte in beiden Gruppen den Beobachtungen der Gesamtpopulation (siehe Abbildung 6 in Abschnitt 6.2.1). Unterschiede im Fibrosegehalt zwischen den beiden Patientengruppen ließen sich zu keinem Zeitpunkt als statistisch signifikant beweisen. Der individuelle postoperative Verlauf in beiden Ischämiegruppen war dahingegen statistisch signifikant (siehe Abbildung 18).

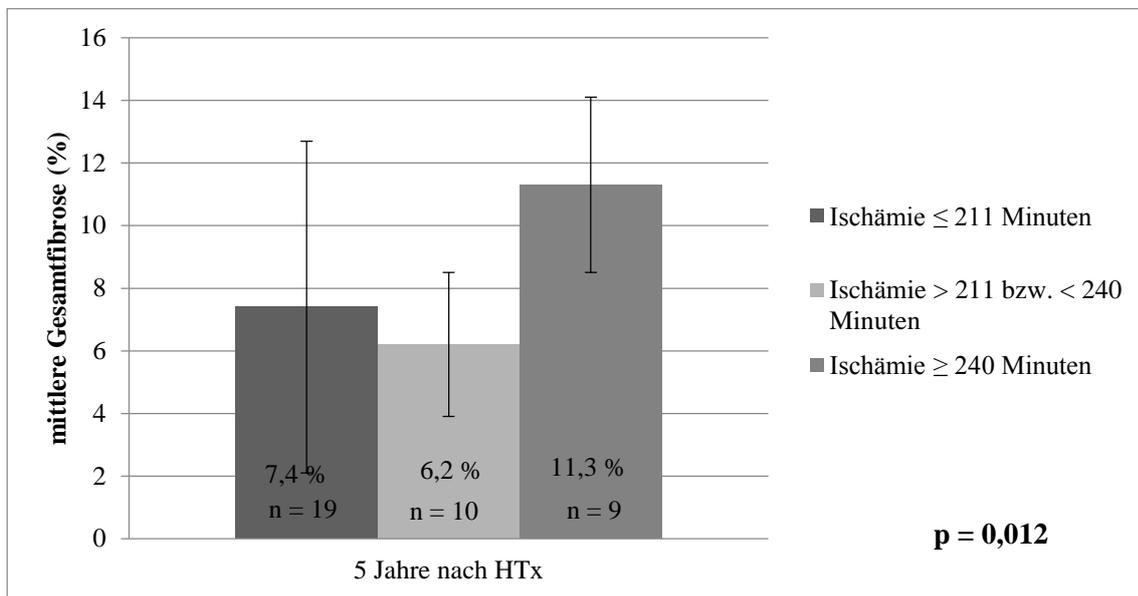


* für den postoperativen Verlauf

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 18: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in fünf Jahren post HTx in Abhängigkeit von der Ischämiezeit (Null Bx bis FU 4)

Aus der weiterführenden Unterteilung der Patienten mit längerer Ischämiezeit in zwei Gruppen (Ischämie > 211 bzw. < 239 Minuten vs. Ischämie \geq 240 Minuten) ging ein statistisch signifikanter Unterschied für den langfristigen postoperativen Verlauf hervor. Die Gewebeproben der Patienten mit überdurchschnittlich hoher Ischämiezeit von \geq 240 Minuten wiesen im fünften Jahr nach HTx einen deutlich höheren Anteil an mittlerer Gesamtfibrose auf als Patienten mit geringerer Ischämiezeit (siehe Abbildung 19).

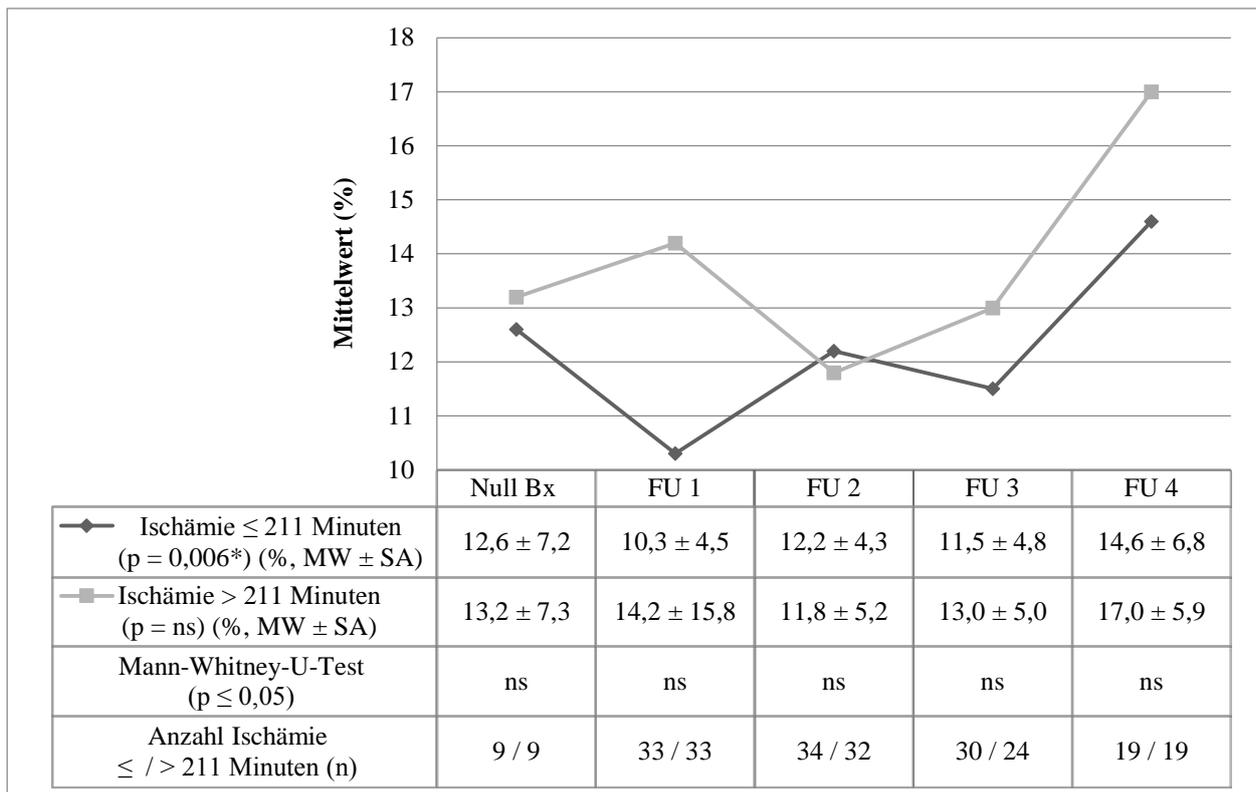


HTx – Herztransplantation; n – Anzahl an Patienten; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; vs. – versus

Abbildung 19: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) im fünften Jahr nach HTx bei Patienten mit überdurchschnittlich langer vs. kürzerer Ischämiezeit

Zum Zeitpunkt der HTx enthielt das interstitielle Myokard von Patienten mit einer Ischämiezeit > 211 Minuten nicht nur bereits mehr Fibrose, sondern auch einen höheren Anteil an Kollagen Typ III als bei Patienten mit geringerer Ischämiezeit ($13,2 \pm 7,3\%$ vs. $12,6 \pm 7,2\%$). Auch der postoperative Verlauf gestaltete sich in beiden Gruppen unterschiedlich. Nach einem Abfall der Messwerte in den ersten 30 Tagen post HTx stieg der mittlere Kollagen-III-Gehalt in der Gruppe mit kürzerer Ischämie innerhalb des ersten Jahres nach HTx wieder auf $12,2 \pm 4,3\%$ und befand sich damit auf einem mit dem Ausgangswert bei HTx vergleichbaren Niveau. Im dritten postoperativen Jahr war Kollagen III bei Patienten mit kurzer Transplantatischämie im Mittel am geringsten ausgeprägt ($11,5 \pm 4,8\%$). Dahingegen entwickelten Patienten mit längerer Ischämiezeit in den ersten

30 Tagen nach HTx zunächst mehr Kollagen Typ III, erreichten jedoch bereits zum FU 2 ihren durchschnittlichen Tiefstand (FU 1: $14,2 \pm 15,8\%$; FU2: $11,8 \pm 5,2\%$). Im dritten Jahr nach HTx ließ sich für sie eine steigende Tendenz des mittleren Kollagen-III-Gehalt ableiten. In beiden Gruppen zeigte sich Kollagen Typ III im Mittel jedoch erst im fünften postoperativen Jahr am ausgeprägtesten (Ischämie ≤ 211 Minuten: $14,6 \pm 6,8\%$ vs. Ischämie > 211 Minuten: $17,0 \pm 5,9\%$). Gemessen an der Gesamtpopulation lagen die hierbei für den langfristigen Beobachtungszeitraum ermittelten Messwerte signifikant unterhalb bzw. oberhalb des durchschnittlichen Anteils an Kollagen Typ III aller Patienten ($15,8 \pm 6,4\%$; siehe Abbildung 7 im Abschnitt 6.2.2; $p < 0,001$). Bei Patienten mit kürzerer Ischämiezeit erwies sich der postoperative Werteverlauf als statistisch signifikant ($p = 0,006$). Die Unterschiede zwischen den Gruppen stellten sich nicht als statistisch signifikant heraus. In Abbildung 20 wird die prozentuale Durchschnittsrate von Kollagen Typ III bei Patienten mit kürzerer und längerer Ischämiezeit für den Untersuchungszeitraum nachvollzogen.

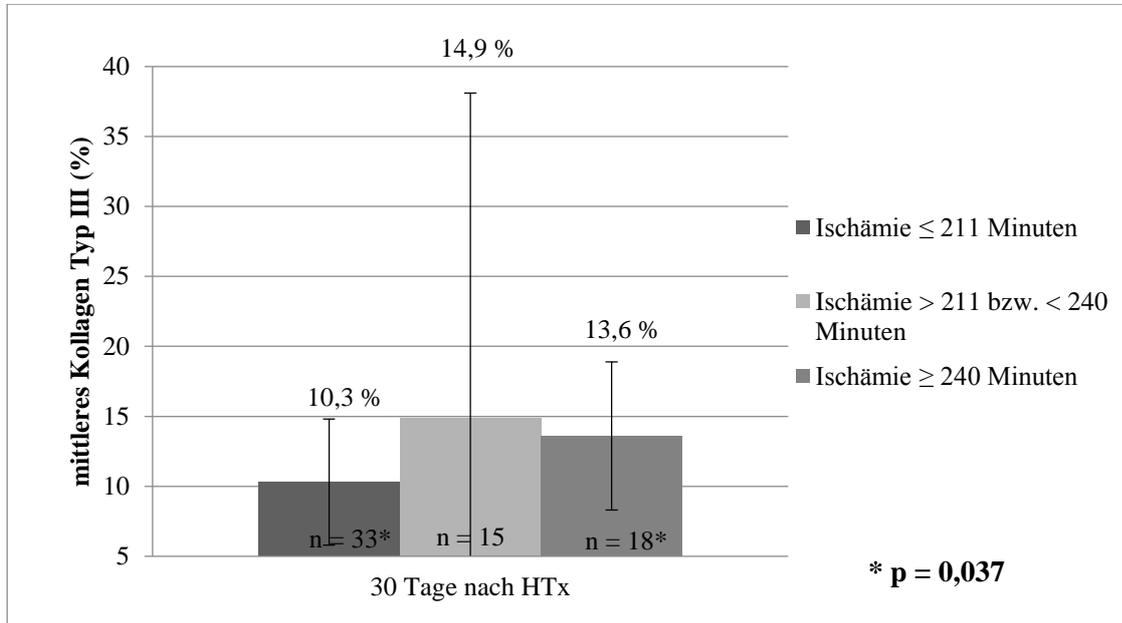


* für den postoperativen Verlauf

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 20: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in fünf Jahren post HTx in Abhängigkeit von der Ischämiezeit (Null Bx bis FU 4)

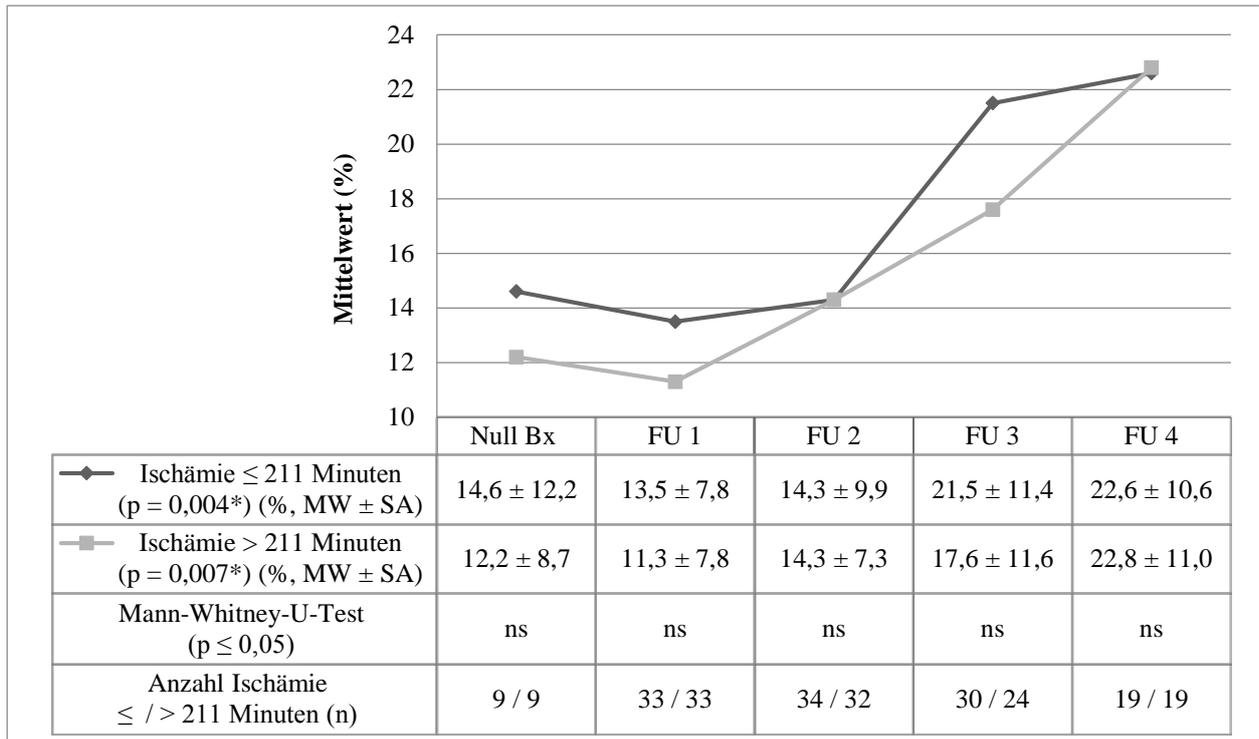
Unter Fokussierung auf den 30tägigen postoperativen Verlauf konnte statistisch signifikant herausgearbeitet werden, dass Patienten mit überdurchschnittlich langer Ischämiezeit von ≥ 240 Minuten deutlich erhöhte Messwerte aufwiesen als Patienten mit kürzeren Organischämien von ≤ 211 Minuten (siehe Abbildung 21).



HTx – Herztransplantation; n – Anzahl an Patienten; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; vs. – versus

Abbildung 21: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in der Frühphase (30 Tage) nach HTx bei Patienten mit überdurchschnittlich langer vs. kürzerer Ischämiezeit

Im postoperativen Verlauf nahm der durchschnittliche Gehalt an Kollagen Typ IV sowohl bei Patienten mit einer kürzeren als auch längeren Organischämie stetig zu und entsprach damit der herausgearbeiteten Entwicklung für die gesamte Studienpopulation (siehe Abbildung 8 in Abschnitt 6.2.3). Auch im fünften Jahr nach HTx unterschied sich der mittlere Kollagen-IV-Gehalt in beiden Gruppen nicht vom langfristigen Durchschnittsgehalt der gesamten Patientenpopulation ($22,7 \pm 10,6\%$ vs. Ischämie ≤ 211 Minuten: $22,6 \pm 10,6\%$ vs. Ischämie > 211 Minuten: $22,8 \pm 11,0\%$). Der postoperative Werteverlauf zeigte sich für beide Subgruppen statistisch signifikant. Die Unterschiede zwischen den Patientengruppen bestätigten sich jedoch nicht als statistisch signifikant (siehe Abbildung 22).



* für den postoperativen Verlauf

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 22: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in fünf Jahren post HTx in Abhängigkeit von der Ischämiezeit (Null Bx bis FU 4)

6.7 Abhängigkeit von Abstoßungsreaktionen

6.7.1 Zelluläre Abstoßung

Die weitere Analyse prüfte eine mögliche Abhängigkeit zwischen dem Auftreten von zellulären Abstoßungsvorgängen (ACR) und den postoperativen Messwerten. Entsprechend einer normalen Transplantkohorte war die Anzahl der nachgewiesenen Abstoßungen im ersten Jahr nach HTx (FU 1 und FU 2) am höchsten. Die Mehrheit der untersuchten Patientenpopulation war jedoch zu jedem Untersuchungszeitpunkt frei von Anzeichen einer Abstoßung. Tabelle 10 gibt die Anzahl aller zellulären Abstoßungen pro FU unabhängig vom Schweregrad wider.

Tabelle 10: nachgewiesene zelluläre Abstoßungsreaktionen pro FU

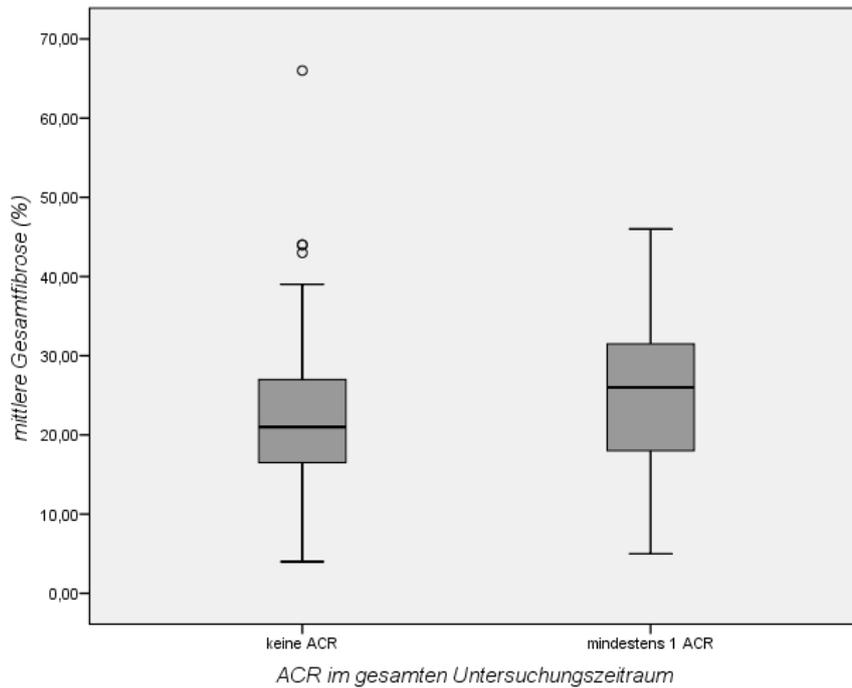
<i>Art des FU</i>	<i>ACR negativ</i>	<i>ACR positiv</i>	<i>nicht repräsentativ*</i>
FU 1 (n = 66)	59% (39/66)	38% (25/66)	3% (2/66)
FU 2 (n = 66)	77% (51/66)	21% (14/66)	2% (1/66)
FU 3 (n = 54)	94% (51/54)	4% (2/54)	2% (1/54)
FU 4 (n = 38)	92% (35/38)	8% (3/38)	/
Cochran-Q-Test ($p \leq 0,05$)	0,011		

* Für nicht repräsentative Biopsien konnte aufgrund von unzureichend zur Verfügung stehendem Material keine Abstoßungsdiagnostik erfolgen.

ACR – akute zelluläre Abstoßung; FU – Follow up; n – Anzahl an Patienten; p – Signifikanzniveau; % – Prozent

Um die statistische Aussagekraft der Auswertung zu erhöhen, wurden alle Patienten, für die innerhalb des fünfjährigen Beobachtungszeitraumes mindestens einmalig ein zelluläres Abstoßungsereignis dokumentiert war, in einer Gruppe zusammengefasst. Die entsprechende postoperative Summe der gemessenen Mittelwerte (FU 1 bis FU 4) wurde den Messwerten der Patienten gegenübergestellt, deren Biopsien im gesamten Zeitverlauf keine Abstoßungszeichen aufwiesen.

So entwickelten ACR-positive Patienten im Mittel nur unwesentlich mehr Fibrose als die rejektionsfreie Vergleichsgruppe ($23,9 \pm 11,0\%$ vs. $23,6 \pm 12,5\%$). Da die Ergebnisse keiner Normalverteilung unterlagen, eignete sich zur Gegenüberstellung jedoch eher der Medianwert. Als Zentralwert liegt er genau in der Mitte aller Messwerte und ist somit robust gegenüber Ausreißern der Studienpopulation. Dadurch dient er als besserer Indikator einer zentralen Tendenz. Für die mittlere Fibrose zeigte sich in Betrachtung des Medians ein deutlicher Unterschied zwischen Patienten mit und ohne ACR (26% vs. 21%). Dieser war jedoch nicht statistisch signifikant. Abbildung 23 zeigt die kumulierte Fibrose im gesamten postoperativen Beobachtungszeitraum in Abhängigkeit vom Auftreten einer ACR in einem Boxplot.



	<i>keine ACR</i>	<i>mindestens 1 ACR*</i>
MW ± SA (%)	23,6 ± 12,5	23,9 ± 11,0
Median (%)	21,0	26,0
Anzahl an Patienten (n)	40	34
Mann-Whitney-U-Test (p ≤ 0,05)	0,373	

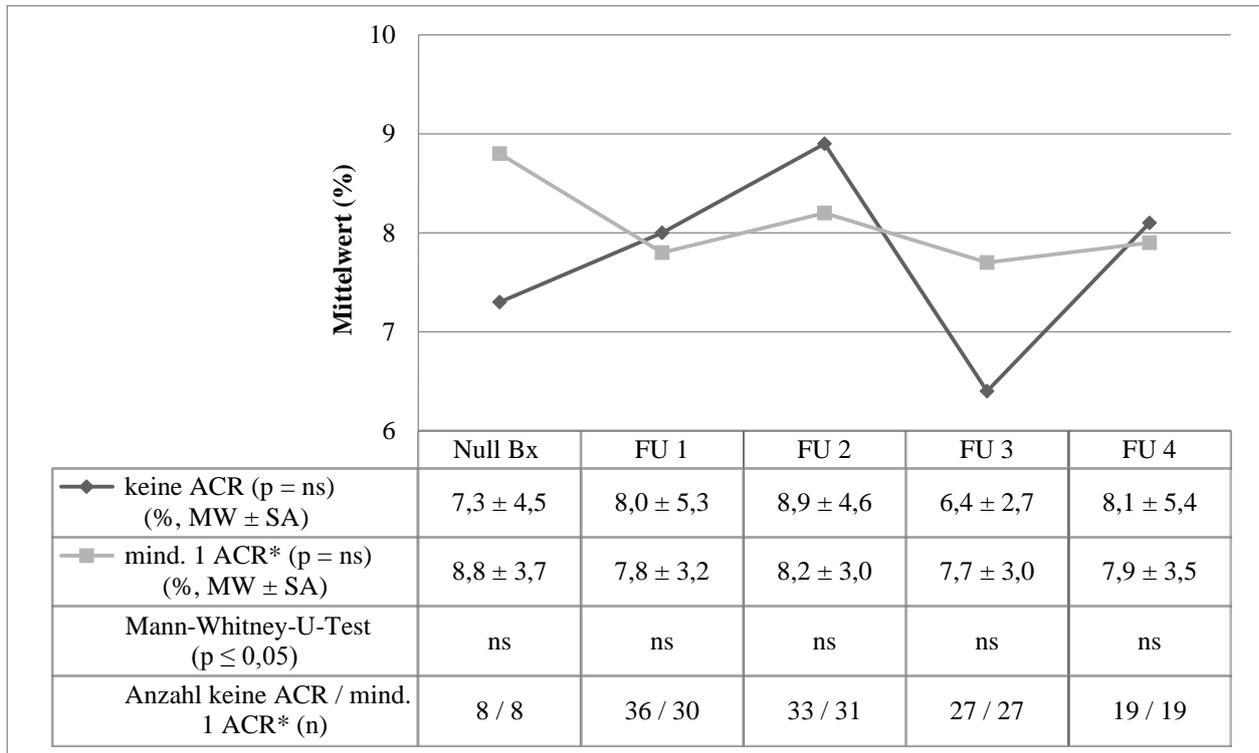
* mindestens einmalige akute zelluläre Abstoßung ab Grad 01A im gesamten Untersuchungszeitraum

ACR – akute zelluläre Abstoßung; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 23: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4) in Abhängigkeit von einer ACR

Die postoperative Fibroseentwicklung gestaltete sich in beiden Patientengruppen ähnlich. Innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx sank die durchschnittliche Gesamtfibrose leicht ab, erreichte jedoch bereits zum FU 2 ihren Höchststand mit $8,2 \pm 3,0\%$ in der ACR-positiven Gruppe bzw. $8,9 \pm 4,6\%$ bei ACR-freien Patienten. Im dritten Jahr nach HTx reduzierte sich der mittlere Fibrosegehalt in beiden Patientengruppen auf den jeweiligen Tiefststand. Dabei lag der Messwert der abstoßungsfreien Gruppe erstmalig unterhalb der ermittelten Fibroserate von Patienten mit ACR ($6,4 \pm 2,7\%$ vs. $7,7 \pm 3,0\%$). Im fünften Jahr nach HTx lag der mittlere Anteil an Gesamtfibrose in beiden Gruppen wieder auf dem Niveau des postoperativen Ausgangswertes zum FU 1. Für die

in Abbildung 24 dargestellten Verlaufswerte der mittleren Gesamtfibrose konnte innerhalb der beiden Subgruppen und im Vergleich miteinander keine statistische Signifikanz erreicht werden.

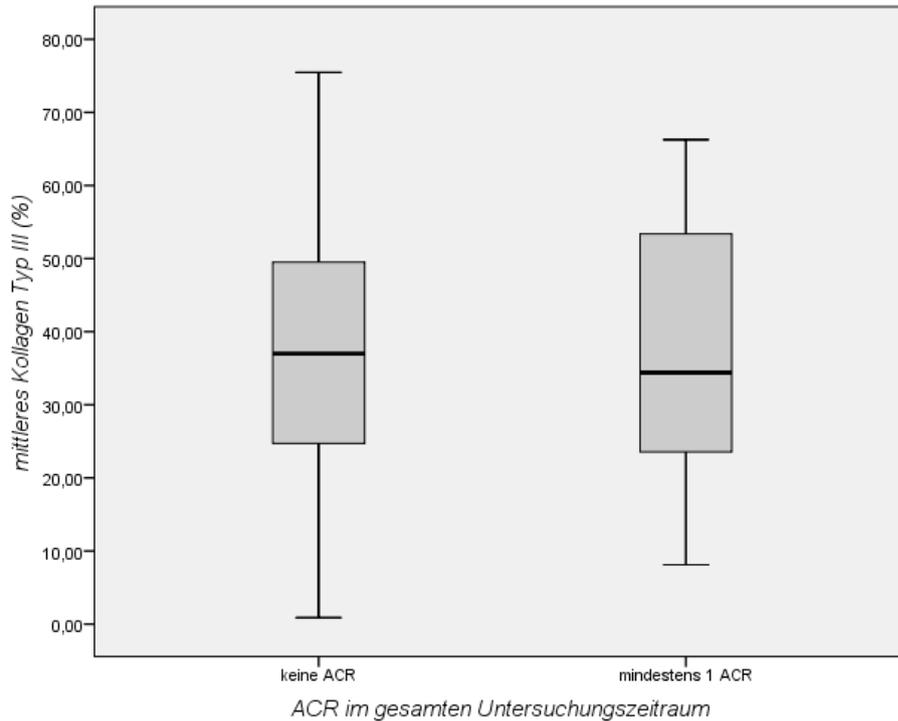


* mindestens einmalige akute zelluläre Abstoßung ab Grad 01A im gesamten Untersuchungszeitraum

ACR – akute zelluläre Abstoßung; FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; mind. – mindestens; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 24: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) bei Patienten ohne ACR vs. mindestens einmaliger ACR in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Der über den gesamten postoperativen Zeitraum kumulierte, durchschnittliche Kollagen-III-Gehalt lag bei Patienten mit und ohne Rejektion auf einem ähnlichen Messniveau. Der Medianwert zeigte sich in der rejektionspositiven Gruppe geringer als in der ACR-freien Gruppe (34,3% vs. 38,1%). Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Der Boxplot in Abbildung 25 vergleicht Mittelwert und Median für Kollagen Typ III in beiden Gruppen.



	<i>keine ACR</i>	<i>mindestens 1 ACR*</i>
<i>MW ± SA (%)</i>	39,7 ± 23,4	39,6 ± 17,4
Median (%)	38,1	34,3
Anzahl an Patienten (n)	40	34
Mann-Whitney-U-Test ($p \leq 0,05$)	0,738	

* mindestens einmalige akute zelluläre Abstoßung ab Grad 01A im gesamten Untersuchungszeitraum

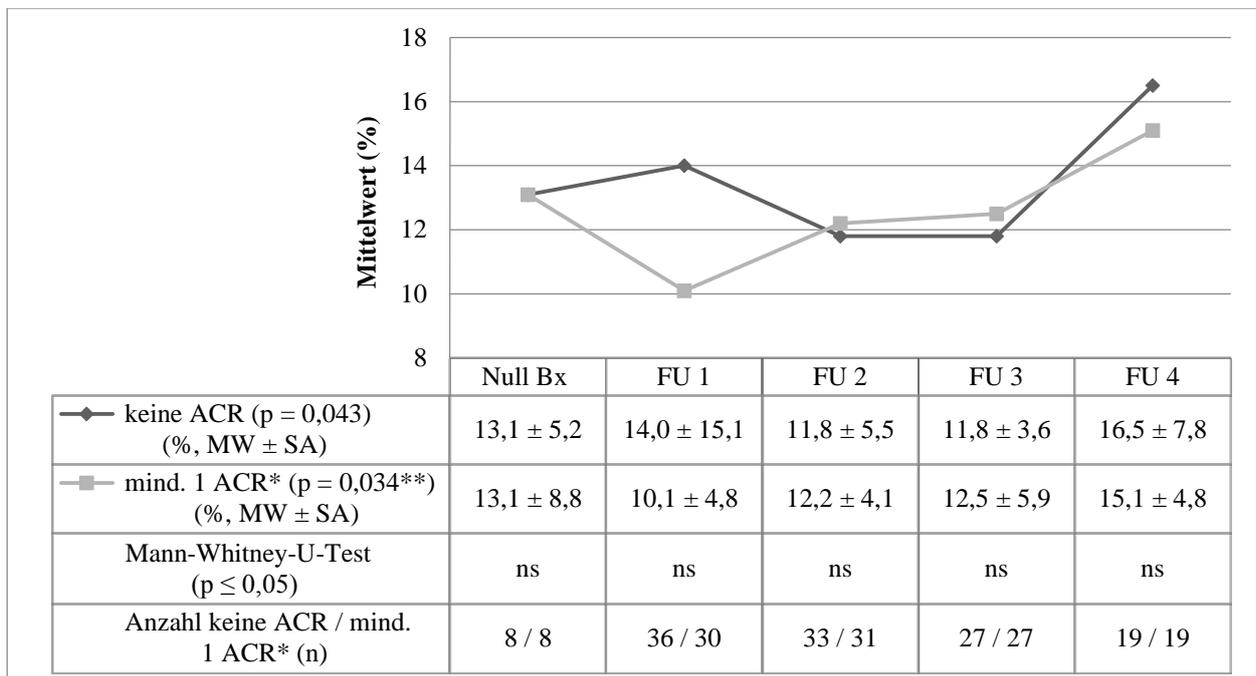
ACR – akute zelluläre Abstoßung; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 25: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4) in Abhängigkeit von einer ACR

In Abhängigkeit einer ACR zeigte Kollagen Typ III unterschiedliche postoperative Verlaufswerte. Zum Zeitpunkt der HTx wiesen die Gewebeproben sowohl bei abstoßungspositiven als auch ACR-negativen Patienten eine mittlere Kollagen-III-Rate von 13,1% auf. Im ersten postoperativen Jahr entwickelten 80% der Patienten mit ACR durchschnittliche Kollagen-III-Werte von $\geq 10\%$. Im Gegensatz zu 49% der rejektionsfreien Patienten lag der mittlere Kollagen-III-Gehalt nur bei einem Fünftel der Patienten mit ACR unter einem Wert von 10% ($p = 0,031$).

In detaillierter Betrachtung des frühen postoperativen Zeitraums reduzierte sich die durchschnittliche Kollagen-III-Rate innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx bei Patienten mit ACR auf $10,1 \pm$

4,8%. Im weiteren Verlauf unterlag der gemessene Anteil an Kollagen III einer kontinuierlichen Steigerung und erreichte zum FU 4 mit $15,1 \pm 4,8\%$ seinen individuellen Höchststand ($p = 0,034$). In der ACR-freien Gruppe stieg der kollagene Messwert innerhalb von 30 Tagen nach HTx geringfügig an ($14,0 \pm 15,1\%$) und stabilisierte sich im ersten und dritten postoperativen Jahr (FU 2 und FU 3) auf einem Niveau von $11,8\%$. Im langfristigen Intervall stieg der durchschnittliche Messwert letztlich auf $16,5 \pm 7,8\%$ ($p = 0,043$). Fünf Jahre nach HTx entwickelten rejektionsfreie Patienten im Mittel somit mehr Kollagen Typ III als Patienten mit ACR. Dabei ergab der Mann-Whitney-U-Test keine statistische Signifikanz für die Messwertunterschiede der beiden Gruppen (siehe Abbildung 26).



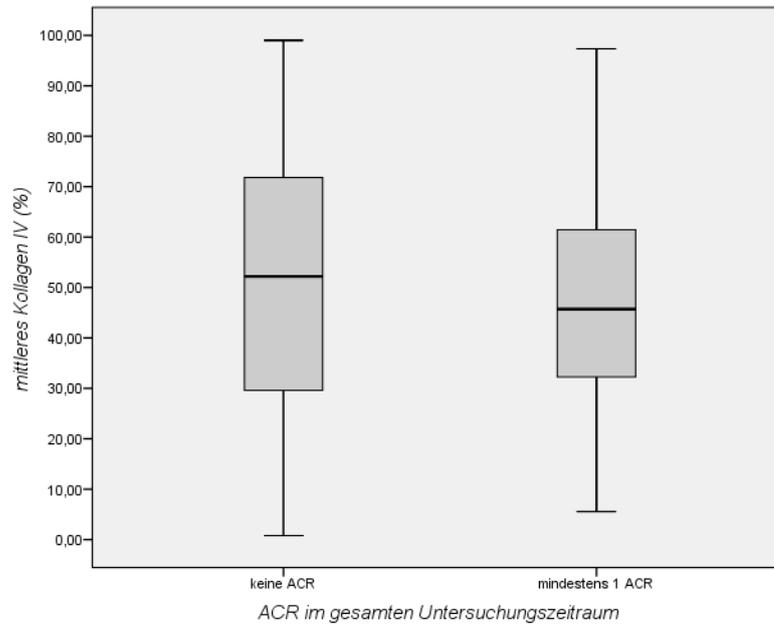
* mindestens einmalige akute zelluläre Abstoßung ab Grad 01A im gesamten Untersuchungszeitraum

** für den Zeitraum nach HTx

ACR – akute zelluläre Abstoßungsperiode; FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; mind. – mindestens; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 26: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) bei Patienten ohne ACR vs. mindestens einmaliger ACR in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Kollagen Typ IV war in der Gruppe rejektionsfreier Patienten mit einer kumulierten Durchschnittsrate von $51,1 \pm 27,2\%$ stärker ausgeprägt als bei Patienten mit ACR ($47,9 \pm 23,4\%$). Auch der Medianwert unterschied sich in beiden Gruppen deutlich. Die Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant (siehe Boxplot in Abbildung 27).



	<i>keine ACR</i>	<i>mindestens 1 ACR*</i>
<i>MW ± SA (%)</i>	51,1 ± 27,2	47,9 ± 23,4
<i>Median (%)</i>	52,2	45,7
<i>Anzahl an Patienten (n)</i>	40	34
<i>Mann-Whitney-U-Test (p ≤ 0,05)</i>	0,571	

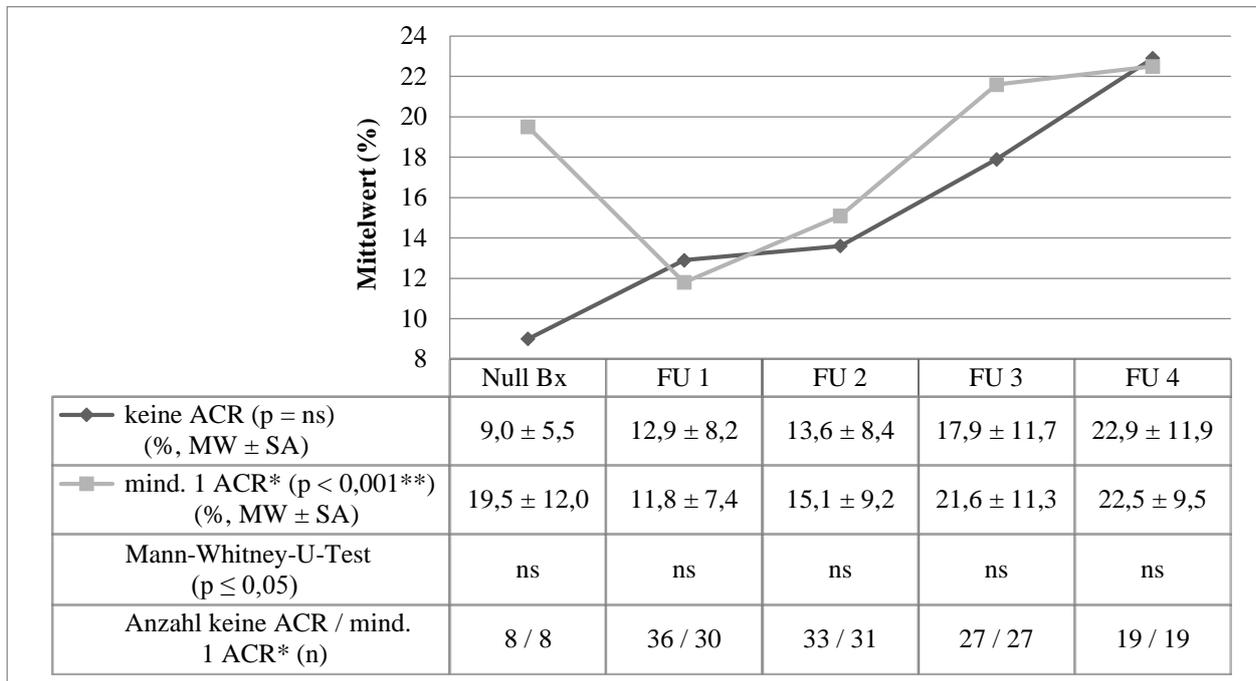
* mindestens einmalige akute zelluläre Abstoßung ab Grad 01A im gesamten Untersuchungszeitraum

ACR – akute zelluläre Abstoßung; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 27: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4) in Abhängigkeit von einer ACR

Während die ACR-freien Patienten bei Transplantation im Mittel einen Messwert von $9,0 \pm 5,5\%$ erreichten, betrug der Anteil an Kollagen IV bei ACR-positiven Patienten durchschnittlich $19,5 \pm 12,0\%$ (Null Bx). Innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage nahm die Kollagen-IV-Rate in der ACR-positiven Gruppe deutlich ab und zeigte einen geringeren Wert als rejektionsfreie Patienten ($11,8 \pm 7,4\%$ vs. $12,9 \pm 8,2\%$). Im weiteren Erhebungsintervall stiegen die Messwerte in beiden Gruppen konsekutiv an. Dabei lagen die Mittelwerte abstoßungsfreier Patienten zum FU 2 und FU 3 unter dem Niveau der ACR-positiven Gruppe. Im fünften Jahr nach HTx lag der individuelle Höchstwert beider Patientengruppen auf einem vergleichbaren Niveau (Patienten mit ACR: $22,5 \pm 9,5\%$ vs. Patienten ohne ACR: $22,9 \pm 11,9\%$). Weder die Unterscheidung zu den entsprechenden

Beobachtungszeitpunkten noch der Werteverlauf der rejektionsfreien Gruppe stellten sich als statistisch signifikant heraus. Lediglich die postoperative Messwertentwicklung der ACR-positiven Patienten war statistisch signifikant ($p < 0,001$; siehe Abbildung 28).



* mindestens einmalige akute zelluläre Abstoßung ab Grad 01A im gesamten Untersuchungszeitraum

** für den Zeitraum nach HTx

ACR – akute zelluläre Abstoßungsperiode; FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; mind. – mindestens; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 28: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) bei Patienten ohne ACR vs. mindestens einmaliger ACR in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Weiterführend wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der zellulären Abstoßung im Untersuchungszeitfenster und dem mittleren Gehalt an Fibrose bzw. Kollagen Typ III und IV besteht. Die Analysen brachten keine statistisch signifikanten Unterschiede hervor.

6.7.2 Humorale Abstoßung

Zur Untersuchung einer möglichen Beziehung zwischen antikörpervermittelten Abstoßungsreaktionen (AMR) und dem Verlauf der histomorphometrischen Messungen wurde die Patientenpopulation pro FU in eine Gruppe mit positivem AMR-Nachweis und in eine Gruppe ohne Anzeichen einer humoralen Rejektion unterteilt. Dabei wiesen die Patienten zu jedem Untersuchungszeitpunkt mehrheitlich Zeichen einer AMR auf ($p = 0,006$). Im ersten Jahr nach HTx wurden die

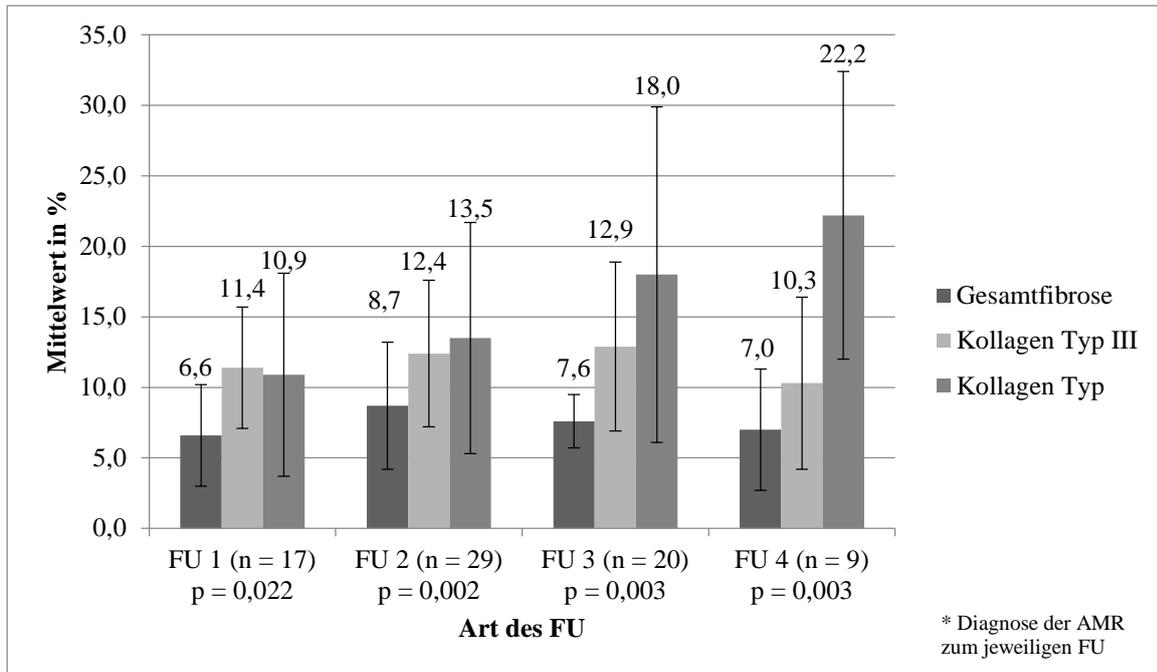
wenigsten Biopsien als AMR-positiv eingeschätzt (54,7%). Die höchste Rate an humoralen Abstoßungen wurde bei FU 4 erreicht (76,3%). Tabelle 11 führt die Anzahl an Positiv- und Negativdiagnosen für jedes FU auf.

Tabelle 11: nachgewiesene antikörpervermittelte Abstoßungsreaktionen pro FU

<i>Art des FU</i>	<i>AMR negativ</i>	<i>AMR positiv</i>
FU1 (n = 63)	27% (17/63)	73% (46/63)
FU 2 (n = 64)	45% (29/64)	55% (35/64)
FU 3 (n = 54)	37% (20/54)	63% (34/54)
FU 4 (n = 38)	24% (9/38)	76% (29/38)
Cochran-Q-Test ($p \leq 0,05$)	0,006	

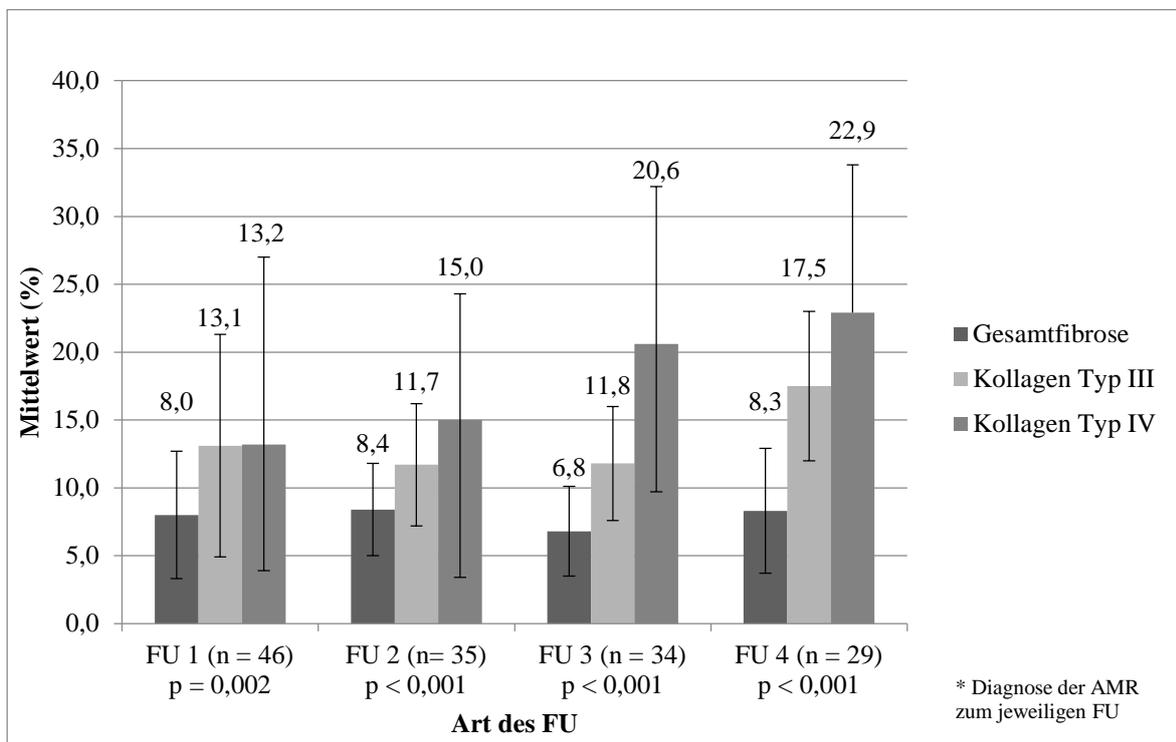
AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; FU – Follow Up; n – Anzahl an Patienten; % – Prozent; p – Signifikanzniveau

Aufgrund der hohen Rate an AMR-Diagnosen wurden die Messergebnisse der drei EZM-Komponenten zwischen AMR-positiven und AMR-freien Patienten pro FU verglichen. In diesem Zusammenhang stellen die nachstehenden Säulendiagramme 29 und 30 die postoperative Wertentwicklung der Fibrose und Kollagen Typ III bzw. IV für AMR-negative und anschließend für AMR-positive Patienten dar. Dabei ließ sich der Werteverlauf innerhalb der einzelnen AMR-Gruppen auf einem Niveau von $p < 0,001$ als statistisch signifikant beweisen. Auch die Mittelwertunterschiede der vermessenen Strukturen waren innerhalb der einzelnen Erhebungszeitpunkte pro Patientengruppe statistisch signifikant.



AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; n – Anzahl an Patienten; p – Signifikanzniveau; % – Prozent

Abbildung 29: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose, Kollagen III und IV (%) bei Patienten ohne AMR* in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4; p < 0,001)



AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; n – Anzahl an Patienten; p – Signifikanzniveau; % – Prozent

Abbildung 30: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose, Kollagen III und IV (%) bei Patienten mit AMR* in fünf Jahren post HTx (FU 1 bis FU 4; p < 0,001)

Im ersten FU nach HTx war der mittlere Fibrosegehalt bei AMR-freien Patienten geringer ausgeprägt als bei Patienten mit Anzeichen für eine AMR ($6,6 \pm 3,6\%$ vs. $8,0 \pm 4,7\%$). Bis zum FU 2 stieg die Fibrose in der AMR-negativen Gruppe jedoch an und überschritt mit einem Durchschnitt von $8,7 \pm 4,5\%$ geringfügig den stabil verlaufenden Mittelwert der AMR-positiven Gruppe ($8,4 \pm 3,4\%$). Im weiteren Verlauf sank die mittlere Fibrose-Rate bei Patienten ohne AMR konsekutiv ab. Demgegenüber zeigten sich die Messwerte der AMR-positiven Gruppe fluktuierend. Im fünften Jahr nach HTx stellte sich der Anteil fibrotischer Läsionen bei Patienten ohne Anzeichen einer humoralen Abstoßung daher deutlich niedriger dar als bei Patienten mit AMR ($7,0 \pm 4,3\%$ vs. $8,3 \pm 4,6\%$).

Der durchschnittliche Kollagen-III-Gehalt stieg in der AMR-freien Gruppe bis zum dritten postoperativen Jahr stetig an und befand sich zum FU 3 mit $12,9 \pm 6,0\%$ auf seinem individuellen Höchstwert. Im fünften Jahr nach HTx sank Kollagen Typ III bei Patienten ohne AMR auf die geringste Rate im postoperativen Untersuchungsintervall und lag damit signifikant unter dem Mittelwert der Gesamtpopulation ($10,3 \pm 6,1\%$ vs. $15,8 \pm 6,4\%$; siehe Abbildung 7 in Abschnitt 6.2.2; $p = 0,001$). Mit $13,1 \pm 13,8\%$ wiesen Patienten mit AMR 30 Tage nach HTx (FU 1) im Mittel eine höhere Rate an Kollagen III auf als die gegenübergestellte Patientengruppe. Bis zum dritten Jahr nach Transplantation (FU 2 und FU 3) gingen die Messwerte jedoch zurück, sodass der Kollagen-III-Gehalt unter den Mittelwerten der AMR-freien Gruppe lag. Im fünften Jahr nach HTx (FU 4) erreichte der Durchschnittsgehalt an Kollagen Typ III bei AMR-positiven Patienten einen individuellen Höchststand von $17,5 \pm 5,5\%$ und lag damit nicht nur deutlich über dem langfristigen postoperativen Niveau der Patienten ohne AMR, sondern auch signifikant über dem Mittelwert der gesamten Patientenpopulation ($15,8 \pm 6,4\%$; siehe Abbildung 7 in Abschnitt 6.2.2; $p < 0,001$). Kollagen Typ IV zeigte in beiden Patientengruppen stetig steigende Messwerte. Die Mittelwerte der AMR-freien Gruppe lagen dabei zu allen Erhebungszeitpunkten unter der durchschnittlichen Kollagen-IV-Rate von AMR-positiven Patienten. Dennoch näherten sich die Gruppen im langfristigen Beobachtungsverlauf an. Zum FU 4 betrug der mittlere Kollagen-IV-Gehalt in den Gewebeproben der Patienten ohne Anzeichen für eine AMR im Mittel $22,2 \pm 10,2\%$, während der durchschnittliche Anteil bei Patienten mit AMR bei $22,9 \pm 10,9\%$ zu verzeichnen war. Damit lag die mittlere Kollagen-IV-Rate im fünften Jahr nach HTx in beiden AMR-Gruppen auf einem mit der Gesamtpopulation vergleichbarem Wert ($22,7 \pm 10,6\%$; siehe Abbildung 8 in Abschnitt 6.2.3).

Die Unterschiede in den histomorphometrischen Messwerten der Patienten mit bzw. ohne AMR konnten bis auf den mittleren Kollagen-III-Gehalt zum FU 4 ($p = 0,007$) nicht als statistisch signifikant herausgestellt werden. Auch anhand des Korrelationskoeffizienten nach Spearman ergab

sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten einer AMR und dem Verlauf der gemessenen Mittelwerte.

Weiterhin galt es zu analysieren, ob das Auftreten humoraler Abstoßungsreaktionen im frühen Zeitverlauf nach Transplantation einen besonderen Einfluss auf die anschließende Wertentwicklung der untersuchten Strukturen nimmt. Patienten, die bereits innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx Anzeichen für eine AMR zeigten, erreichten im langfristigen Beobachtungszeitraum einen höheren Gehalt an Fibrose und Kollagen Typ III als Patienten, die im kurzfristigen postoperativen Intervall AMR-frei blieben. Im fünften Jahr nach HTx wiesen die Gewebeproben der frühzeitig AMR-positiven Patienten eine mittlere Fibrose von $8,0 \pm 3,7\%$ auf im Vergleich zu $6,2 \pm 3,1\%$ bei AMR-freien Patienten. Der Durchschnittsgehalt an Kollagen III lag bei Patienten mit AMR mit $16,1 \pm 6,5\%$ deutlich über dem Niveau der abstoßungsfreien Patienten ($13,9 \pm 7,7\%$). Für Kollagen Typ IV ließ sich in der bereits zum FU 1 AMR-positiv getesteten Patientengruppe im gesamten postoperativen Zeitintervall ein steigender Trend beobachten. Dahingegen stellte sich der Verlauf der mittleren Kollagen-IV-Rate in der Gruppe ohne AMR eher schwankend dar. So lag der Messwert von Kollagen Typ IV bei zum FU 1 AMR-freien Patienten zwar bereits im dritten Jahr nach HTx auf seinem höchsten Level ($26,9 \pm 10,6\%$), überstieg jedoch auch im abschließenden FU 4 den Mittelwert der Patienten mit AMR ($23,4 \pm 8,7\%$ vs. $22,2 \pm 11,1\%$).

In der Patientengruppe, die bereits in der Frühphase nach HTx Anzeichen für eine AMR aufwies, stellte sich der Verlauf von Kollagen Typ III und IV im postoperativen Beobachtungszeitraum mit $p = 0,007$ bzw. $0,009$ statistisch signifikant dar. Währenddessen ergab der Mann-Whitney-U-Test zum jeweiligen FU für keine der Strukturen statistisch plausible Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Für eine detaillierte Ergebnisdarstellung wird auf die Abbildungen A10 bis A12 im Anhang verwiesen.

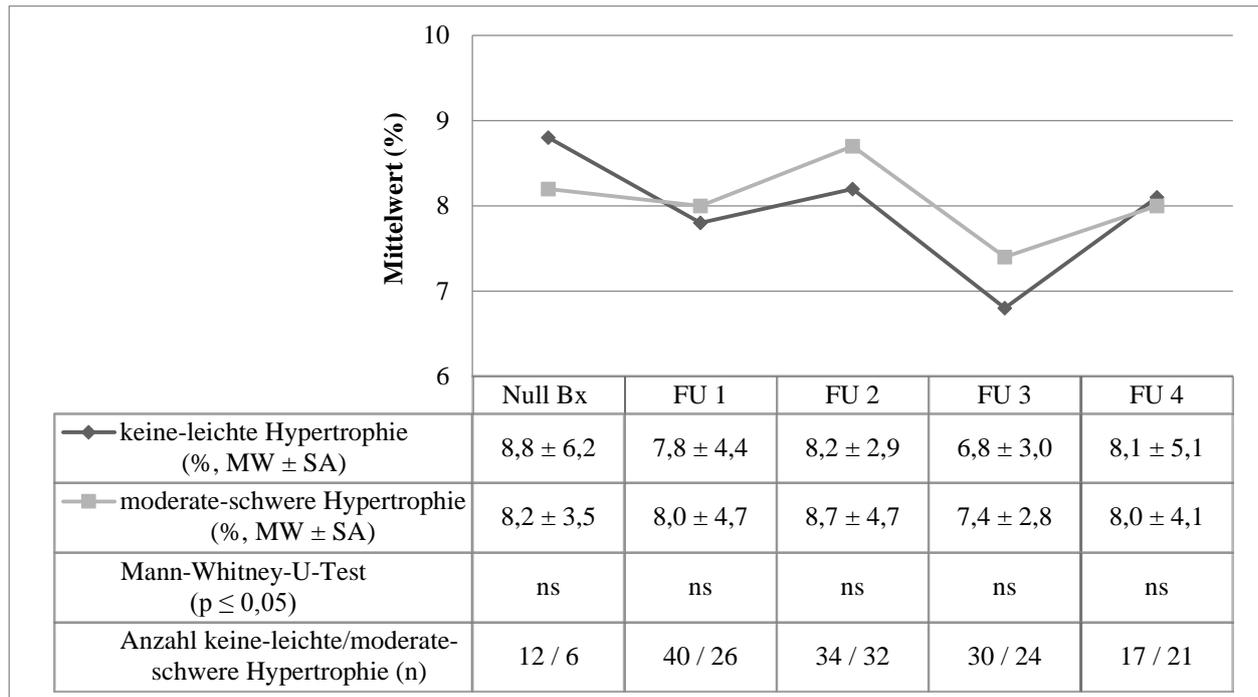
6.8 Abhängigkeit von morphologischen Befundergebnissen

6.8.1 Morphologie der Myozyten

Im postoperativen Zeitverlauf verändern sich Größe und Form der Herzmuskelzellen im Transplantat. Zur Klärung einer möglichen Wechselwirkung wurde die Wertentwicklung der Gesamtfibrose und von Kollagen Typ III unter dem Gesichtspunkt einer nachgewiesenen HMZ-Vergrößerung betrachtet. Kollagen Typ IV wurde aufgrund seiner ausschließlichen Lokalisation in den Basalmembranen nicht in die Auswertung einbezogen. Zu jedem FU wurden die Biopsien mit

einer moderat bzw. schwer ausgeprägten Myozytenhypertrophie den Gewebeproben gegenübergestellt, in denen keine oder allenfalls nur eine geringe Hypertrophie der Myozyten nachgewiesen wurde.

In beiden Hypertrophie-Gruppen entsprach die Entwicklung der Gesamtfibrose dem in Abschnitt 6.2.1 erläuterten Messverlauf der Gesamtpopulation. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede für den mittleren Fibrosegehalt in Abhängigkeit von der myozytären Struktur. Abbildung 31 vergleicht den Werteverlauf in beiden Hypertrophiegruppen.

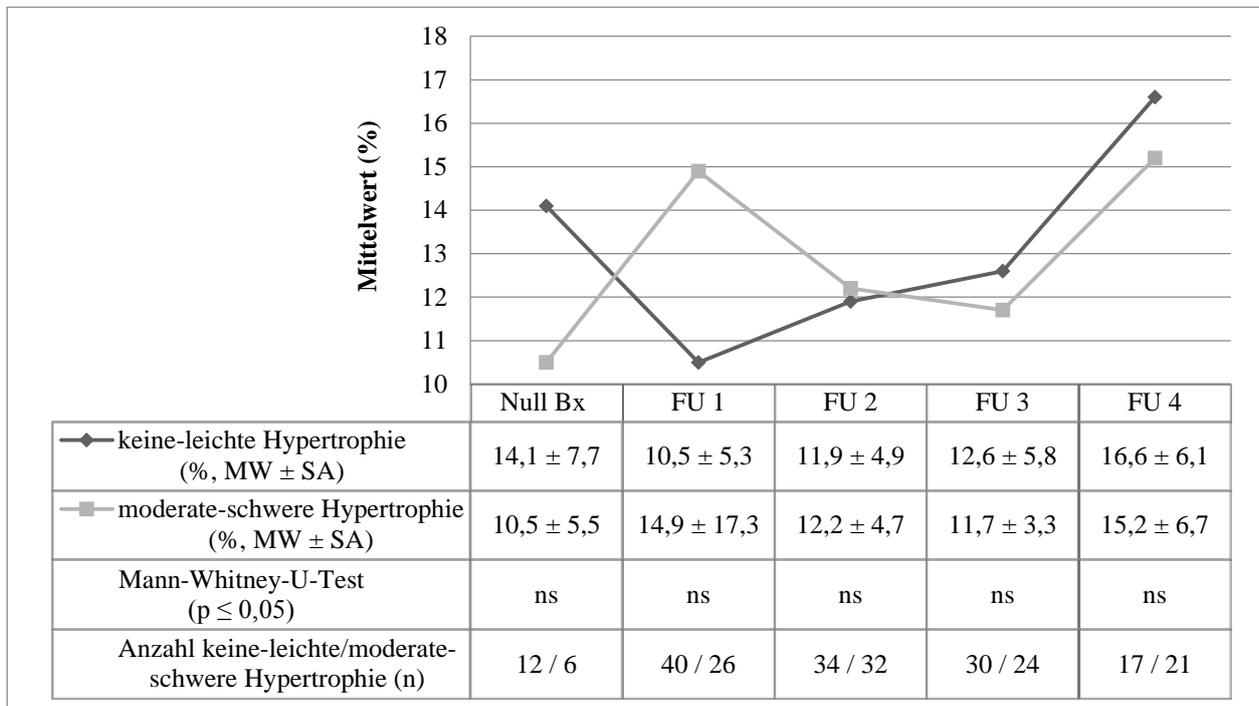


FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 31: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) bei Patienten mit maximal leicht ausgeprägter vs. moderater bis schwerer Myozytenhypertrophie in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Der mittlere Kollagen-III-Gehalt stieg in der Gruppe mit geringfügiger HMZ-Vergrößerung im postoperativen Zeitintervall konsequent bis zu einem Durchschnittswert von $16,6 \pm 6,1\%$ im fünften Jahr nach HTx an. Langfristig wiesen die Patienten mit leichtgradiger Myozytenhypertrophie somit signifikant mehr Kollagen Typ III auf als die gesamte Patientenpopulation ($15,8 \pm 6,4\%$; siehe Abbildung 6 in Abschnitt 6.2.2; $p < 0,001$). Bei Patienten mit schwer ausgeprägter HMZ-Vergrößerung zeigte der mittlere Anteil an Kollagen Typ III einen schwankenden Verlauf. Beginnend bei $14,9 \pm 17,5\%$ zum FU 1 sank der durchschnittliche Messwert bis zum FU 3 auf $11,7 \pm 3,3\%$. Im abschließenden FU 4 stieg der kollagene Mittelwert noch einmal deutlich auf $15,2 \pm$

6,7%. Fünf Jahre post HTx entwickelten Patienten mit schwerer HMZ-Hypertrophie dennoch nicht nur signifikant weniger Kollagen Typ III als die gesamte Studienpopulation ($15,8 \pm 6,4\%$; siehe Abbildung 7 in Abschnitt 6.2.2; $p < 0,001$), sondern lagen ebenso unter dem Spitzenwert der Gruppe mit geringer HMZ-Hypertrophie. Diese Unterschiede ließen sich nicht als statistisch signifikant beweisen. Abbildung 32 vergleicht den mittleren Kollagen-III-Gehalt beider Hypertrophiegruppen im Zeitverlauf.



FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 32: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) bei Patienten mit maximal leicht ausgeprägter vs. moderater bis schwerer Myozytenhypertrophie in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Ein Vergleich der mittleren Anteile von Fibrose und Kollagen III innerhalb der individuellen Hypertrophiegruppen zeigte, dass Kollagen Typ III zu allen Untersuchungszeitpunkten stärker ausgeprägt war als fibrotische Läsionen. Die Messwertunterschiede zwischen Fibrose und Kollagen Typ III bestätigten sich im Wilcoxon-Test mit Ausnahme der Null Bx bei Patienten mit schwerer HMZ-Vergrößerung ($p = 0,345$) als statistisch signifikant (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Signifikanz der Unterschiede zwischen dem mittleren Gehalt von Gesamtfibrose und Kollagen Typ III in Abhängigkeit von einer Herzmuskelzellvergrößerung

Wilcoxon-Test: $p \leq 0,05$		
<i>Art des FU</i>	<i>keine – leichte Myozytenhypertrophie</i>	<i>moderate –starke Myozytenhypertrophie</i>
Null Bx	0,028	ns
FU 1	0,016	0,002
FU 2	< 0,001	< 0,001
FU 3	< 0,001	< 0,001
FU 4	< 0,001	< 0,001

FU – Follow up; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau

Weiterhin wurde untersucht, ob die Ausbildung einer Myozytenhypertrophie innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage signifikante Auswirkungen auf den weiteren Messverlauf von Fibrose und Kollagen Typ III haben könnte. Patienten, die zum FU 1 allenfalls eine geringe HMZ-Vergrößerung aufwiesen, tendierten langfristig zu höheren Fibrose- und Kollagen-III-Werten als Patienten mit zum FU 1 schwer ausgeprägter Hypertrophie (FU 4 – mittlere Fibroserate: geringe HMZ-Hypertrophie: $8,6 \pm 5,0\%$; $n = 21$ vs. schwere HMZ-Hypertrophie: $7,5 \pm 3,6\%$; $n = 13$; FU 4 – mittleres Kollagen Typ III: geringe HMZ-Hypertrophie: $17,2 \pm 6,4\%$; $n = 21$ vs. schwere HMZ-Hypertrophie: $14,7 \pm 5,8\%$; $n = 13$). Eine statistische Signifikanz konnte in diesem Zusammenhang jedoch nicht herausgearbeitet werden. Lediglich für den postoperativen Wertverlauf der Patientengruppe, deren HMZ 30 Tage nach HTx maximal gering vergrößert waren, konnte eine statistische Signifikanz von $p = 0,016$ erzielt werden. Daher wird auf eine weiterführende Ergebnisdarstellung verzichtet.

6.8.2 Morphologie des Gefäßendothels

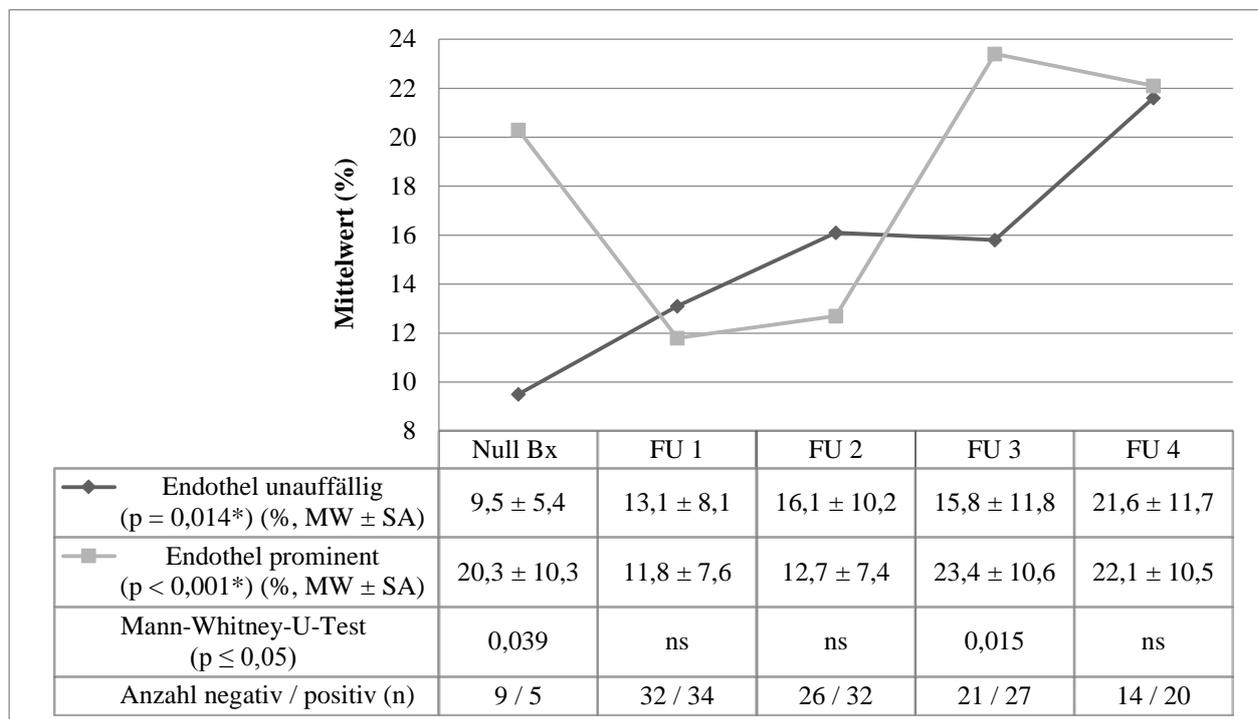
Für das Basalmembran-ständige Kollagen Typ IV sollte eine mögliche Beziehung zu morphologischen Veränderungen des Gefäßendothels evaluiert werden. Dieses stellte sich zu fast allen Erhebungszeitpunkten mehrheitlich unauffällig dar. Lediglich zum FU 1 wurde eine vermehrte Prominenz der Endothelzellen beobachtet. Eine starke Endothelschwellung trat zu keinem Zeitpunkt auf. Tabelle 13 fasst die Ergebnisse der morphologischen Endothelbefundung pro FU zusammen.

Tabelle 13: Morphologie des Endothels in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

Art des FU	Endothel unauffällig	Endothel prominent
Null Bx (n = 16)	88% (14/16)	12% (2/16)
FU 1 (n = 66)	49% (32/66)	51% (34/66)
FU 2 (n = 65)	55% (36/65)	45% (29/65)
FU 3 (n = 53)	60% (32/53)	40% (21/53)
FU 4 (n = 38)	55% (21/38)	45% (17/38)
Cochran-Q-Test (p ≤ 0,05)	ns	

FU – Follow up; HTx – Herztransplantation; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; % – Prozent; p – Signifikanzniveau

Gemäß Tabelle 13 ließen sich Veränderungen in der Struktur der Endothelzellen vornehmlich innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx (FU 1) beobachten. Daher wurde der Messverlauf des mittleren Kollagen IV von Patienten mit unauffälligem Endothelzellstatus zum FU 1 mit den Gewebeproben von Patienten verglichen, deren Endothel im kurzfristigen postoperativen Intervall als prominent auffiel (siehe Abbildung 33).



* für den Zeitraum nach HTx

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung; vs. – versus

Abbildung 33: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) bei Patienten mit unauffälligem vs. prominentem Endothel zum FU 1 in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

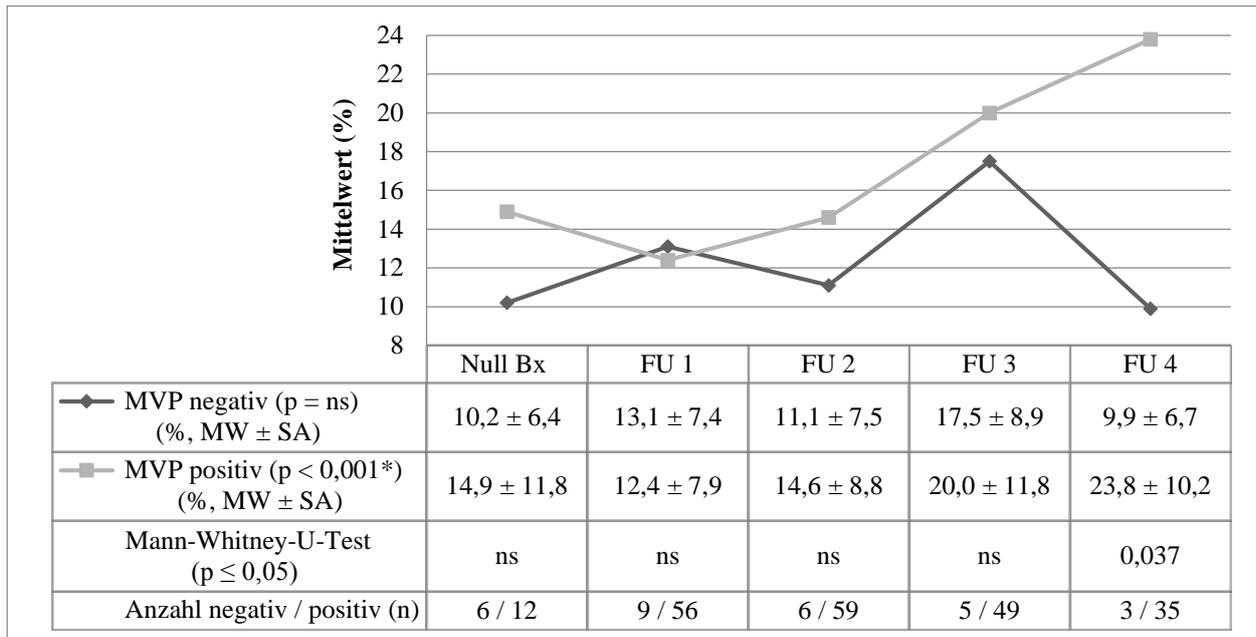
Bereits zum Zeitpunkt der HTx wiesen Patienten mit prominentem Endothel einen deutlich höheren Anteil an Kollagen Typ IV auf als die Gruppe mit unauffälligem Gefäßendothel ($20,3 \pm 10,3\%$ vs. $9,5 \pm 5,4\%$; $p = 0,039$). In letztgenannter Gruppe nahm Kollagen Typ IV innerhalb des ersten Jahres nach HTx konsequent zu, sodass die Messwerte den mittleren Kollagen-IV-Gehalt der Gruppe mit prominentem Endothel sowohl zum FU 1 als auch FU 2 überschritten. Auch im langfristigen Untersuchungszeitraum stieg die durchschnittliche Kollagen-IV-Rate in der Gruppe, die zum FU 1 unauffällige Endothelzellen präsentierte, weiterhin an. Dennoch erreichte die Vergleichsgruppe mit prominentem Endothel im mittel- und langfristigen Beobachtungszeitraum (FU 3 und FU 4) stärkere Messwerte. Insbesondere im dritten Jahr nach HTx ließ sich in der Gruppe mit prominentem Gefäßendothel statistisch signifikant mehr Kollagen IV nachweisen als bei Patienten mit unauffälligem Endothel ($23,4 \pm 10,6\%$ vs. $15,8 \pm 11,8\%$; $p = 0,015$). Auch die postoperativen Werteverläufe innerhalb der individuellen Gruppen waren statistisch signifikant.

6.8.3 Mikrovaskulopathie

Im Langzeitverlauf nach HTx wirken sich mikrovaskulopathische Veränderungen im Gefäßbett des Myokards limitierend auf das Überleben aus. Vor allem Kollagen Typ IV könnte in diesem Zusammenhang aufgrund seiner Lokalisation in Basalmembranen von Veränderungen in der Strombahn betroffen sein. Daher wurde untersucht, ob sich eine Wechselwirkung zwischen dem Auftreten einer Mikrovaskulopathie (MVP) und dem mittleren Kollagen-IV-Gehalt im postoperativen Zeitverlauf ergibt. Dazu wurde die Patientenpopulation in zwei Subgruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfasste Patienten, für die im gesamten Erhebungszeitraum keine Hinweise auf eine MVP vorlagen. Die zweite Gruppe enthielt Patienten, deren Gefäßwandstärke im postoperativen Zeitraum mindestens einmalig mit Grad 2 (entspricht einer MVP – siehe dazu Abschnitt 5.3) bewertet wurde.

In der MVP-freien Gruppe unterlag der mittlere Kollagen-IV-Gehalt im postoperativen Zeitraum deutlichen Schwankungen. Innerhalb der ersten 30 Tage stieg der gemessene Anteil zunächst deutlich von $10,2 \pm 6,4\%$ (Null Bx) auf $13,1 \pm 7,4\%$ (FU 1), zeigte sich im weiteren Verlauf des ersten Jahres allerdings rückläufig. Im dritten Jahr nach HTx erreichte die durchschnittliche Kollagen-IV-Rate bei Patienten ohne MVP einen Spitzenwert von $17,5 \pm 8,9\%$. Dieser Messwert fiel zum fünfjährigen FU 4 auf einen postoperativen Tiefstwert von $9,9 \pm 6,7\%$ zurück. Demgegenüber zeigte sich die Messwerte der MVP-positiven Patientengruppe über den gesamten Untersuchungsverlauf nach HTx mit statistisch signifikant steigender Tendenz ($p < 0,001$). So entwickelten Patienten mit MVP ab dem ersten Jahr post HTx im Durchschnitt mehr Kollagen Typ IV als MVP-

freie Patienten. Insbesondere im fünften Jahr nach HTx überschritt die mittlere Kollagen-IV-Rate MVP-positiver Patienten erheblich die der Vergleichsgruppe ($23,8 \pm 10,2\%$ vs. $9,9 \pm 6,7\%$; $p = 0,037$). Der sich daraus ergebende Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer MVP und dem langfristigen Durchschnittsgehalt an Kollagen Typ IV konnte anhand des Korrelationskoeffizienten nach Spearman bestätigt werden ($r = 0,343$; $p = 0,035$). Alle weiteren Unterschiede waren ebenso wie der individuelle Wertverlauf der MVP-freien Patienten statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 34).



* für den Zeitraum nach HTx

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung 34: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit von einer Mikrovasculopathie in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)

6.9 Lineares Regressionsmodell

Abschließend wurde in einem Regressionsmodell untersucht, ob der Gesamtgehalt an Fibrose, Kollagen Typ III und IV (Summe der Mittelwerte von Null Bx bis FU 4) durch die in den Abschnitten 6.4 bis 6.8 dargestellten Faktoren beeinflusst wurde. Folgende unabhängige Variablen wurden in die lineare Regressionsanalyse einbezogen:

- Geschlecht („Geschlecht“),
- Überlebensstatus zum Zeitpunkt der Datenerhebung („Überlebensstatus“),
- Ischämie bei HTx ≤ 211 bzw. > 211 Minuten („Ischämie“),

- Altersdifferenz zwischen Transplantatempfänger und -spender bei HTx („Altersdifferenz Patient – Spender“),
- Alter des Patienten bei HTx („Alter Patient bei HTx“),
- mindestens einmalige zelluläre Abstoßung im Beobachtungszeitraum („ACR“),
- mindestens einmalige humorale Abstoßung im Beobachtungszeitraum („AMR“),
- mindestens einmalige Mikrovaskulopathie im Beobachtungszeitraum („MVP“).

Anhand der Maßzahl R-Quadrat (R^2) wurde überprüft, zu welchem Anteil die oben genannten Einflussvariablen Variationen der drei abhängigen Variablen Fibrose, Kollagen Typ III und IV erklären können. Je mehr unabhängige Variablen in die Untersuchung eingehen, desto größer wird tendenziell auch R^2 . Das korrigierte R^2 berücksichtigt in diesem Zusammenhang die Komplexität des Regressionsmodells und eignet sich daher zur besseren Beschreibung, inwieweit Veränderungen in den abhängigen Variablen tatsächlich auf die benannten Einflussfaktoren zurückgehen. Tabelle 14 gibt das Ergebnis der R^2 -Analyse wider.

Tabelle 14: Anteil der Einflussfaktoren an Veränderungen des mittleren Gesamtgehaltes von Fibrose, Kollagen Typ III und IV

<i>Einflussvariablen</i>	Geschlecht, Überlebensstatus, Ischämie, Altersdifferenz Patient – Spender, Alter Patient bei HTx, ACR, AMR, MVP		
<i>EZM-Komponente im gesamten Zeitraum</i>	<i>R-Quadrat</i>	<i>Korrigiertes R-Quadrat</i>	<i>Signifikanz ($p \leq 0,05$)</i>
Fibrose	0,188	0,083	ns
Kollagen Typ III	0,294	0,203	0,004
Kollagen Typ IV	0,335	0,249	0,001

ACR – akute zelluläre Abstoßung; AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; EZM – extrazelluläre Matrix; HTx – Herztransplantation; MVP – Mikrovaskulopathie; ns – nicht signifikant; p – Signifikanzniveau

Das korrigierte R^2 von 0,203 für Kollagen Typ III zeigte, dass 20,3% der Veränderungen im Kollagen-III-Gesamtgehalt mit einer Signifikanz von $p = 0,004$ durch Veränderungen der unabhängigen Einflussfaktoren erklärt werden können. Für den Gesamtwert an Kollagen Typ IV konnten sogar 24,9% der gemessenen Veränderungen durch Variationen in den untersuchten Variablen erklärt werden (korrigiertes R-Quadrat: 0,249; $p = 0,001$). Veränderungen im Fibrosegehalt konnten nicht in einen statistisch plausiblen Zusammenhang mit Veränderungen der Einflussvariablen gebracht werden.

Durch die Auswertung standardisierter Regressionskoeffizienten wurde heruntergebrochen, welchen individuellen Beitrag die Einflussfaktoren auf Veränderungen der drei abhängigen Variablen leisten. In Tabelle 15 werden die Regressionskoeffizienten der benannten Einflussvariablen dargestellt. Ein Wert von 0 verneint einen linearen Zusammenhang, während ein Wert von 1 einen vollständigen linearen Zusammenhang zwischen Einflussgröße und abhängiger Variable angibt.

Tabelle 15: individueller Beitrag der Einflussfaktoren zu Veränderungen des mittleren Gesamtgehaltes von Fibrose, Kollagen Typ III und IV

Einflussvariable	EZM-Komponente im gesamten Untersuchungszeitraum					
	Fibrose		Kollagen Typ III		Kollagen Typ IV	
	Regressionskoeffizient*	Signifikanz $p \leq 0,05$	Regressionskoeffizient*	Signifikanz $p \leq 0,05$	Regressionskoeffizient*	Signifikanz $p \leq 0,05$
Geschlecht	-0,071	ns	-0,029	ns	0,127	ns
Überlebensstatus	-0,192	ns	-0,272	0,021	-0,185	ns
Ischämie	0,061	ns	0,183	ns	-0,040	ns
Altersdifferenz Patient - Spender	0,111	ns	0,152	ns	0,027	ns
Alter Patient bei HTx	0,021	ns	0,002	ns	-0,115	ns
ACR	0,103	ns	-0,039	ns	0,866	ns
AMR	0,132	ns	0,187	ns	0,184	ns
MVP	0,277	0,026	0,341	0,004	0,397	0,001

* standardisierter Regressionskoeffizient (Beta-Wert) der linearen Regression

ACR – akute zelluläre Abstoßung; AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; EZM – extrazelluläre Matrix; HTx – Herztransplantation; MVP – Mikrovaskulopathie; ns – nicht signifikant; p – Signifikanzniveau

Für die Mehrzahl der Einflussfaktoren konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem durchschnittlichen Gesamtgehalt an Fibrose bzw. Kollagen Typ III und IV abgeleitet werden. Lediglich das Auftreten einer Mikrovaskulopathie war signifikant mit allen drei EZM-Komponenten assoziiert. Dabei waren die ermittelten Zusammenhänge mit Regressionskoeffizienten von $< 0,4$ eher als schwach positiv zu bewerten. Darüber hinaus ergab sich ein schwach negativer, signifikanter Zusammenhang zwischen dem Überlebensstatus bei Datenerhebung und der mittleren Gesamtrate an Kollagen Typ III ($r = -0,272$; $p = 0,021$).

7 Diskussion

7.1 Diskussion von Material und Methodik

Diese histomorphometrische Arbeit wertete insgesamt 274 RV-EMB von 78 Patienten im fünfjährigen Zeitverlauf nach HTx aus. Die Patienten waren Teilnehmer einer prospektiven Studie, für deren Einschluss klare Kriterien vorlagen (siehe Abschnitt 4). Die Größe der Gesamtpopulation war bereits zu Beginn der Arbeit unveränderbar. Sie ließ eine statistische Auswertung zweifelsfrei zu, da die Studienpopulation und ihre Spender in ihren demografischen Merkmalen einer typischen europäischen Transplantkohorte entsprachen.⁸

Das analysierte Gewebematerial wurde im Rahmen von Herzkatheteruntersuchungen gewonnen, die zu fest definierten Erhebungszeitpunkten stattfanden. Im DHZB erfolgte die Probenentnahme entsprechend internationaler Leitlinien aus dem interventrikulären Septum über einen transfemorale Zugang. Das interventrikuläre Septum ist durch den Übergang in den linken Ventrikel und durch eine bessere Stärke im Vergleich zur freien Wand des rechten Ventrikels weniger anfällig für postinterventionelle Komplikationen und demnach als Entnahmeort zu bevorzugen.⁷⁸ Durch die „blinde“ Entnahmetechnik mittels Biopptom werden zufällige Myokardareale angesteuert. Dadurch wird Gewebe aus verschiedenen Gebieten des interventrikulären Septums entnommen und das Prinzip der zufälligen Stichprobenentnahme weitestgehend eingehalten.⁷⁹ Bei wiederholter Probenentnahme erreicht das Katheterbiopptom tendenziell jedoch immer wieder die gleiche myokardiale Stelle. Durch Umorganisation besteht das Gewebe in diesem Bereich zunehmend aus fibrotischen und narbigen Läsionen. Häufige Biopsientnahmen können den Anteil an Narbengewebe im Zeitverlauf nach HTx somit fälschlicherweise in die Höhe treiben.⁷⁸ Um eine aussagekräftige histologische Interpretation sicherzustellen, wurden an den Entnahmeprozess daher folgende Anforderungen gestellt:

- Zugangsort für Katheterbiopptom: rechte Jugular- oder Femoralvene
- Ort der Probenentnahme: rechtsventrikuläres bzw. interventrikuläres Gewebe
- Anzahl der Proben: mindestens 3
- Größe der einzelnen Probe: mindestens 3x2x2 Millimeter
- Zusammensetzung der Probe: mindestens 50% Myokard und möglichst wenig thrombotisches Material bzw. Narbengewebe
- Anzahl der HE-Färbungen: mindestens 3. ^{26, 73, 78, 80}

Die Gewebeproben wurden aus verschiedenen Blickwinkeln neu evaluiert, um quantitative Rückschlüsse auf postoperative Umbauvorgänge in der EZM des Myokards ziehen zu können. Die histologische Materialaufbereitung erfolgte dabei im Rahmen standardisierter Methoden.²⁸ Sirius-

Rot gefärbte Schnitte wurden histomorphometrisch mit immunhistochemisch dargestelltem Kollagen Typ III und IV verglichen. Die Arbeitsgruppe um Sweat führte die Sirius-Rot-Färbung 1964 als geeignete Darstellungsform interstitieller Fasern ein. Noch heute wird sie als Routinefärbung fibrotischer Läsionen angewendet.⁸¹ Neben der einfachen und reproduzierbaren Handhabung gehört die langanhaltende, kräftige Farbausbildung zu den Vorteilen des Sirius-Rot-Verfahrens.^{81, 82} Die basischen Aminosäuren von Kollagen reagieren intensiv mit dem säurehaltigen, anionischen Farbstoff. Dadurch ermöglicht sich eine präzise Lokalisation von Gewebebestandteilen, die Kollagenmoleküle enthalten.^{83, 84} Es kann jedoch nicht zwischen kollagenen Subtypen differenziert werden. Dazu kommen immunhistochemische Nachweisverfahren zum Einsatz.⁵⁵ Im DHZB wird die Sirius-Rot-Färbung seit ihrer Einführung nach einem einheitlichen Protokoll angefertigt. Die Anfärbung von Kollagen Typ III und IV erfolgte bis 2004 manuell durch eine Alkalische Phosphatase-Reaktion. Nach 2004 wurde sie zur Prozessoptimierung mittels Avidin-Biotin-Methode automatisiert. Von dieser Verfahrensanpassung sind auch wenige, vor 2004 entnommene Gewebeproben der Studie betroffen. Vor Umstellung der Färbemethodik erfolgten jedoch umfangreiche Tests, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Zudem ließen sich zwischen den Messergebnissen der in der Studie verwendeten Präparate vor 2004 und den Präparaten, die automatisiert aufbereitet wurden, keine deutlichen Unterschiede feststellen. Aus diesem Grund wird unabhängig vom Aufbereitungszeitpunkt von einer Vergleichbarkeit der immunhistochemischen Darstellungsverfahren ausgegangen.

Die computer-gestützte Bilddatenanalyse schuf einheitliche und objektive Bedingungen für die quantitative Auswertung der Präparate. Die unterschiedliche Farbintensität der Strukturen konnte kompensiert werden, indem die Software vor der morphometrischen Analyse stets auf die individuelle Farbe des Präparates eingestellt wurde. Eine potenzielle Fehlerquelle lag in der manuellen Einstellung der 12 Gesichtsfelder pro Probe. Durch das mäanderförmige Abfahren der Präparate konnte eine zufällige Messfeldauswahl sichergestellt werden. Weiterhin wurde die Beurteilung von während der Probenentnahme entstandenen Schnittkantenläsionen weitestgehend vermieden, indem möglichst nur intakte, zentral liegende Areale der Gewebeproben vermessen wurden.

Eine Gruppe medizinisch-technischer Assistentinnen des DHZB führte die Fibrosemessungen durch. Durch ihre langjährige Erfahrung mit histomorphometrischen Vermessungen ist die Interobserver-Variabilität als relativ gering einzuschätzen. Die Auswertung von Kollagen Typ III und IV erfolgte nur durch einen Untersucher. Daher kann angenommen werden, dass das Risiko einer Ergebnisverzerrung durch eine unterschiedliche Mess-Handhabung minimiert wurde. Darüber hinaus hielten alle Untersucher bei der Auswahl ihrer Messfelder einheitliche Prinzipien ein (siehe

Abschnitt 5.2 bzw. obiger Text). Die Zellarchitektur war in einigen Gewebeproben jedoch stark zerstört. Für die Sirius-Rot-Färbung standen pro Biopsie meist drei bis vier Schnitte pro Objektträger zur Verfügung. Daher konnte unter Umständen auf einen anderen Gewebeschnitt zurückgegriffen werden, um den Messvorgang mit 12 unterschiedlichen Einstellungen abzuschließen. Die immunhistochemischen Präparate lagen meist nur in einfacher Ausführung vor. Um eine Doppelmessung bereits ausgewählter Gesichtsfelder zu vermeiden, wurde der Messvorgang daher vorzeitig abgeschlossen, wenn die Gewebestruktur zu stark unterbrochen oder das Schnittpräparat zu klein war. In Einzelfällen musste so auf eine Messfläche ausgewichen werden, die geringer als die definierte Mindestgröße von einem Quadratmillimeter war. In die statistische Analyse flossen alle Einzelwerte ein. Dies führte zu einer hohen Streuung der Ergebnisse, die bei Auswertungen anhand der nivellierten Mittelwerte aus den Befundberichten (siehe Abbildungen A1 bis A3 im Anhang) vermutlich geringer ausgefallen wäre. Dennoch wurde auf die Analyse der konsolidierten Mittelwerte bewusst verzichtet, um ein genaueres Abbild der interstitiellen Struktur im Myokard zu schaffen.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Verlauf der dargestellten interstitiellen Strukturen in fünf Jahren nach HTx

7.2.1.1 Gesamtfibrose

Für die Mehrheit der Gewebeproben zeigte sich der interstitielle Fibrosegehalt zu allen Erhebungszeitpunkten innerhalb des im DHZB definierten Normbereichs von $\leq 9\%$ (siehe Tabelle 6 im Abschnitt 6.2.1). Die Entwicklung fibrotischer Läsionen unterlag insbesondere im ersten postoperativen Jahr (FU 1 und FU 2) einem dynamischen Prozess. Nach einem Rückgang innerhalb der ersten 30 Tage stieg die mittlere Fibrose bereits im ersten Jahr nach HTx auf ihren postoperativen Höchstwert von $8,5 \pm 3,9\%$. Im dritten und fünften postoperativen Jahr blieb der Anteil fibrotischer Läsionen dahingegen auf einem konstanten Niveau.

Auch Schnabel et al. bewiesen in zwei histomorphometrischen Studien^{64, 65} statistisch signifikant, dass der durchschnittliche Fibrosegehalt im ersten Jahr nach HTx ansteigt. Dies betraf vor allem den perimysialen Raum und war unabhängig von fibrotischen Läsionen, die aus wiederholten Biopsieentnahmen resultierten. Der postoperative Anstieg der Fibrose im ersten Jahr könnte somit auf einer tatsächlichen Zunahme interstitieller Fasern beruhen. In diesem Falle sind die Läsionen Ausdruck einer gestörten Synthese-Regulation in der EZM des Myokards und als reaktive Fibrose zu werten. Diese These wird durch den kontinuierlichen Rückgang des Narbengewebes, das sich

eher im Rahmen reparativer Prozesse ausgebildet, untermauert (siehe Abbildung 6 im Abschnitt 6.2.1). Als Reaktion auf den zunehmenden Bindegewebsgehalt nimmt der Anteil der Herzmuskelzellen ab. Dies führt zu einer Hypertrophie der verbleibenden Kardiomyozyten. Im Langzeitverlauf nach HTx könnte die mechanische Funktion des Herzens dadurch beeinträchtigt werden. Daher erscheint es sinnvoll, die Entwicklung der myokardialen Fibrose auch über das erste postoperative Jahr hinaus zu beobachten.⁶⁴

Zur detaillierten Bewertung der Untersuchungsergebnisse liegen nur wenige Studien vor, die die myokardiale Fibrose nach HTx anhand der Sirius-Rot-Färbung analysieren. In der Mehrheit dieser Veröffentlichungen sind die untersuchten Fallzahlen deutlich geringer als in der vorliegenden Arbeit.

Boni⁶⁹ untersuchte den mittleren Fibrosegehalt innerhalb von fünf Jahren post HTx anhand von 2551 EMB. Diese verteilten sich auf ein Kollektiv von 855 Patienten, die zwischen Januar 1998 und Dezember 2009 im DHZB herztransplantiert wurden. Dabei zeigte sich insbesondere im ersten postoperativen Jahr ein Anstieg der gemessenen Mittelwerte von 9,76% im ersten Monat auf 14,23% im fünften Monat nach HTx. Im langfristigen Verlauf war der durchschnittliche Gehalt fibrotischer Läsionen eher rückläufig und sank auf ein relativ konstantes Niveau ab.

Vanhoutte et al.⁶³ stellten in 102 seriellen EMB von 39 Patienten statistisch signifikant dar, dass sich der durchschnittliche Fibrosegehalt im achten Monat nach HTx im Vergleich zum ersten postoperativen Monat nahezu verdoppelt (5% vs. ca. 2,7%). Damit zeigte die Ausbildung fibrotischer Läsionen im ersten Jahr nach HTx zwar einen noch dynamischeren Verlauf als in der vorliegenden Untersuchung. Die Messwerte unterschritten die Ergebnisse der vorliegenden Studie jedoch deutlich.

Gramley et al.⁷² studierten die zehnjährige Entwicklung myokardialer Fibrose in sechs-monatigen Intervallen bei 57 herztransplantierten Patienten anhand von histomorphometrischen Messungen in 2 Gesichtsfeldern. Der nachgewiesene Gehalt an Fibrose überstieg die Messwerte der vorliegenden Arbeit deutlich. Bereits zum Zeitpunkt der HTx lag der mittlere Fibrosegehalt bei 12,5%, im ersten Jahr nach HTx bei ca. 16,5%. Auch im weiteren Verlauf zeigte der Anteil an Fibrose im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine signifikant steigende Tendenz. So wurden im dritten Jahr nach HTx Mittelwerte von ca. 19,5% und im fünften Jahr ca. 22,5% erreicht.

Die weitere Beurteilung der erzielten Ergebnisse erfolgt anhand von Studien, die sich der Trichrom-Färbung nach Masson bedienen. Im Unterschied zur Sirius-Rot-Färbung heben sich kollagene Fasern hierbei blau von braun gefärbten Muskelfibrillen und rotem Fibrin ab.

In den Analysen von Koch et al.⁶⁰ stand die Frühphase nach HTx im Vordergrund. Sie dokumentierten die Ausbildung endo- und perimysialer Fibrose in den ersten zwei postoperativen Wochen bei 58 Patienten. Vor allem in der ersten Woche nach HTx zeigte sich in der gesamten Studienpopulation ein signifikanter Anstieg des peri- und endomysialen Bindegewebes. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass diese Veränderungen als Anpassungsreaktionen auf nicht-physiologische Reize erfolgen, die mit dem Transplantationsvorgang *per se* verbunden sind.

Der Verlauf der prozentualen Fibrose in der zehnjährigen Beobachtungsstudie von Nozynski et al.⁷¹ zeigte sich vergleichbar mit den vorliegenden Studienergebnissen. In ihrer Untersuchung von 122 EMB konnte die Gruppe vor allem für das erste Jahr nach HTx steigende fibrotische Anteile nachweisen. Dabei überschritt der mittlere Fibroseanteil von $9,3 \pm 1,85\%$ den Höchstwert der vorliegenden Arbeit ($8,5 \pm 3,9\%$) nur geringfügig. Über das zweite postoperative Jahr hinaus stabilisierte sich die prozentuale Fibrose ihrer Studiengruppe auf einem mit der Dissertation vergleichbarem Niveau (drei Jahre nach HTx: $7,6 \pm 2,21\%$; fünf Jahre nach HTx: $7,9 \pm 2,3\%$). Auffällig ist dabei, dass die Messwerte eine deutlich geringere Streuung aufwiesen (im Vergleich dazu Abbildung 6 in Abschnitt 6.2.1). Der ermittelte Fibroseverlauf wurde von der Arbeitsgruppe als reparativer Vorgang gewertet. Dieser kompensierte einen progredienten HMZ-Verlust, der vorrangig durch akute Abstoßungsreaktionen im ersten postoperativen Jahr entstand.

Armstrong et al.⁶⁸ beschränkten sich in ihrer Untersuchung von 50 HTx-Patienten im sechsjährigen Erhebungsintervall auf die Messung in einem Gesichtsfeld. In ihrer Studienkohorte wurde der Tiefststand der mittleren Fibroserate mit ca. 16% bereits im ersten postoperativen Monat erreicht. Im Verlauf war die Fibrose im neunten Monat sowie im ersten, zweiten, dritten und fünften Jahr nach HTx statistisch signifikant stärker ausgeprägt als im ersten Monat. Grundsätzlich lag der mittlere Fibrosegehalt dabei mit Werten von 16% bis 20% deutlich über den vorliegenden Ergebnissen von 7,0% bis 8,5%.

7.2.1.2 Kollagen Typ III und IV

Die histomorphometrische Analyse von Kollagen Typ III ergab initial innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx einen Rückgang der gemessenen Werte. Im anschließenden Beobachtungszeitraum stieg die Durchschnittsrate statistisch signifikant und kontinuierlich an.

In einer aktuellen Arbeit berichteten Pichler et al.⁸⁵, dass Umbauvorgänge in der EZM nach HTx vornehmlich durch myokardiale Fibroblasten vorangetrieben werden. Somit könnte die stetige Zunahme von Kollagen Typ III auf einer erhöhten postoperativen Aktivität der intramyokardialen Fibroblasten beruhen.

Zum abschließenden FU 4 zeigte sich Kollagen Typ III im Vergleich zur Gesamtfibrose mit einem statistisch signifikanten, nahezu doppelten Gehalt von $15,8 \pm 6,4\%$ (siehe Abschnitt 6.3.1). Tiermodelle zeigten, dass der physiologische Anteil von Kollagen Typ III an den myokardialen Kollagenfasern ungefähr 11 Prozent beträgt. Ähnliche Werte können auch für das humane Myokard angenommen werden.^{3, 40} Vor diesem Hintergrund ist es überraschend, dass Kollagen Typ III in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Gesamtfibrose so viel stärker nachweisbar ist. So scheint die immunhistochemische Aufbereitung von Kollagen Typ III eine differenziertere Analyse der interstitiellen Bindegewebsfasern im Myokard zu ermöglichen. Weiterführend ergibt sich die Frage, welche Strukturen mit der Sirius-Rot-Färbung tatsächlich erfasst werden. In Studien, die Sirius-Rot erstmals zur Messung des myokardialen Bindegewebes verwendeten, erschienen Kollagen, retikuläre Fasern, Basalmembranen, Ringfasern sowie das Sarkolemm der Myozyten tief rot.^{81, 86} Eine Differenzierung der Sirius-Rot gefärbten Strukturen kann also nur erfolgen, indem weitere Techniken zur Darstellung der interstitiellen Gewebekomponenten angewendet werden. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang der Einsatz der Polarisationsmikroskopie, anhand derer die kollagenen Fasern in ihrer Morphologie genau unterschieden und den entsprechenden Subtypen zugeordnet werden können.⁸⁴

Kollagen Typ IV kommt durch seine Struktur und einzigartige Lokalisation ein gewisses Alleinstellungsmerkmal zu. Daher wurde ein Vergleich mit den Ergebnissen der Fibrose- und Kollagen-III-Messungen nicht angestrebt. Die quantitative Entwicklung wurde stattdessen gesondert beurteilt. Zunächst zeigte sich eine Abnahme der Messwerte im kurzfristigen postoperativen Intervall. Im weiteren Untersuchungszeitraum nahm der mittlere Kollagen-IV-Gehalt jedoch statistisch signifikant und kontinuierlich auf einen Wert von $22,7 \pm 10,6\%$ im fünften postoperativen Jahr zu. Das dimer organisierte Kollagen IV ist Hauptkomponente einer spezialisierten EZM, die die Myozyten und kardialen Fibroblasten als Basalmembran umgibt.^{87, 88} Durch seine Zug- und Reißfestigkeit stellt es insbesondere die Stabilität der HMZ sicher. So kann die Basalmembran ihre Funktion auch dann noch wahrnehmen, wenn die Myozyten ihre Form im Kontraktionszyklus des Herzens verändern.⁸⁹ Aus der Bedeutung für die Aufrechterhaltung der myozytären Funktion ergibt sich ein möglicher Erklärungsansatz für die nachgewiesenen postoperativen Veränderungen im Kollagen-IV-Gehalt. So ist auch die Form der HMZ kontinuierlichen Anpassungserscheinungen nach HTx unterworfen (siehe Abschnitt 2.3). Die Umstrukturierung der Myozyten könnte eine gesteigerte Synthese an Kollagen Typ IV stimulieren, um sicherzustellen, dass die HMZ weiterhin adäquat am Kontraktionszyklus des Herzens teilnehmen können.

Die erzielten Ergebnisse für Kollagen III und IV stehen im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen. Schacherer und Kollegen⁶¹ bestimmten den Flächengehalt von Kollagen Typ I, III und IV in Quadratmikrometern pro Zelle anhand von 20 RV-EMB. Dazu wählten sie zwei verschiedene Zeitpunkte in der frühen postoperativen Phase (17 ± 4 Tage bzw. 63 ± 13 Tage post HTx). Dies entspricht etwa dem Zeitpunkt von FU 1 in der Dissertation. Analog zur vorliegenden Arbeit erfolgte die histologische Aufarbeitung mithilfe von monoklonalen Antikörpern und der ABC-Methodik. Der Kollagen-III-Gehalt blieb im beobachteten Zeitraum unverändert. Auch für Kollagen Typ IV ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung der Messwerte. Lediglich für Kollagen Typ I konnte ein statistisch signifikant steigender Anteil im Endo- und Perimysium nachgewiesen werden. So schlossen Schacherer et al., dass Umbauvorgänge der EZM nach HTx vor allem durch spezifische Veränderungen des Kollagen-I-Gehaltes gekennzeichnet sind.

Auch die Ergebnisse von Schupp et al.⁶⁶ widersprechen der postoperativen Zunahme von Kollagen Typ III und IV in der vorliegenden Dissertation. Im Vergleich zur frühen zweiwöchigen Phase zeigten die Kollagene in der Studie von Schupp et al. im ersten, zweiten und dritten Jahr nach HTx statistisch signifikant geringere Messwerte. Die Volumenzunahme aller bindegewebigen Anteile in den ersten zwei Wochen nach HTx wertete die Arbeitsgruppe als kompensatorische Antwort auf den kardialen Stress, der mit dem Transplantationsvorgang verbunden war. Im weiteren Verlauf des Beobachtungszeitraums galt der Messwerteabfall als Ausdruck rückläufiger Umbauvorgänge im Myokard.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die ermittelten Strukturanpassungen der myokardialen EZM ergibt sich aus der Interaktion mit Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Diese ubiquitär im Myokard angesiedelten Proteasen beeinflussen neben der Degradierung von EZM-Komponenten auch die Kollagensynthese. Im insuffizienten Herzen geht ein gesteigerter Anteil fibrotischer Läsionen nicht selten mit erhöhten MMP-Spiegeln einher. Umgekehrt lässt sich bei einem sinkenden Fibrosegehalt eine verminderte Aktivität der MMP beobachten.⁹⁰ Die Kollagenasen MMP-1 und MMP-8 binden sich spezifisch an Kollagen Typ I und III. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 zersetzen vorrangig Komponenten der Basalmembran und somit auch Kollagen Typ IV.^{91, 92} Ein Jahr nach HTx untersuchten Yamani et al.⁹³ untersuchten den Einfluss von MMP auf die EZM bei Patienten, die bereits im zweiwöchigen postoperativen Verlauf eine signifikante Myokardischämie ausgebildet. Dazu wurden histomorphometrische Analysen Sirius-Rot gefärbter Gewebeschnitte mit den Aktivitätsleveln verschiedener MMP korreliert. Die Studienpatienten wiesen nicht nur einen signifikant höheren Anteil an myokardialer Fibrose auf als ihre Vergleichsgruppe, die keiner ischämischen Episode ausgesetzt war. Auch die Aktivität von MMP-2, MMP-3 und MMP-9 war in

dieser Patientengruppe deutlich gesteigert. Eine frühe postoperative Ischämie führt demnach im weiteren Verlauf nach HTx zu einer Stimulation von MMP und somit zu einer verstärkten Umstrukturierung der EZM.

Schupp et al.⁶⁶ konnten in den ersten zwei postoperativen Wochen erhöhte Spiegel an MMP-8 und MMP-9 in Verbindung mit einem signifikanten Anstieg der interstitiellen Fibrose nachweisen. Im weiteren Verlauf bewirkten MMP laut Schupp et al.⁶⁶ umgekehrte Anpassungsvorgänge in der myokardialen EZM. Der Spiegel von MMP-9 stieg im ersten postoperativen Jahr an, wurde jedoch darüber hinaus von einem signifikant verminderten Gehalt an Kollagen IV begleitet. Bis zum zweiten Jahr nach Transplantation zeigte sich ein signifikant erhöhtes MMP-8. MMP-1 nahm sogar bis ins dritte Jahr nach HTx zu. Beides ging mit einer signifikanten Abnahme von Kollagen Typ I und III einher.

7.2.1.3 Geschlecht und Überlebensstatus

In Unterscheidung des Patientengeschlechtes bzw. des Überlebensstatus zum Zeitpunkt der Datenerhebung konnten im gesamten Erhebungszeitraum keine statistisch signifikanten Unterschiede herausgearbeitet werden.

Auch Boni⁶⁹ konnte keine statistisch signifikanten Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen der postoperativen Ausbildung von Fibrose und dem Patientengeschlecht ermitteln.

Armstrong et al.⁶⁷ verglichen RV-EMB herztransplantierte Patienten mit einer Überlebenszeit \leq fünf Jahren und $>$ fünf Jahren mithilfe der Masson-Trichrom-Färbung. Nur im ersten Jahr nach HTx unterschied sich das Ausmaß der myokardialen Fibrose zwischen beiden Gruppen statistisch signifikant. Bei Patienten mit einer maximalen Überlebenszeit von fünf Jahren nahm die myokardiale Fibrose auf ca. 15% ab und wurde von einer frühzeitigen Vergrößerung der Myozyten begleitet. Im Vergleichszeitraum nahm die myokardiale Fibrose bei Patienten mit einer Überlebenszeit über fünf Jahren auf ca. 19% zu. Im Verlauf näherte sich der Fibrosegehalt beider Gruppen an, sodass keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede vorlagen. Diese Ergebnisse decken sich mit den eigenen Auswertungen.

Dahingegen zeigten van Suylen et al.⁹⁴ bei Patienten mit einer Überlebenszeit zwischen 11 und 91 Monaten nach HTx einen deutlich ausgeprägteren Kollagengehalt als bei denjenigen Patienten, die bereits bis zum vierten Monat nach HTx verstorben waren.

7.2.2 Möglicher Einfluss des Alterns

Patienten mit gleichaltrigem Spender erreichten in der vorliegenden Untersuchung im langfristigen Verlauf nach HTx die höchsten Messwerte für alle drei Parameter. Am geringsten waren die

mittlere Fibrose und Kollagen Typ III bei den Patienten ausgeprägt, die zum Zeitpunkt ihrer Transplantation über 10 Jahre älter als ihre Spender waren. Patienten mit mehr als zehn Jahre älterem Spender lagen im postoperativen Vergleich von Fibrose und Kollagen Typ III zwischen den beiden anderen Untergruppen. Sie zeigten jedoch zum abschließenden FU 4 den niedrigsten Mittelwert an Kollagen Typ IV. Im Vergleich von jüngeren mit gleichaltrigen bzw. älteren Organspendern waren die ermittelten Unterschiede für Kollagen Typ III und IV statistisch signifikant.

Bisherige Studien zum Einfluss des Donoralters auf die Entwicklung der myokardialen EZM nach HTx konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge ermitteln. Weder Tazelaar et al.⁶² gelang es eine statistisch plausible Assoziation zwischen dem Spenderalter der untersuchten Transplantkohorte und dem Ausmaß von Kollagen Typ I, III und IV (monoklonale Antikörper) nachzuweisen. Noch Pickering und Boughner⁹⁵ (Sirius-Rot-Färbung) oder Koch et al.⁶⁰ (Masson-Trichrom-Färbung) konnten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Spenderalter und der frühzeitigen postoperativen myokardialen Fibrose herstellen.

In Abhängigkeit des Patientenalters zum Zeitpunkt der HTx ergaben sich für die drei EZM-Komponenten vollkommen unterschiedliche Messverläufe. Patienten, die bei HTx mindestens 60 Jahre alt waren, zeigten langfristig den höchsten Durchschnittsgehalt an Fibrose. Die Patientengruppe zwischen 40 und 59 Jahren entwickelte auf langfristige postoperative Sicht den geringsten Anteil an Fibrose. Dabei erwies sich der Vergleich mit der älteren Altersgruppe als statistisch signifikant. Im Hinblick auf Kollagen Typ III entwickelten unter 40jährige Patienten den höchsten, während Patienten über 60 Jahre den geringsten Kollagen-III-Gehalt aufwiesen. Die Messwerte der jüngeren Patientengruppe ließen sich gegenüber den beiden anderen Altersgruppen als statistisch signifikant beweisen. Kollagen Typ IV war in der mittelalten Patientengruppe am stärksten ausgeprägt. Dagegen zeigte sich der langfristige Kollagen-IV-Gehalt der jüngeren Generation nur unwesentlich erhöht gegenüber dem Messwert der über 60jährigen Patienten. Die Unterschiede der mittleren Patientengruppe waren im Vergleich mit den beiden anderen Altersgruppen statistisch signifikant.

Die Auswirkung des Patientenalters auf die postoperative Entwicklung von EZM-Komponenten wurde in bisherigen Studien noch nicht hinreichend thematisiert. Dennoch gilt es zu klären, ob die dargestellten Veränderungen Ausdruck spezifischer Anpassungsvorgänge nach HTx oder als normaler Alterungsprozess des interstitiellen Myokards zu werten sind. Bis zum Ende der 70er Jahre vertrat die Wissenschaft einhellig die Meinung, dass das Alter keinen Einfluss auf den Kollagengehalt im Ventrikel habe.^{96, 97} Nach heutigem Verständnis wird während der physiologischen Alterung jedoch eine zunehmende myokardiale Fibrosierung beobachtet. Gleichzeitig verändert sich

die kollagene Zusammensetzung. Dabei existieren widersprüchliche Ergebnisse zum anteiligen Verhältnis von Kollagen Typ I und III. So wird einerseits beobachtet, dass der relative Anteil an Kollagen Typ I durch zunehmende Druckbelastung steigt und der Gehalt an Kollagen Typ III zurückgeht. Dahingegen beobachten andere Studien eine Zunahme von Kollagen Typ III mit steigendem Lebensalter.^{98, 99} Gemäß der Baltimore Longitudinal Study of Aging¹⁰⁰ liegt die Ursache fibrotischer Prozesse im Alter in einer veränderten Funktion bzw. Anzahl von Fibroblasten. Gleichzeitig verlieren kollagene Fasern während ihrer Lebenszeit immer mehr Wasser und werden dadurch resistenter gegenüber einem Abbau durch MMP.³⁹ Diese verstärkte Ansammlung von Kollagenfasern wird oft von einem Verlust an Herzmuskelzellen begleitet.^{37, 101} Im Gegensatz zu den steigenden Verlaufswerten von Kollagen Typ III und IV in der vorliegenden Arbeit zeigten Untersuchungen am Tiermodell, dass eine gesteigerte Syntheseleistung von Kollagen keinen Einfluss auf die Entstehung myokardialer Fibrose im Alter nimmt.¹⁰² Stattdessen bestätigten mehrere Studien, dass der Fibrose im normotensiven älteren Herzen scheinbar eine verminderte Aktivität von MMP, wie zum Beispiel MMP-1 und MMP-2, zugrunde liegt. Dadurch ist die Abbaurate des interstitiellen Kollagens reduziert. Dabei ist jedoch einschränkend zu erwähnen, dass diese Studien ausschließlich Tiermodelle und unterschiedliche histologische Aufarbeitungstechniken verwendeten. Zudem wurden größtenteils Gewebeproben aus dem linken Ventrikel analysiert.¹⁰³⁻¹⁰⁶ Das individuelle altersabhängige Ausmaß myokardialer Fibrose im rechten und linken Ventrikel wurde bisher lediglich in zwei Studien mit Rattenmyokard aufgegriffen. Weder Eghbali et al.¹⁰⁷ noch Annoni und Kollegen¹⁰⁸ konnten signifikante Unterschiede zwischen beiden Ventrikeln feststellen.

Bisher ist nur unzureichend untersucht, ob die anhand von Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse auch auf die Genese der extrazellulären Fibrose im alternden humanen Myokard anwendbar sind. Lakhan und Harle¹⁰⁶ konnten in einem Fallreport zeigen, dass histologische Veränderungen im normotensiven Myokard des älteren Patienten durch eine verstärkte Rate an Nekrose und Apoptose der HMZ gekennzeichnet ist. Zudem beobachteten sie eine veränderte Verteilung von Kollagen Typ I und III.

Burkauskiene et al.¹⁰⁹ untersuchten Biopsien aus dem Appendix des rechten Vorhofes von 17 herzgesunden Patienten, die aufgrund nicht-kardialer Ursachen verstorben waren. Die lineare Regression zeigte für die histomorphometrisch untersuchten Sirius-Rot-Schnitte einen stark ausgeprägten, statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem zunehmenden Alter und dem steigenden prozentualen Kollagengehalt ($r = 0,95$; $p < 0,001$). Eine Differenzierung in kollagene Subtypen erfolgte nicht.

Gramley et al.¹¹⁰ nutzten zur Bewertung der kardialen Fibrose im Alter ebenfalls Sirius-Rot aufbereitete Biopsieproben aus dem Appendix des RV. Aus ihren Analysen leitete sich eine etwas geringer ausgeprägte, positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Fibrose und dem Alter ($r = 0,45$; $p < 0,01$) ab. Analog zur vorliegenden Arbeit zeigte sich der mittlere Fibrosegehalt in der ältesten Patientengruppe am höchsten (über 70jährige Patienten: ca. 17%; $p < 0,01$). Den Ergebnissen der eigenen Analyse entgegenstehend nahm der Anteil an Fibrose jedoch grundsätzlich mit sinkendem Patientenalter ab (61-70 Jährige: ca. 15%; $p < 0,05$ vs. unter 50jährige Patienten: 10%). Weiterführend setzte die Arbeitsgruppe zymografische Methoden zur Bestimmung der Spiegel von MMP und TIMP ein. Im Gegensatz zu vormals beschriebenen Tiermodellen wies sie steigende Spiegel von MMP-2 und MMP-9 begleitet von einer verminderten Aktivität von TIMP-1 nach. Bei der untersuchten Kohorte handelte es sich jedoch nicht um herzgesunde Patienten. Die analysierten Gewebeproben wurden bei kardiochirurgischen Routineeingriffen, wie koronaren Bypass-Operationen bzw. dem Ersatz von Mitral- oder Aortenklappe, entnommen. Daher lassen die Ergebnisse keine zweifelsfreien Rückschlüsse auf die physiologische Alterung zu.

Debessa et al.¹¹¹ verglichen den Anteil an interstitiellem Kollagen zwischen jüngeren (20 – 25 Jahre) und älteren Patienten (67 – 87 Jahre) anhand von polarisationsmikroskopischen Untersuchungen Sirius-Rot gefärbter Präparate aus dem linken Ventrikel. Im Gewebe der älteren Patienten fand sich signifikant mehr Kollagen als bei jüngeren Patienten ($5,86 \pm 0,81\%$ vs. $3,92 \pm 0,80\%$; $p < 0,05$).

Aus den dargestellten Studien lässt sich kein Konsens zu Ausmaß und Auswirkung der altersassoziierten myokardialen Fibrose ableiten.^{103, 112} Darüber hinaus sind alterungsbedingte Veränderungen der EZM schwer von Anpassungsvorgängen trennbar, die aufgrund von Komorbiditäten (wie arteriellem Bluthochdruck) entstehen.^{106, 112} Somit kann keine endgültige Aussage getroffen werden, ob die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spezifische Veränderungsvorgänge in der EZM des transplantierten Herzen oder ob ein physiologisches Alterungsphänomen sind.

7.2.3 Mögliche Einflussfaktoren auf die Dynamik von Gesamtfibrose, Kollagen Typ III und IV

7.2.3.1 Spenderinduzierte Ausgangsbedingungen bei HTx

Die spenderassoziierte Beschaffenheit der interstitiellen Myokardstruktur wurde anhand von 18 EMB (sogenannte Null Biopsien) beurteilt. Ihre Entnahme erfolgte direkt während des Transplantationsvorganges. Dabei zeigte sich mit einer Standardabweichung von 5,4% bereits vor HTx eine unterschiedlich hohe Durchschnittsrate an Fibrose. Auch der mittlere Gehalt von Kollagen Typ III

und IV variierte deutlich mit Standardabweichungen von 7,1% bzw. 10,4% (siehe Abschnitt 6.2). Diese Unterschiede in den histologischen Ausgangsbedingungen des interstitiellen Myokards bestätigten sich durch den Vergleich der Variationskoeffizienten (Fibrose: 63% vs. Kollagen Typ III: 55% vs. Kollagen Typ IV: 78%; siehe Abschnitt 6.3.2).

Die uneinheitliche Morphologie der interstitiellen EZM in Spenderherzen bestätigte sich in den Studien von Frasik et al.¹¹³ und Arbustini et al.¹¹⁴ Zum Transplantationszeitpunkt stellten sie deutliche Unterschiede in der Myozytenform, der Ausprägung interstitieller und perivaskulärer Ödeme sowie dem Anteil interstitieller bzw. fokaler Ersatzfibrose fest. Im Vergleich zum Mittelwert der vorliegenden Studie (8,6%) betrug der Anteil an Fibrose bei Frasik et al. jedoch lediglich 6%. In der Studiengruppe von Arbustini et al. ließ sich eine interstitielle Fibrose nur bei 15% der 97 EMB nachweisen, während in der hier betrachteten Studienpopulation alle Null Biopsien fibrotische Läsionen aufwiesen.

Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der Inhomogenität der Spendergruppe selbst. Variierende Lebensstilfaktoren, wie Nikotin- und Alkoholabusus oder die sportliche Aktivität, könnten zu den heterogenen histologischen Ausgangsbedingungen bei HTx beigetragen haben. Außerdem unterlag das Spenderalter mit einem Minimum von 19,1 und einem Maximum von 55,7 Jahren einer deutlichen Spannbreite. Demnach war das interstitielle Myokard der Organspender unterschiedlich lang verschiedensten Umwelteinflüssen und gesundheitlichen Bedingungen ausgesetzt. Entsprechende Auswirkungen auf Umstrukturierungen der myokardialen EZM sind jedoch nur schwer messbar. Gegebenenfalls würden sich die ungewöhnlich starken Unterschiede durch eine höhere Anzahl zur Verfügung stehender Gewebeproben relativieren.

Weiterhin bestehen Hinweise darauf, dass der Hirntod des Organspenders zu Veränderungen in der Architektur des Myokardgewebes führt. Der Übergang in den Hirntod zieht eine massive Anregung des sympathischen Nervensystems nach sich und resultiert in einem extremen Ausstoß an endogenen Katecholaminen. Dieser „Katecholamin-Sturm“ könnte schädigend auf das Myokard des Spenderorgans einwirken. Durch die exogene Zufuhr von Inotropika während der Intensivbehandlung des Organspenders wird dieser Effekt möglicherweise potenziert. Die genannten Faktoren sowie die Entwicklung des Hirntodes selbst führen zu veränderten hämodynamischen Verhältnissen, die sich negativ auf die intakte Struktur des Myokards auswirken können. Dabei sind vor allem Schäden der HMZ, Kapillaren sowie die Ausbildung von intra- und extrazellulären Ödemen beschrieben.¹¹⁵ Auswirkungen des Hirntodes auf die interstitielle EZM-Architektur im Spendermyokard sind bisher nicht untersucht, jedoch definitiv denkbar.

In Abhängigkeit vom fibrotischen Ausgangsgehalt bei HTx ergab sich für den postoperativen Verlauf der Gesamtfibrose kein statistisch plausibler Zusammenhang. Daher ist anzunehmen, dass Fibrose-Läsionen bei HTx bereits diffus im Myokard verteilt sind und die postoperativen Veränderungen der interstitiellen Myokardarchitektur hauptsächlich auf anderen EZM-Komponenten basieren.

7.2.3.2 Ischämiedauer

Pickering und Boughner⁹⁵ stellten 1990 erstmalig die Hypothese auf, dass die Dauer der Organischämie bei HTx das Ausmaß postoperativer Architekturveränderungen im Myokard beeinflussen könnte. Anhand polarisationsmikroskopischer Untersuchungen Sirius-Rot gefärbter Gewebeschnitte gelang es ihnen, einen Zusammenhang zwischen der Organischämie bei HTx und der postoperativen myokardialen Fibrose herzustellen ($r = 0,06$; $p < 0,001$). Auch eine Korrelationsanalyse der vorliegenden Arbeit bestätigte den generellen Zusammenhang zwischen der Ischämiezeit und dem Anteil fibrotischer Läsionen für den mittel- (FU3: $r = 0,305$; $p = 0,025$) und langfristigen Verlauf nach HTx (FU4: $r = 0,357$; $p = 0,028$).

Gleichzeitig scheint die Myokardischämie bei Transplantation ein geeigneter Erklärungsansatz für den beobachteten Rückgang der Messwerte aller drei EZM-Komponenten in der frühen postoperativen Phase der ersten 30 Tage nach HTx (siehe Abschnitt 6.2). Durch ischämische Bedingungen werden Inflammationsvorgänge stimuliert, die zu einer gesteigerten Aktivität von MMP führen. Dies zieht eine erhöhte Abbaurate an Kollagen nach sich.³⁹ Im Vergleich zur Null Bx war der mittlere Anteil an Fibrose, Kollagen Typ III und IV zum FU 1 daher reduziert.

Patienten mit einer Ischämie von < 211 Minuten wiesen langfristig einen geringeren Durchschnittsgehalt an Fibrose und Kollagen Typ III bzw. IV auf als Patienten, deren Spenderorgane einer überdurchschnittlich langen Ischämiezeit von > 240 Minuten ausgesetzt waren.

Pickering und Boughner⁹⁵ unterteilten ihre Studienpopulation in drei Gruppen mit Ischämiezeiten von < 120 , 121 bis 240 und > 240 Minuten. Sie stellten heraus, dass die Biopsien mit der längsten Organischämie zwischen dem fünften und zehnten postoperativen Tag einen statistisch signifikant höheren Anteil an myokardialem Kollagen enthielten als die beiden anderen Patientengruppen.

Auch Sack et al.¹¹⁶ wiesen innerhalb der ersten zwei postoperativen Wochen einen signifikanten Anstieg interstitieller Fasern in Herzen mit Ischämiezeiten > 190 Minuten nach. Dahingegen konnten sie in Transplantaten mit Organschämien < 120 Minuten keine Veränderungen im Bindegewebsgehalt darstellen.

Die obigen Studien legen die Hypothese nahe, dass kürzere Ischämiezeiten mit geringeren quantitativen Veränderungen im myokardialen Kollagengehalt verbunden sein könnten. Anhand einer Korrelation nach Spearman ließ sich dies in der vorliegenden Arbeit zumindest für Kollagen Typ III im kurzfristigen dreißigtägigen Zeitraum nach HTx statistisch signifikant bestätigen ($r = 0,265$; $p = 0,032$).

Ein potenzieller Einfluss der Ischämiedauer auf die Entwicklung myokardialer Fibrose bzw. die Veränderung des Kollagengehaltes in der Frühphase nach HTx ist demnach nicht von der Hand zu weisen. Dem entgegenstehend scheint der Effekt der Organischämie auf die langfristige postoperative Myokardstruktur des Transplantates eher gering. Stattdessen scheinen andere Faktoren eine Zunahme des interstitiellen Bindegewebes zu begünstigen.⁷⁹ So konnten Tazelaar et al.⁶² keine signifikanten Unterschiede für die Ausprägung von Kollagen III und IV in Abhängigkeit von der Ischämiezeit herausstellen. Die Untersuchung erfolgte dabei anhand von 34 Biopsien, die in einem sehr ausgedehnten postoperativen Zeitraum von 1 bis 82 Monaten von unterschiedlichen Patienten entnommen wurden. Auch Fornes et al.¹³ konnten in einer durchschnittlichen Nachbeobachtungsdauer von 36 Monaten keinen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Kollagengehalt und der Dauer der Ischämiezeit, die in ihrem Studienkollektiv zwischen 73 und 240 Minuten variierte, etablieren. Ebenso wenig gelang es Rowan und Billingham¹¹⁷ anhand einer linearen Regressionsanalyse einen statistisch signifikanten Einfluss von Ischämien auf das Ausmaß der Fibrose im postoperativen Verlauf bis zum dritten Jahr nach HTx herzustellen.

7.2.3.3 Zelluläre und humorale Abstoßungsreaktionen

Zelluläre und humorale Abstoßungen (ACR und AMR) sind gefürchtete Komplikationen nach Transplantation.^{5, 33} Bei klinischer Relevanz werden sie zunächst mit einem absteigenden Cortikosteroid-Schema behandelt.⁶ Dabei liegen Hinweise vor, dass Glukokortikoide die Transkription von Prokollagenen vermindern und somit die Kollagensynthese einschränken.^{39, 118} Vor diesem Hintergrund wurden Abstoßungsprozesse als mögliche Einflussgrößen auf die histomorphometrischen Ergebnisse evaluiert. Dazu wurde zunächst der mittlere Gehalt an Fibrose, Kollagen Typ III und IV über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg bei Patienten mit und ohne ACR betrachtet. Die Medianwerte der drei vermessenen Komponenten gaben dabei Auskunft über die zentrale Tendenz in der Studienpopulation. Es zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen ACR-positiven und ACR-freien Patienten.

Auch in der detaillierten Verlaufsuntersuchung zeigten sich für keine der dargestellten EZM-Komponenten statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit bzw. ohne ACR. Weiterführende Analysen mit dem Koeffizienten nach Spearman ermittelten keine statistisch plausible

Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der ACR und dem Messwerteverlauf aller drei Strukturen. Somit ergab sich anhand von zellulären Abstoßungsreaktionen keine statistisch nachvollziehbare Erklärung für die postoperativen Schwankungen des Fibrose-Gehaltes bzw. von Kollagen III und IV.

Auch Boni⁶⁹ und Hiemann et al.¹¹⁹ konnten in zwei weiteren Transplantkohorten des DHZB keine signifikante Korrelation zwischen zellulären Abstoßungen und quantitativen Fibrosemessungen herstellen. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen Fornes et al.¹³ in ihrer dreijährigen Beobachtung von 21 herztransplantierten Patienten, deren 200 RV-EMB computerbasiert ausgewertet wurden. Kollagene Fasern stellten sie mit Sirius-Rot dar und vermaßen sie unter Ausschluss narbiger Areale in 20 Gesichtsfeldern. Somit ist ihre Methodik mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Ihre Ergebnisse ergaben keine statistisch signifikante Assoziation der myokardialen Fibrose mit akut bzw. chronisch verlaufenden Abstoßungen. Ebenso wenig gelang es Tazelaar et al.⁶² einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen zellulären Abstoßungsepisoden und mittels Immunfluoreszenz nachgewiesenem Kollagen I, III, IV und V über einen siebenjährigen Untersuchungszeitraum post HTx nachzuweisen. Dem entgegenstehend belegten Rowan und Billingham¹¹⁷ in einer dreijährig angelegten Studie eine statistisch signifikante, wenngleich nur geringfügig ausgeprägte positive Korrelation zwischen dem prozentualen Kollagenvolumen und zellulären Abstoßungsepisoden unabhängig von ihrem Schweregrad ($r = 0,24$; $p < 0,01$). Die Aufarbeitung der RV-EMB erfolgte dabei mithilfe des trichromen Färbeverfahrens. Anschließend kam die Punktezählmethodik zur Vermessung des blau dargestellten Kollagens zum Einsatz. Aufgrund der unterschiedlichen Methodik ist die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit daher eingeschränkt.

Andere Studien griffen zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Abstoßungsreaktionen und myokardialer Fibrose auf weiterführende Methoden zurück. Beispielsweise eignen sich Procollagen I und III (PINP, PIIINP) als Marker des Kollagenumsatzes. Arbeiten von Lin et al.¹¹⁸ sowie Host et al.¹²⁰ zeigten, dass bei akuten Rejektionen innerhalb des ersten Jahres nach HTx insbesondere der Serum-Spiegel von PIIINP erhöht ist. Nach Anpassung der immunsuppressiven Therapie und überstandener Abstoßungsreaktion sank der Spiegel wieder auf das Ausgangsniveau. Herztransplantierte Patienten, die unter Abstoßungsvorgängen litten, wiesen demnach eine erhöhte Kollagen-III-Synthese auf. Dahingegen sank der gemessene Serumspiegel bei rejektionsfreien Patienten in den ersten sechs Monaten nach HTx kontinuierlich ab. Diesen Rückgang an kollagenen Umbauvorgängen werteten die Autoren als Ausdruck eines fortschreitenden Wundheilungsprozesses nach Transplantation. Eine aktuelle Arbeit von Vanhoutte et al.⁶³ lieferte interessante Erkenntnisse zur Wechselwirkung von zellulären Abstoßungen, myokardialem Kollagen und MMP

sowie TIMP im ersten Jahr nach HTx. Sie stellten fest, dass aktive MMP-9 und TIMP-1 in Geweben mit hochgradiger zellulärer Abstoßung deutlich vermehrt vorliegen. Gleichzeitig zeigten die Kollagenmetabolite PINP und PIIINP erhöhte Spiegel. Bei höhergradiger ACR unterlag Kollagen somit einer vermehrten Synthese- und Abbaurrate, sodass keine signifikante Veränderung des Sirius-Rot gefärbten Gesamtkollagengehaltes dargestellt werden konnte.

In Abhängigkeit von einer AMR zeigten sich die Mittelwertverläufe aller drei Parameter im gesamten Untersuchungszeitraum statistisch signifikant. Der Durchschnittsgehalt an Fibrose sowie Kollagen Typ III und IV war bei Patienten mit AMR im fünften Jahr nach HTx deutlich stärker ausgeprägt als bei Patienten ohne AMR. Die Messwertunterschiede zwischen den Patienten erreichten jedoch zu keinem Erhebungszeitpunkt eine statistische Signifikanz. Dies stellte sich auch als unabhängig davon dar, ob die AMR im frühzeitigen oder langfristigen postoperativen Verlauf diagnostiziert wurde. Ferner konnte die Korrelationsanalyse nach Spearman keinen statistisch signifikanten Einfluss einer AMR auf die beobachtete Wertentwicklung herausstellen.

Auch Nath et al.¹²¹ konnten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen antikörpervermittelten Abstoßungsprozessen und dem Nachweis von Auto-Antikörpern gegen Kollagen Typ I, II und IV erbringen.

Darüber hinaus liegen keine Vergleichsarbeiten vor, die das Einflusspotenzial humoraler Abstoßungen auf Anpassungsvorgänge in der EMZ nach HTx analysieren. Nach umfangreichen Diskussionen besteht Konsens, dass die AMR ein entscheidender Risikofaktor für das Transplantatversagen ist. Vor allem das wiederholte Auftreten humoraler Abstoßungsvorgänge ist mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunden.¹²²⁻¹²⁴ Vor diesem Hintergrund erscheint es umso überraschender, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen dem strukturellem Remodelling im interstitiellen Myokard und antikörpervermittelten Abstoßungsprozessen bisher noch nicht intensiv überprüft wurde.

7.2.3.4 Kardiomyozytenhypertrophie

Ein möglicher Zusammenhang von HMZ-Vergrößerungen und der Entwicklung fibrotischer Läsionen nach HTx wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. So schlussfolgerten Schnabel et al.^{64, 65}, dass die signifikante Vermehrung interstitieller Fibrose im ersten Jahr nach HTx mit einem Verlust an Herzmuskelzellen einhergeht. Die verbleibenden Myozyten hypertrophieren in Reaktion auf ihren verminderten Anteil deutlich, um die kontraktile Kraft des Myokards sicherzustellen.

len. Dahingegen ergab sich in der vorliegenden Arbeit keine statistisch plausible Korrelation zwischen einer HMZ-Hypertrophie und den postoperativen Schwankungen im Fibrose- bzw. Kollagen-III-Gehalt.

Auch Prochno und Meyer⁷⁰ erzielten keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Myozytendurchmesser und der myokardialen Fibrose nach HTx. In ihren Untersuchungen verwendeten sie mit der Domagk-Färbung einen Vorläufer des Sirius-Rot-Verfahrens, um die rechtsventrikulären Gewebeproben von 13 HTx-Patienten aufzubereiten.

Die morphometrische Analyse von Steinmann⁷⁹ zeigte zwar eine kontinuierliche Zunahme des HMZ-Durchmessers über vier Jahre nach HTx. Der mittlere Anteil interstitieller Fibrose veränderte sich jedoch nur im ersten postoperativen Jahr statistisch signifikant. Daraus schloss Steinmann, dass es sich bei der Entwicklung myokardialer Fibrose und Veränderungen der Myozytenform um zwei unabhängige Prozesse handelt.

Laut Armstrong et al.⁶⁸ nimmt die Vergrößerung der HMZ auch bis zum sechsten Jahr nach HTx zu. Sie ermittelten für ihre Transplantkohorte von 40 Patienten eine kontinuierliche Zunahme der Myozytengröße um ca. 10 bis 20% ab dem sechsten postoperativen Monat. Demgegenüber zeigte sich die myokardiale Fibrose (Masson-Trichrom-Färbung) nach einem frühzeitigen Anstieg im zweiten Monat über den weiteren Erhebungszeitraum hinweg auf einem konstanten Messniveau. Die bisherigen Studien konnten demnach mehrheitlich keinen Beweis für einen Zusammenhang zwischen myozytären Größenveränderungen und der myokardialen Fibrose herztransplantierte Patienten erbringen.

7.2.3.5 Veränderungen der Endothelzellen

In der untersuchten Transplantkohorte wurde überprüft, welches Einflusspotenzial möglicherweise von im kurzfristigen postoperativen Intervall (30 Tage nach HTx) prominenten Endothelzellen auf die längerfristige Wertentwicklung von Kollagen Typ IV ausgeht. Bei Patienten mit prominentem Gefäßendothel war die ermittelte Durchschnittsrate an Kollagen Typ IV im dritten postoperativen Jahr signifikant gegenüber der Gruppe mit unauffälligem Endothel erhöht ($23,4 \pm 10,6\%$ vs. $15,8 \pm 11,8\%$; $p = 0,015$). Im fünften Jahr nach HTx näherten sich die Mittelwerte beider Gruppen an, sodass sich kein statistisch signifikanter Unterschied ergab.

Das Klassifikationsschema zur Bewertung der Endothelmorphologie wurde im DHZB entwickelt.⁹ Bisher liegt nur eine Studie von Hiemann¹² vor, in der Gewebeproben von Patienten mit prominenten Endothelzellen im Zeitfenster von vier Wochen und einem Jahr nach HTx signifikant häufiger einen erhöhten Bindegewebsanteil aufwiesen als Patienten mit unauffälligem Gefäßendothel. In dieser Studie wurde jedoch kein expliziter Fokus auf Kollagen Typ IV gelegt.

7.2.3.6 Veränderungen der terminalen Gefäße

Bei Patienten, für die im Beobachtungszeitraum mindestens einmalig mikrovaskulopathische Veränderungen der distalen Gefäßbahn dokumentiert wurden, war Kollagen Typ IV im fünften Jahr nach HTx im Mittel statistisch signifikant höher nachweisbar als bei Patienten ohne MVP ($23,8 \pm 10,2\%$ vs. $9,9 \pm 6,7\%$; $p = 0,037$). Der potenzielle Einfluss mikrovaskulopathischer Läsionen auf den langfristigen Gehalt von Kollagen IV konnte durch die Korrelation nach Spearman bestätigt werden ($r = 0,343$; $p = 0,035$).

Hiemann¹² untersuchte die Bedeutung mikrovaskulopathischer Befunde für das myokardiale Bindegewebe (Sirius-Rot-Färbung) im Verlauf von vier Wochen und einem Jahr nach HTx. MVP-positive Patienten ihrer Kohorte entwickelten in beiden Erhebungsintervallen zwar ein ausgeprägteres myokardiales Bindegewebe als MVP-negative Patienten. Dieses Ergebnis bestätigte sich jedoch nicht als statistisch signifikant. Zudem erfolgte keine Differenzierung in kollagene Subtypen. Vor dem Hintergrund der MVP als negativer Prädiktor für das Langzeitüberleben nach HTx sollten unbedingt weiterführende Analysen zum Einflusspotenzial auf postoperative Anpassungen im myokardialen Interstitium angestrebt werden.³³ So wiesen Hiemann et al.^{12, 119} in einer groß angelegten Untersuchung von über 9.000 RV-EMB nach, dass die Ausbildung mikrovaskulopathischer Veränderungen der Gefäßmedia im ersten postoperativen Jahr mit einem signifikant reduzierten Überleben und einer erhöhten Inzidenz kardialer Todesereignisse bzw. Re-Transplantationen verbunden ist.

7.2.3.7 Regressionsmodell

In einem Regressionsmodell wurde die Bedeutung der besprochenen Faktoren für die postoperative Entwicklung der drei untersuchten EZM-Komponenten vertiefend ausgewertet. Die Analyse bezog die Variablen Geschlecht des Patienten, Überlebensstatus bei Datenerhebung, Ischämie bei $HTx \leq$ bzw. > 211 Minuten, die Altersdifferenz zwischen Patient und Spender, das Alter des Patienten bei HTx, sowie das Auftreten zellulärer bzw. humoraler Abstoßungen und mikrovaskulopathischer Veränderungen ein. Variationen der oben genannten Parameter erklärten 20,3% der Schwankungen der mittleren Kollagen-III-Gesamtrate ($p = 0,004$) und 24,9% der Unterschiede im durchschnittlichen Gesamtgehalt an Kollagen Typ IV ($p = 0,001$). Anschließend wurde das Einflusspotenzial jeder individuellen Variable gesondert untersucht. Hierbei waren mikrovaskulopathische Läsionen im terminalen Gefäßbett mit allen drei Parametern statistisch signifikant positiv assoziiert (Fibrose: $r = 0,277$; $p = 0,026$; Kollagen Typ III: $r = 0,341$; $p = 0,004$; Kollagen Typ IV: $r = 0,391$; $p = 0,001$). Die Höhe der Regressionskoeffizienten deutet auf einen eher schwach ausgeprägten Zusammenhang hin. Dennoch unterstreicht das Ergebnis, dass die MVP einen Einfluss

auf Umbauvorgänge im interstitiellen Myokard nach HTx nehmen kann. Umso notwendiger erscheint es, die Relevanz der MVP in weiterführenden Studien zu analysieren.

7.2.3.8 Immunsuppression

Die immunsuppressive Therapie nimmt eine Schlüsselrolle in der Posttransplantationsnachsorge ein. Einerseits sind adäquate Serumspiegel der eingesetzten Immunsuppressiva essentiell, um die Transplantatfunktion zu erhalten und Rejektionen zu verhindern. Andererseits kann die Langzeiteinnahme mit erheblichen Komplikationen, wie dem gehäuften Auftreten dermalen Tumore oder einer progressiven Nierenschädigung, verbunden sein. Daher ist eine kontinuierliche Überwachung und Anpassung der individuellen Einnahmedosis im klinischen Management herztransplantierten Patienten von entscheidender Bedeutung.^{5, 24}

Insbesondere nach der Einführung von Cyclosporin A (CyA) wurde der Einfluss immunsuppressiver Therapien auf interstitielle Umbauvorgänge im Myokard in einer Reihe von Studien untersucht. Entsprechende Analysen sind in der vorliegenden Arbeit nicht enthalten. Aufgrund des Stellenwertes immunsuppressiver Therapeutika für das Langzeitüberleben nach HTx sollen sie an dieser Stelle dennoch als Einflussfaktor auf postoperative Veränderungen der interstitiellen Myokardstruktur diskutiert werden.

Ein 1985 veröffentlichter Fallbericht aus Stanford¹²⁵ zeigte erstmals, dass herztransplantierte Patienten unter CyA deutliche fibrotische Läsionen aufweisen. Im Transplantat eines Patienten mit heterotoper HTx und Cyclosporin A-Therapie entwickelten sich 3,5 Jahre nach HTx ausgedehnte fibrotische Areale, die hauptsächlich um die HMZ herum angesiedelt waren. Im nativen Herzen ließen sich diese Veränderungen dahingegen nicht beobachten. Auch Stovin und English¹²⁶ wiesen Ende der 80er Jahre durch Untersuchungen an 106 EMB nach, dass die Einnahme von CyA im Kurzzeitverlauf nach HTx mit einem höheren Auftreten interstitieller Fibrose assoziiert ist als die zu dieser Zeit konventionelle Therapie mit Azathioprin und Steroiden.

Diesen Beobachtungen entgegenstehend gelang es Koch et al.⁶⁰ nicht, einen statistisch plausiblen Zusammenhang zwischen der CyA-Dosis und dem Ausmaß interstitieller Fibrose im kurzfristigen postoperativen Verlauf der ersten 14 Tage zu ermitteln. Steinmann⁷⁹ konnte zwar eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Einnahmemenge an CyA und der Ausprägung endomysialer Fibrose im ersten Jahr nach HTx herstellen ($r = 0,619$, $p \leq 0,014$, $n = 15$). Bis zum vierten Jahr nach HTx konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht statistisch signifikant bestätigt werden. So scheint der langfristige Effekt von CyA über das erste postoperative Jahr nach HTx hinaus nachzulassen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Armstrong et al.⁶⁸ Auch sie konnten keine klare Verbindung zwischen Dosis und Spiegel an CyA und der Entwicklung myokardialer Fibrose

innerhalb von sechs Jahren nach HTx herstellen. Ebenso wenig vermochten es die Untersuchungen von Greenberg et al.¹²⁷, Imakita et al.¹²⁸, Rowan und Billingham¹¹⁷ und Gramley et al.⁷² einen Unterschied in der Ausbildung interstitieller Fibrose abhängig vom angewendeten immunsuppressiven Therapieregimen festzustellen.

In den letzten Jahren wird in der immunsuppressiven Therapie nach HTx immer häufiger auf mTor-Inhibitoren zurückgegriffen. Mehrere klinisch randomisierte und verblindete Studien belegen ihren anti-proliferativen Effekt auf glatte Muskelzellen und die Gefäßintima des Transplantats.¹²⁹⁻¹³¹ Hiemann et al.¹¹⁹ konnten in einer prospektiven Untersuchung von 132 HTx-Patienten aus dem DHZB zeigen, dass die Einnahme von Everolimus im dreijährigen postoperativen Verlauf signifikant mit einem geringeren Auftreten endomyokardialer Fibrose verbunden war als bei Patienten, die mit Mycophenolat Mofetil behandelt wurden. Weitere Studien zur Bestätigung des antifibrotischen Effekts von mTor-Inhibitoren nach HTx fehlen bislang.

7.2.4 Klinische Relevanz der quantitativen Veränderungen nach HTx

7.2.4.1 Bisherige Hypothesen

Es existieren bisher lediglich Hypothesen zum Einflusspotenzial fibrotischer Veränderungen auf die klinische Funktionsfähigkeit des Transplantats. Durch die Akkumulation von Fibrose scheint sich die Dehnbarkeit des Myokards zu vermindern. Dies zieht letztlich nicht nur eine reduzierte Pumpfunktion des Herzens, sondern auch eine diastolisch eingeschränkte Herzfunktion nach sich.^{68, 72, 79, 95, 132} Die Hauptlast liegt dabei vor allem auf dem rechten Ventrikel. Er scheint durch seine asymmetrische Form und seinen verstärkten Kollagengehalt deutlich sensibler auf interstitielle Veränderungen zu reagieren als der linke Ventrikel.^{39, 133} So ist das Rechtsherzversagen nicht nur eine typische Komplikation, sondern auch eine der führenden Ursachen der 30-Tages-Mortalität nach HTx.^{24, 134} Zusätzlich scheint der Kollagengehalt im rechten Ventrikel des transplantierten Herzen ein repräsentatives Bild über das Interstitium des gesamten Myokards zu vermitteln und somit ein erhebliches Potenzial zur Analyse kardialer Dysfunktionen zu bieten.⁹⁴ Eine kausale Korrelation der allgemeinen Myokardfibrose mit postoperativen Komplikationen oder klinischen Parametern zur Einschätzung der kardialen Funktion gelang jedoch bisher nicht zweifelsfrei.^{66, 95} Nach Yamani et al.¹³⁵ weisen Patienten, die bereits zwei Wochen nach HTx eine interstitielle Fibrose ausbilden, eine statistisch signifikant schlechtere Prognose in Bezug auf ihr Langzeitüberleben bzw. ihre Transplantatfunktion auf. Die Fibrose wurde dabei anhand der histologischen Standard-Färbung mittels HE ohne differenzierte Betrachtung des interstitiellen Myokardgewebes dargestellt. Die Schlussfolgerung der Forschungsgruppe sollte daher anhand spezifischerer Aufbereitungsverfahren überprüft werden.

In den Studien von Schnabel et al.^{64, 65} gingen die signifikante Vergrößerung der HMZ und die erhebliche Zunahme der interstitiellen Fibrose im ersten Jahr nach HTx lediglich mit einer leichtgradig eingeschränkten Funktion des rechten Ventrikels einher. Dennoch gehen die Autoren davon aus, dass die nachgewiesenen Veränderungen einen Einfluss auf die Pumpfunktion des Herzens nehmen und postoperative Arrhythmien fördern können. So zeigt sich die Fibrose im Perimysium deutlich verstärkt. Dadurch werden Verbindungen zwischen den Myozyten aufgebrochen und die elektrische Leitfähigkeit zwischen den kontraktilen Einheiten vermindert. Die damit einhergehende Starre des Myokards setzt die mechanische Funktion des Herzens herab. Die Zunahme endomyotischer Fibrosefasern könnte sich über eine Verlängerung der Diffusionsstrecke und eine reduzierte Kapillarisation vorrangig negativ auf die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der HMZ auswirken. Der Erhalt des Zellstoffwechsels wäre dadurch essentiell beeinträchtigt und die betroffenen Zellen vom Untergang bedroht. Weitere Studien, die die Hypothesen von Schnabel et al. vor allem für den Langzeitverlauf nach HTx untersuchen, existieren bisher nicht.

7.2.4.2 Echokardiografische Parameter zur Überprüfung der klinischen Relevanz

Zur Überprüfung der Bedeutsamkeit von Umbauvorgängen extrazellulärer Matrixkomponenten für die Myokardfunktion könnten echokardiografische Funktionsparameter mit der quantitativen und qualitativen Morphometrie von Gewebeproben korreliert werden. Dabei ist die Aussagekraft der standardisierten zweidimensionalen Echokardiografie für die Funktion des rechten Ventrikels jedoch aufgrund seiner asymmetrischen Form beschränkt. Verlässlichere Analysen lassen sich durch Dopplersonografie erzielen.¹³⁴

In einem zehnwöchigen Intervall nach HTx erhoben Zhuang et al.¹³³ die rechtsventrikuläre Füllungszeit in dopplersonografischen Untersuchungen und verglichen sie mit dem Sirius-rot aufbereiteten Kollagengehalt in RV-EMB. Dabei ergab sich eine starke, statistisch signifikante Assoziation ($r = 0,89$; $p < 0,001$). Außerdem ließen sich die Schwankungen des myokardialen Kollagengehaltes in ihrer Patientenkohorte signifikant mit Veränderungen der rechtsventrikulären Füllungszeit erklären ($r = 0,91$; $p < 0,001$). Goland et al.¹³⁴ bewiesen, dass die systolische und diastolische Füllungsgeschwindigkeit in beiden Ventrikeln innerhalb der ersten Woche nach HTx signifikant reduziert ist. Dabei zeigten sich keine Anzeichen einer Abstoßung. Sie vermuteten hinter dieser Funktionseinschränkung daher eine Reaktion auf die Ischämie und Reperfusion während der Transplantation und die damit verbundenen Anpassungsvorgänge im Myokard. Im einjährigen Verlauf regenerierte sich die Funktion des rechten Ventrikels statistisch signifikant langsamer und unvollständiger als im linken Ventrikel. Dieses Phänomen führte die Forschungsgruppe unter anderem auf eine 3,3fach Zunahme der interstitiellen Fibrose im rechtsventrikulären Myokard

(Trichrom-Färbung nach Gomori) zurück. Eine Korrelationsanalyse zur Überprüfung eines direkten Zusammenhangs zwischen den bioptischen und echokardiografischen Befunden erfolgte jedoch nicht.

Für den Zeitpunkt von zwei Wochen sowie einem Jahr nach HTx ermittelten Mastouri und Kollegen¹⁰ spezifische Parameter für die Funktion des rechten Ventrikels anhand echokardiografischer Untersuchungen von 27 herztransplantierten Patienten. Dabei waren folgende Werte im Sinne einer rechtsventrikulären Insuffizienz signifikant erniedrigt:

- Die TAPSE – tricuspidal annular plane systolic excursion – gibt das Bewegungsausmaß des Trikuspidalklappenrings von der Enddiastole bis zur Endsystole wieder.
- Die FAC – fractional area change (%) – entspricht der fraktionellen systolischen Flächenänderung und wird analog zur Ejektionsfraktion (%) ermittelt.
- Die VTI – velocity time integral – wird mittels farbkodiertem Gewebedoppler gemessen und zeigt die Flussgeschwindigkeit über die Zeit an.

Von interstitiellen Veränderungen im rechtsventrikulären Gewebe scheint ein signifikantes Einflusspotential auf die Funktion des Transplantats auszugehen. Vor diesem Hintergrund sollten zukünftige Studien zum Langzeitverlauf nach HTx histomorphometrische Befunde der myokardialen EZM auch im Zusammenhang mit echokardiografischen Untersuchungsergebnissen bewerten. Dabei erscheinen die von Mastouri et al.¹⁰ beschriebenen Funktionsparameter als besonders geeignet.

8 Limitationen

8.1 Statistische Power

Aus der abnehmenden Fallzahl der EMB pro Untersuchungszeitpunkt (siehe Tabellen 4 und 5 in Abschnitt 6.1) ergibt sich eine relativ geringe statistische Power. Außerdem spiegelte sich in den hohen Standardabweichungen und ausgeprägten Variationskoeffizienten der Ergebnisse in Abschnitt 6 eine starke Streuung der mittleren Messwerte wider. Denkbare Einflussfaktoren, die zu einem verzerrten Bild geführt haben könnten, sind die individuelle Auswahl der Messfelder für die histomorphometrischen Untersuchungen (siehe Abschnitt 5.2) sowie die zerstörte Gewebearchitektur in einigen EMB (siehe Abschnitt 7.1).

Sowohl die geringe statistische Power als auch die breite Variation der Ergebnisse begründen möglicherweise die mehrheitlich fehlende statistische Signifikanz der Analysen. In zukünftigen

Untersuchungen sollte die Anzahl an Patienten und messbaren EMB pro Untersuchungszeitpunkt daher angehoben werden.

8.2 Bedeutung von Kollagen Typ I

Die histomorphometrische Analyse der vorliegenden Arbeit schloss nur die kollagenen Subtypen III und IV ein. Die immunhistochemische Aufbereitung von Kollagen Typ I erfolgt im DHZB weder in routinemäßig entnommenen EMB im Rahmen der Posttransplantationsnachsorge noch zu Studienzwecken. Untersuchungen zum langfristigen postoperativen Verlauf des Kollagen-I-Gehaltes in der myokardialen EZM konnten in der vorliegenden Studie daher nicht erfolgen. Allerdings wird der Hauptanteil der kollagenen Matrix im Myokard mit bis zu 85% von Kollagen Typ I gestellt. Kollagen Typ III ist nur etwa zu 11% in der EZM des Herzens enthalten.^{40, 55}

Bisherige Studien konnten postoperativ einen signifikanten Anstieg von Kollagen Typ I im Myokard des transplantierten Herzen beobachten.^{61, 62} Daher ist zu empfehlen, das Grundgerüst der vorliegenden Arbeit in einer zukünftigen Studie aufzunehmen und die histomorphometrische Darstellung von Kollagen I in die Langzeitbeobachtung nach HTx einzubeziehen. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Messungen von Kollagen Typ I ähnliche Mittelwerte erzielen würden wie die Sirius-Rot gefärbte Gesamtfibrose. Dadurch wären interessante Rückschlüsse darauf möglich, welche Aufbereitungsmethode ein genaueres Abbild des interstitiellen Bindegewebes im Myokard liefert. Zudem könnte sich aus der Korrelation mit weiteren bioptischen Befunden ein statistisch signifikantes Einflusspotential auf Umbauvorgänge der EZM nach HTx ergeben. Gegebenenfalls ließen sich daraus Schlussfolgerungen für die klinische Praxis gewinnen und Empfehlungen für die Posttransplantationsnachsorge aussprechen.

8.3 Definition einer Vergleichsgruppe

Weder die vorliegende Arbeit noch eine Literaturrecherche konnten eindeutig klären, ob die nachgewiesenen Veränderungen der EZM-Komponenten einem für herztransplantiertes Gewebe spezifischem Verlauf folgen oder ob sie lediglich im Sinne eines physiologischen Alterungsprozesses interpretiert werden müssen.

Histomorphometrische Analysen weiterführender Studien sollten daher verstärkt Kontrollgruppen einbeziehen. Die Definition einer geeigneten Vergleichsgruppe ist komplex. In der Herzpathologie werden Serien-Biopsien auch zur Verlaufskontrolle bei Myokarditis eingesetzt. Die Gewebeentnahmen finden in einem Zeitraum von 14 bis 30 Tagen nach Diagnosestellung statt. Ein Vergleich mit transplantiertem Myokard könnte somit für die postoperative Frühphase nach HTx erfolgen.

Jedoch könnten inflammatorische Vorgänge der Myokarditis einen schwer zu quantifizierenden, pathologischen Einfluss auf die Umstrukturierung der myokardialen EZM nehmen.

Der physiologische Anteil an Fibrose im rechten Ventrikel beläuft sich laut Knieriem³⁴ auf ungefähr 12,3%, während ein Bindegewebsgehalt von 20% als kritisch für den Erhalt einer gesunden Herzfunktion anzusehen ist. Darauf basierend könnten Langzeit-Analysen von EMB herzgesunder Personen wertvolle Hinweise erbringen, ob es sich bei den dargestellten Umbauprozessen um ein spezielles Phänomen im interstitiellen Myokard nach HTx handelt. Aus ethischen Gesichtspunkten verbietet sich jedoch eine serielle Entnahme myokardialer Gewebeproben bei herzgesunden Patienten.

Im DHZB wird das Herzgewebe eines Spenders zunächst histologisch begutachtet, um die Eignung für eine Transplantation sicherzustellen. Als Organspender kommen dabei nur Personen infrage, die frei von einer gravierenden kardialen Grunderkrankung sind. Demnach könnte anhand der Biopsien von Organspendern eine herzgesunde Vergleichsgruppe gebildet werden. Erste Ansätze der vorliegenden Arbeit bestehen bereits durch den Vergleich der spenderassoziierten Ausgangsbedingungen (Null Biopsie) mit den postoperativ entnommenen Gewebeproben (siehe Abschnitt 6.5.). Für statistisch valide Ergebnisse und eindeutige Erkenntnisse wird jedoch eine größere Anzahl an Proben bei HTx benötigt. Zusätzlich stehen diese EMB nur zum spezifischen Zeitpunkt der HTx zur Verfügung, sodass eine Verlaufsbeurteilung zur Bewertung von Alterungsprozessen nicht durchgeführt werden könnte. Es wäre lediglich ein grundsätzlicher Vergleich zwischen transplantiertem Herzgewebe und gesundem Myokard möglich.

Das Gewebe von Herzspendern wurde bereits in einigen Veröffentlichungen als Vergleichsgruppe genutzt. Dabei handelte es sich um relativ kleine Fallzahlen. Zudem wendeten die Forschungsgruppen unterschiedliche Untersuchungsmethoden an (siehe Tabelle 1 in Abschnitt 2.3), sodass die Ergebnisse nicht zweifelsfrei vergleichbar sind. Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Vergleichsgruppen in bisherigen Studien.

Tabelle 16: Kontrollgruppen in Studien zum myokardialen Interstitium im postoperativen Verlauf nach HTx

Referenz	Messstruktur	Zeitintervall nach HTx	Studienkohorte		Kontrollkohorte		
			Anzahl	Ergebnis (MW ± SA)	Definition	Anzahl	Ergebnis (MW ± SA)
Rowan und Billingham(1990) ¹¹⁷	Fibrose	3 Jahre	95	3,8-4,9 ± 1,8-2,6% *	Kardiologisch gesunde Organspender	20	3,8 ± 2,2%
Nozynski et al. (2007) ^{71,**}	Fibrose	10 Jahre	122	6,5-9,3 ± 1,7-2,8% *	Kardiologisch gesunde Organspender	7	2,9 ± 0,69%
Koch et al. (2006) ^{60,**}	Fibrose	7 Tage	58	perimysial: 4,62 ± 1,91% endomysial: 5,36 ± 1,47%	EMB bei HTx (Null Biopsie)	58	perimysial: 3,19 ± 1,48% endomysial: 4,20 ± 0,99%
Schupp et al. (2006) ^{66,**}	Kollagen	3 Jahre	Kollagen III: 12-19* Kollagen IV: 14-19*	Kollagen III: 0,9-1,2 ± 0,4-0,7% * Kollagen IV: 0,9 ± 0,1%	EMB bei HTx (Null Biopsie)	Kollagen III: 24 Kollagen IV: 23	Kollagen III: 2,5 ± 0,4% Kollagen IV: 1,4 ± 0,2%
Pickering und Boughner (1990) ⁹⁵	Fibrose	5-10 Tage	36	4,7 ± 1,9%	Kardiologisch gesunde Autopsieorgane	7	2,9 ± 0,6%
van Suylen et al. (1996) ^{94,**}	Fibrose	0-91 Monate	30	6-9 ± 2-7%*	Kardiologisch gesunde Autopsieorgane	16	4 ± 3%
Armstrong et al. (1998) ^{68,**}	Fibrose	6 Jahre	50	15,0-19,0 ± 4,0-9,0% *	Kardiologisch gesunde Patienten im Rahmen der onkologischen Therapieplanung (einmalige EMB)	11	11,0 ± 4,0%
Armstrong et al. (1998) ^{68,**}	Fibrose	6 Jahre	50	15,0-19,0 ± 4,0-9,0% *	Dilatative Kardiomyopathie (einmalige EMB)	40	15,0 ± 6,0%

* Spannweite der Messwerte bzw. Anzahl im Untersuchungsverlauf, ** Unterschied zwischen Studien- und Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p \leq 0,05$)

EMB – Endomyokardbiopsien; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; % – Prozent; p – Signifikanzniveau; SA – Standardabweichung

In der überwiegenden Anzahl der bisherigen Studien erreicht der physiologische Fibrosegehalt im kardial gesunden Myokard keineswegs den von Knieriem³⁴ postulierten Normalwert. Zudem weist gesundes Herzgewebe mehrheitlich einen eher geringeren Anteil an fibrotischen Läsionen auf als die jeweilige Studienkohorte. Lediglich in der Studie von Rowan und Billingham¹¹⁷ ergab sich für die Kontrollgruppe ein mit HTx-Patienten nahezu identischer Fibrosegehalt. In der Analyse von Schupp et al.⁶⁶ zeigte sich in der Vergleichsgruppe überraschenderweise ein statistisch signifikant höherer Gehalt an Kollagen Typ III und IV als in den EMB nach HTx.

Aufgrund der eingeschränkten Vergleichbarkeit der Analysen sind Rückschlüsse auf den physiologischen Ausgangszustand der EZM im Myokard erschwert. Dennoch sollten EMB von Herzspendern in die Konzeption einer Studie als mögliches Vergleichsgewebe einbezogen werden. Dadurch würde ein für die entsprechende Studie individueller Ausgangswert zur Interpretation der jeweiligen Messungen vorliegen, um die Entwicklung nach HTx in einen spezifischen Kontext zu setzen.

9 Schlussfolgerungen

Im Anschluss an die Ergebnisdarstellung und Diskussion können aus der vorliegenden Studie folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- 1) In den ersten fünf Jahren nach Herztransplantation finden in der extrazellulären Matrix des Myokards dynamische Umbauprozesse statt.
- 2) Der mittlere Gehalt an Gesamtfibrose liegt mehrheitlich innerhalb des definierten Normbereiches von $\leq 9\%$. Er nimmt vorrangig während des ersten Jahres nach Herztransplantation zu und zeigt langfristig einen stabilen Verlauf.
- 3) Der mittlere Anteil des interstitiellen Kollagen Typ III sinkt im ersten Jahr nach Herztransplantation geringfügig ab. Im weiteren postoperativen Verlauf steigt er statistisch signifikant.
- 4) Das immunhistochemisch aufbereitete Kollagen Typ III liegt während des gesamten Untersuchungszeitraumes in einem höheren Verhältnis vor als die Gesamtfibrose, die durch die Sirius-Rot-Färbung quantifiziert werden kann. Durch die histomorphometrische Darstellung der kollagenen Subtypen können die strukturellen Verhältnisse des extrazellulären Bindegewebes im Myokard somit differenzierter abgebildet werden.
- 5) Der durchschnittliche Gehalt an Kollagen Typ IV steigt stetig bis zum fünften Jahr nach Herztransplantation. Als basalmembranständiges Matrixprotein nimmt es deutlich an den Anpassungsvorgängen der zellulären Bestandteile im Myokard teil und stellt sicher, dass die Herzmuskelzellen ihrer mechanischen Funktion auch noch bei Formveränderungen nach Herztransplantation nachgehen können.
- 6) In Abhängigkeit vom Patientengeschlecht bzw. dem Überlebensstatus ergeben sich für keine der drei untersuchten Strukturen statistisch plausible Unterschiede in ihrer Messwertentwicklung.
- 7) Patienten mit Transplantaten gleichaltriger Spender bilden im langfristigen postoperativen Verlauf die höchsten Anteile an Fibrose, Kollagen Typ III und IV aus. Dahingegen zeigen Patienten, die zum Transplantationszeitpunkt mehr als zehn Jahre älter als ihre Organspender sind, im fünften Jahr nach Herztransplantation tendenziell eine geringere Gesamtfibrose sowie einen geringeren Gehalt an Kollagen Typ III als Organempfänger mit gleichaltrigem bzw. über zehn Jahre älterem Spender. Auch Kollagen Typ IV zeigt sich in der

erstgenannten Gruppe nur unwesentlich erhöht gegenüber den anderen beiden Patientengruppen. Der protektive Effekt eines jüngeren Spenderalters kann jedoch aufgrund fehlender Vergleichsdaten nur angenommen werden.

- 8) Patienten, die bei ihrer Herztransplantation mindestens als 60 Jahre sind, bilden über fünf postoperative Jahre hinweg den höchsten Anteil an durchschnittlicher Gesamtfibrose aus. Unter 40jährige Patienten entwickeln eine stärkere myokardiale Fibrose als Patienten, die zum Zeitpunkt ihrer Transplantation zwischen 40 und 59 Jahre alt sind. Im Hinblick auf Kollagen Typ III weisen Patienten der jüngsten Altersgruppe den höchsten Gehalt auf und ältere Patienten entwickeln den geringsten mittleren Anteil. Die mittlere Kollagen-IV-Rate ist bei 40 bis 59 Jahre alten Patienten am stärksten ausgeprägt. Zwischen den unter 40jährigen und über 60jährigen Patienten unterscheidet sie sich dahingegen kaum. Somit kann angezweifelt werden, dass ein jüngeres Patientenalter bei Herztransplantation einen protektiven Effekt auf die postoperative Umstrukturierung des extrazellulären Myokards haben könnte.
- 9) Zum Transplantationszeitpunkt zeigt die Struktur der interstitiellen EZM erhebliche Schwankungen innerhalb des Studienkollektivs. Mögliche Erklärungsansätze könnten in den klinischen Unterschieden zwischen den Transplantat Spendern sowie einer möglichen Myokardschädigung durch den Hirntod des Organspenders liegen. In Gegenüberstellung der histomorphometrischen Ergebnisse bei Transplantation mit dem postoperativen Verlauf zeigen sich vor allem für Kollagen Typ III und IV relevante, quantitative Unterschiede. So ergab sich für Kollagen Typ III eine statistisch signifikante, stark positive Korrelation zwischen dem Ausmaß bei Herztransplantation und dem anschließenden fünfjährigen Beobachtungsintervall. Die postoperative Wertentwicklung von Kollagen Typ IV war dahingegen negativ mit den Ausgangsbedingungen bei Transplantation assoziiert.
- 10) Anhand der Untersuchungsergebnisse deutet sich an, dass von Ischämiezeiten unter 211 Minuten ein protektiver Effekt auf die langfristige Entwicklung fibrotischer Läsionen und den kurzfristigen Kollagen-III-Gehalt ausgeht. Aufgrund der kontroversen Studienlage und mangelnden aktuellen Publikationen kann ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Länge der Organischämie bei Transplantation und der postoperativen Entwicklung des myokardialen Interstitiums nicht abschließend bestätigt werden.
- 11) Zelluläre Abstoßungsreaktionen zeigen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die postoperative Wertentwicklung der Fibrose, Kollagen Typ III und IV. Um das Einflusspotenzial zellulärer Rejektionen weiterführend überprüfen zu können, sollten zukünftige histomorphometrische Analysen den serologischen Markern des kollagenen Metabolismus,

wie zum Beispiel Pro-Collagen I und III, gegenübergestellt und mit zellulären Abstoßungsvorgängen korreliert werden.

- 12) Patienten, die im gesamten Untersuchungszeitraum frei von einer humoralen Abstoßung sind, tendieren langfristig zu einem geringeren Anteil an Fibrose, Kollagen Typ III sowie Kollagen Typ IV. Weiterführenden Studien sollten der Frage gewidmet werden, ob humorale Abstoßungsepisoden als potenzieller Einflussfaktor auf Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix bestätigt werden können.
- 13) Es kann kein plausibler Zusammenhang zwischen einer Hypertrophie der Herzmuskelzellen und der postoperativen Entwicklung des mittleren Fibrose- bzw. Kollagen-III-Gehaltes abgeleitet werden.
- 14) Im dritten postoperativen Jahr ist der durchschnittliche Gehalt an Kollagen Typ IV bei Patienten mit morphologisch prominenten Endothelzellen in den ersten 30 Tagen nach Herztransplantation statistisch signifikant stärker ausgebildet als bei Patienten mit unauffälligem Endothelstatus. Für das fünfte postoperative Jahr setzt sich dieser Unterschied nicht mehr statistisch signifikant fort. Somit scheinen morphologische Veränderungen des Gefäßendothels keinen langfristigen Einfluss auf den mittleren Kollagen-IV-Anteil im interstitiellen Myokard nach HTx zu nehmen.
- 15) Patienten mit mikrovaskulopathischen Veränderungen weisen im fünften Jahr nach HTx eine höhere Durchschnittsrate an Kollagen Typ IV auf als Patienten ohne Mikrovaskulopathie. Zu diesem Aspekt sollten weiterführende Studien angestrebt werden, da die Mikrovaskulopathie als einer der begrenzenden Faktoren für das Langzeitüberleben nach Herztransplantation gilt.
- 16) Eine lineare Regressionsanalyse erklärt 20% bzw. 24% der postoperativen Schwankungen im Kollagen-III und -IV-Gesamtgehalt durch Variationen der untersuchten Einflussfaktoren (Geschlecht, Überlebensstatus, Ischämiezeit, Altersdifferenz zwischen Patient und Spender bei Herztransplantation, Alter des Patienten bei Herztransplantation, zelluläre und antikörpervermittelte Abstoßung, mikrovaskulopathische Strombahnveränderungen). Eine detaillierte Betrachtung ergab insbesondere ein statistisch signifikantes Einflusspotential von mikrovaskulopathischen Läsionen auf die Wertentwicklung aller drei Strukturkomponenten.
- 17) Eine Literaturrecherche verneint einen eindeutigen Effekt von Immunsuppressiva auf die Entwicklung fibrotischer Läsionen nach HTx. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Einnahme von Cyclosporin A und dem Ausmaß endomyokardialer Fibrose

lässt sich durch die Mehrheit der durchgeführten Studien nicht belegen. Dahingegen bestehen statistisch signifikante Hinweise darauf, dass die anti-proliferativ wirkenden mTor-Inhibitoren mit einer geringer ausgeprägten Fibrose nach HTx einhergehen.

- 18) Die Bedeutsamkeit interstitieller Gewebeveränderungen für die klinische Funktion des Transplantats ist bisher lediglich in Hypothesen formuliert. Es ist davon auszugehen, dass fibrotische Areale die Dehnbarkeit des Herzens herabsetzen und die mechanische Funktion hauptsächlich durch aufgelockerte Herzmuskelzellverbindungen einschränken. Zukünftige Studien zur Klärung möglicher Funktionsverluste durch interstitielle Umbauvorgänge sollten echokardiografische Messungen einbeziehen.
- 19) Um einen umfassenden Eindruck über die strukturellen Anpassungsvorgänge im interstitiellen Herzgewebe nach Herztransplantation zu erhalten, müssen weiterführende Studien Kollagen Typ I als Hauptbestandteil der myokardialen extrazellulären Matrix einbeziehen.
- 20) Es fehlen vergleichbare Studien, um zu klären, ob die dargestellten Entwicklungen der drei Strukturkomponenten einen spezifischen Umbauprozess des myokardialen Interstitiums nach Herztransplantation widerspiegeln. Zudem sind die physiologischen Alterungsvorgänge im humanen Myokard bisher unzureichend erforscht. Entsprechende Erkenntnisse aus Tiermodellen können nicht zweifelsfrei auf das alternde Herzgewebe des Menschen übertragen werden. Demnach bleibt unklar, ob die Ergebnisse der Arbeit lediglich Ausdruck normaler Anpassungsvorgänge des extrazellulären Bindegewebes sind und sich bei herzgesunden Patienten im fünfjährigen Beobachtungsverlauf ähnlich darstellen würden. Zukünftige Studien sollten daher eine Kontrollgruppe etablieren. Diese könnte durch die histomorphometrische Auswertung von Myokardproben herzgesunder Organspender entstehen. Dadurch könnte den postoperativen Umbauprozessen der extrazellulären Myokardmatrix nach Herztransplantation ein Istzustand des gesunden Myokards gegenübergestellt werden.

Literaturverzeichnis

- (1) Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KKL, Murabito JM, Vasani RS.
Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure.
New England Journal of Medicine 2002;347(18):1397-1402.
- (2) Weber KT, Brilla CG, Janicki JS.
Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors.
Cardiovascular Research 1993;27:341-8.
- (3) Weber KT.
Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network.
Journal of the American College of Cardiology 1989;13:1637-52.
- (4) Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratus G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antmann EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO, Smith SC.
ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee to revise the 1995 guidelines for the evaluation and management of heart failure) developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation endorsed by the Heart Failure Society of America.
Journal of the American College of Cardiology 2001;38(7):2101-13.
- (5) Pham MX.
Prognosis after cardiac transplantation, 2011:1-12.
(Up-to-date: Evidence-based clinical decision support, accessed online July 16, 2013, at: http://www.uptodate.com/contents/prognosis-after-cardiac-transplantation?source=search_result&search=Prognosis+after+cardiac+transplantation&selectedTitle=1~150)
- (6) Hiemann NE, Hübler M, Lehmkuhl H, Potapov EV, Hetzer R.
Heart Transplantation at the Deutsches Herzzentrum Berlin.
In: Cecka JM, Terasaki PI eds. Clinical Transplants. Los Angeles, California, USA: Terasaki Foundation Laboratory, 2010:207-18.

- (7) Kobashigawa JA.
The future of heart transplantation.
American Journal of Transplantation 2012;12:2875-91.
- (8) Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Hertz MI.
The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report - 2012.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2012;31(10):1045-95.
- (9) Hiemann NE.
Histomorphometrische Untersuchungen myokardialer Blutgefäßveränderungen nach Herztransplantation. Ein Beitrag zur Pathogenese der Transplantatvaskulopathie, 1998.
Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin. Charité - Universitätsmedizin Berlin (accessed online March 05, 2013, at: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/medizin/hiemann-nicola/PDF/Hiemann.pdf>)
- (10) Mastouri R, Batres Y, Lenet A, Gradus-Pizlo I, O'Donnel J, Feigenbaum H, Sawada SG.
Frequency, time course, and possible causes of right ventricular systolic dysfunction after cardiac transplantation: a single center experience.
Echocardiography 2013;30(1):9-16.
- (11) Robbins RC, Barlow CW, Oyer PE, Hunt SA, Miller JL, Reitz BA, Stinson EB, Shumway NE.
Thirty years of cardiac transplantation at Stanford university.
The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 1999;117(5): 939-51.
- (12) Hiemann NE.
Mikrovaskulopathie und Herztransplantation, 2007.
Habilitation. Charité - Universitätsmedizin Berlin (accessed online March 05, 2013, at: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000005388)
- (13) Fornes P, Heudes D, Simon D, Guillemain R, Amrein C, Bruneval P.
Influence of acute or chronic rejection on myocardial collagen density in serial endomyocardial biopsy specimens from cardiac allografts.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 1996;15(8):796-803.
- (14) Scheld HH, Deng MC, Hammel D, Schmid C.
Leitfaden Herztransplantation. Interdisziplinäre Betreuung vor, während und nach Herztransplantation.
2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 2001.

- (15) Dösch A.
Brennpunkte der Herztransplantationsnachsorge.
Transplantationsmedizin 2010;22:64-8.
- (16) Hetzer R.
Transplantationen und Transplantationsambulanz. im: Jahresbericht des Deutschen Herzzentrum Berlin, 2012:61.
(accessed July 17, 2013, at: http://www.dhzb.de/fileadmin/user_upload/deutsche_Seite-/download/JB2012.pdf)
- (17) Wellnhofer E, Stypmann J, Bara C, Stadlbauer THW, Heidt MC, Stempfle H-U.
Angiographic assessment of cardiac allograft vasculopathy: results of a Consensus Conference of the Task Force for Thoracic Organ Transplantation of the German Cardiac Society.
Transplant International 2010;23(11):1094-104.
- (18) Pollack A, Nazif T, Mancini D, Weisz G.
Detection and imaging of cardiac allograft vasculopathy.
Journal of the American College of Cardiology Cardiovascular Imaging 2013;6(5):613-23.
- (19) Eisen HJ, Jessup M.
Acute cardiac allograft rejection: Diagnosis, 2013:1-13.
(Up-to-date: Evidence-based clinical decision support accessed online September 16, 2013, at: http://www.uptodate.com/contents/acute-cardiac-allograft-rejection-diagnosis?source=search_result&search=Eisen+HJ%2C+Jessup+M.+Acute+cardiac+allograft+rejection%3A+Diagnosis&selectedTitle=11~150)
- (20) Cui G, Tung T, Kobashigawa JA, Laks H, Sen L.
Increased incidence of atrial flutter associated with the rejection of heart transplantation.
American Journal of Cardiology 2001;88(8):280-4.
- (21) Caves PK, Stinson EB, Billingham ME, Shumway NE.
Percutaneous transvenous endomyocardial biopsy in human heart recipients.
The Annals of Thoracic Surgery 1973;16(4):325-36.
- (22) Caves PK, Stinson EB, Billingham ME, Shumway NE.
Serial transvenous biopsy of the transplanted human heart. Improved management of acute rejection episodes.
The Lancet 1974; Saturday, May 4 1974:821-6.

- (23) Fowles RE, Mason JW.
Role of cardiac biopsy in the diagnosis and management of cardiac disease.
Progress in Cardiovascular Disease 1984;27(3):153-72.
- (24) Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Hertz MI.
The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report - 2011.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2011;30(10):1078-94.
- (25) Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S, Fedson S, Fisher P, Gonzales-Stawinski G, Martinelli L, McGiffin D, Smith J, Taylor D, Meiser B, Webber S, Baran D, Carboni M, Dengler T, Feldman D, Frigerio M, Kfoury A, Kim D, Kobashigawa J, Shullo M, Stehlik J, Teuteberg J, Uber P, Zuckermann A, Hunt S, Burch M, Bhat G, Canter C, Chinnock R, Crespo-Leiro M, Delgado R, Dobbels F, Grady K, Kao W, Lamour J, Parry G, Patel J, Pini D, Towbin J, Wolfel G, Delgado D, Eisen H, Goldberg L, Hosenpud J, Johnson M, Keogh A, Lewis C, O'Connell J, Rogers J, Ross H, Russell S, Vanhaecke J.
The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2010;29(8):914-56.
- (26) From AF, Maleszewski JJ, Rihal CS.
Current Status of Endomyocardial Biopsy.
Mayo Clinic Proceedings 2011;86(11):1095-102.
- (27) Chan MYC, Giannetti N, Kato T, Kornbluth M, Oyer P, Valantine HA, Robbins RC, Hunt SA.
Severe tricuspid reurgitation after heart transplantation.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2001;20:709-17.
- (28) Baba HA, Wohlschläger J, Stypmann J, Hiemann NE.
Herztransplantation. Pathologie, Klinik und Therapie.
Der Pathologe 2011;32(2):95-103.
- (29) Baba HA, Sotiropoulos GC.
Transplantationspathologie: Quo vadis?
Der Pathologe 2011;32(2):93-4.

- (30) Strecker T, Rösch J, Weyand M, Agaimy A.
Endomyocardial biopsy for monitoring heart transplant patients: 11-years-experience at a german heart center. I
International Journal of Clinical and Experimental Pathology 2013;6(1):55-65.
- (31) Graham AF, Rider AK, Caves PK, Stinson EB, Shumway NE, Schroeder JS.
Acute rejection in the long-term cardiac transplant survivor. Clinical diagnosis, treatment and significance.
Circulation 1974;49(2):361-6.
- (32) Patel JK, Kobashigawa JA.
Should we be doing routine biopsy after heart transplantation in a new era of anti-rejection?
Current Opinion of Cardiology 2006;21(2):127-31.
- (33) Eisen HJ, Jessup M.
Acute cardiac allograft rejection: treatment, 2013:1-13.
(Up-to-date: Evidence-based clinical decision support accessed online July 16, 2013, at: http://www.uptodate.com/contents/acute-cardiac-allograft-rejection-treatment?source=search_result&search=Acute+cardiac+allograft+rejection%3A+treatment&selectedTitle=1~150)
- (34) Knieriem HJ.
Über den Bindegewebsgehalt des Herzmuskels des Menschen.
Basic Research in Cardiology 1964;44(3-4):231-59.
- (35) Pelouch V, Dixon IMC, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS.
Role of extracellular matrix proteins in heart function.
Molecular and Cellular Biochemistry 1994;129:101-20.
- (36) Caulfield JB, Janicki JS.
Structure and function of myocardial fibrillar collagen.
Technology and Health Care 1997;5:95-113.
- (37) de Souza RR.
Aging of myocardial collagen.
Biogerontology 2002;3:325-35.
- (38) Robinson TF, Cohen-Gould L, Factor SM.
The skeletal framework of mammalian heart muscle: arrangement of inter. and pericellular connective tissue structures.
Laboratory Investigation 1983;49:482-7.

- (39) Jugdutt BI.
Remodeling of the Myocardium and Potential Targets in the Collagen Degradation and Synthesis Pathways.
Current Drug Targets - Cardiovascular & Haematological Disorders 2003;3(1):1-30.
- (40) Weber KT, Pick R, Jalil JE, Janicki JS, Carroll EP.
Patterns of Myocardial Fibrosis.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 1989;21(Supplement V):121-31.
- (41) Burton AC.
Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels.
Physiological reviews 1954;34:619-42.
- (42) Montes GS, Junqueira LCU.
Biology of collagen.
Revue Canadienne De Biologie Experimentale 1982;41(2):143-156.
- (43) Bishop JE, Laurent GJ.
Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart.
European Heart Journal 1995;16(Supplement C):38-44.
- (44) Marijianowski MMH, Teeling P, Mann J, Becker AE.
Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment.
Journal of the American College of Cardiology 1995;25(6):1263-72.
- (45) Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Giambrone MA.
Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 1989;21:103-13.
- (46) LeBleu VS, MacDonald B, Kalluri R.
Structure and function of basement membranes.
Experimental Biology and Medicine 2007;232:1121-9.
- (47) Yurchenco PD, Schittny JC.
Molecular architecture of basement membranes.
The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology 1990;4:1577-90.
- (48) Bruggink AH, van Oosterhout MFM, de Jonge N, Cleutjens JP, van Wichem DF, van Kulk J, Tilanus MG, Gmelig-Meyling FH, van den Tweel JG, de Weger RA.

- Type IV collagen degradation in the myocardial basement membrane after unloading of the failing heart by a left ventricular assist device.
Laboratory Investigation 2007;87:1125-37.
- (49) Jourdan-LeSaux C, Zhang J, Lindsey ML.
Minireview. Extracellular matrix roles during cardiac repair.
Life Science 2010;87:391-400.
- (50) Janicki JS, Matsubara BB, Kabour A.
Myocardial collagen and its functional role. Interactive Phenomena in the cardiac system.
Advances in Experimental Medicine and Biology 1993;346:291-8.
- (51) Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, VoloshenyukT, Levick SP, Janicki JS.
The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function.
European Journal of Cardio-thoracic surgery 2006;30:604-10.
- (52) Weber KT.
Fibrosis and hypertensive heart disease.
Current Opinion of Cardiology 2000;15:264-72.
- (53) Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Brilla CG, Burnett JC Jr, Cruickshank JM, Devereux JM, Giles TD, Korsgaard N, Leier CV.
Remodeling and reparation of the cardiovascular system.
Journal of the American College of Cardiology 1992;20(1):3-16.
- (54) Anderson KR, Sutton MG, Lie JT.
Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease.
Journal of Pathology 1979;128:79-85.
- (55) Weber KT, Brilla CG.
Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system.
Circulation 1991;83:1849-65.
- (56) Burlew BS, Weber KT.
Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction.
Herz 2002;27:92-8.
- (57) Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z.
Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease.
Fibrogenesis & Tissue Repair 2012;5(15):1-13.

- (58) Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U, Schultheiss HP.
Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio.
Circulation 1999;99:2750-6.
- (59) Arteaga E, de Araújo AQ, Bernstein M, Ramires FJ, Ianni BM, Fernandes F, Mady C.
Prognostic value of the collagen volume fraction in hypertrophic cardiomyopathy.
The Brazilian Archives of Cardiology 2009;92(3):210-4.
- (60) Koch A, Geil-Bierschenk C, Rieker R, Dengler TJ, Sack FU, Schirmacher P, Hagl S, Schnabel PA.
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.
European Journal of Cardio-thoracic surgery 2006;30(2):370-8.
- (61) Schacherer C, Koops D, Wiemer J, Hartmann A, Weis M, Klepzig H, Zeiher AM, Olbrich HG.
Extracellular matrix structure after heart transplantation.
International Journal of Cardiology 1999;68:115-20.
- (62) Tazelaar HD, Gay RE, Rowan RA, Billingham ME, Gay S.
Collagen profile in the transplanted heart.
Human Pathology 1990;21(4):424-8.
- (63) Vanhoutte D, van Almen GC, Van Aelst LN, Van Cleemput J, Droogné W, Jin Y, Van de Werf F, Carmeliet P, Vanhaecke J, Papageorgiou AP, Heymans S.
Matricellular proteins and matrix metalloproteinases mark the inflammatory and fibrotic response in human cardiac allograft rejection.
European Heart Journal 2013;34:1930-41.
- (64) Schnabel PA, Amann K, Ghaderipour H, Knapp S, Magener A, Zimmermann R, Lange R, Sack FU, Hagl S, Otto HF.
Interstitielle Fibrose in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien (RVEMB) ein Jahr nach Herztransplantation (HTx): Lokalisation, Ausmaß und Auswirkungen [Artikel 55].
2
4. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie vom 08. bis 10. Oktober 1993 in Mainz. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 1993;77:510-1.
- (65) Schnabel PA, Amann K, Ghaderipour H, Lange R, Sack FU, Knapp S, Magener A, Zimmermann R, Hagl S, Otto HF.

- Does right ventricular (RV) hypertrophy compensate interstitial fibrosis one year after heart transplantation (HTx)? [Abstract 200].
The Journal of Heart and Lung Transplantation 1994;13(Number 1 Part 2):81.
- (66) Schupp DJ, Huck BP, Sykora J, Flechtenmacher C, Gorenflo M, Koch A, Sack FU, Haass M, Katus HA, Ulmer HE, Hagl S, Otto HF, Schnabel PA.
Right ventricular expression of extracellular matrix proteins, matrix-metalloproteinases, and their inhibitors over a period of 3 years after heart transplantation.
Virchows Archiv 2006;448(2):184-94.
- (67) Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Leier CV.
Histologic comparison of allograft myocardium between short- and long-term survivors of human cardiac transplantation.
The American Journal of Cardiology 2000;86(10):1148-51.
- (68) Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV.
Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation.
Journal of the American College of Cardiology 1998;32(3):704-10.
- (69) Boni A.
Veränderungen des Interstitiums des Myokards nach Herztransplantation (Computerbasierte Mikroskopbildanalyse des interstitiellen Gewebes von Kontrollendomyokardbiopsien nach Herztransplantation), 2014.
Dissertation. Freie Universität Berlin. Charité - Universitätsmedizin Berlin. (accessed online November 16, 2014, at: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets-/MCRFileNodeServlet/FUDISSL_derivate_000000015347/diss_a.boni.pdf)
- (70) Prochno T, Meyer R.
Histologische Veränderungen des Myokards nach Herztransplantation.
Zeitschrift für Ärztliche Fortbildung 1992; 86:1031-3.
- (71) Nozynski J, Zakliczynski M, Zembala-Nozynska E, Konecka-Mrówka D, Przybylski R, Nikiel B, Lange D, Mrówka A, Przybylski J, Maruszewski M, Zembala M.
Remodeling of human transplanted myocardium in ten-year follow-up: a clinical pathology study.
Transplant Proceedings 2007;39:2833-40.
- (72) Gramley F, Lorenzen J, Pezzella F, Kettering K, Himmrich E, Plumhans C, Koellensperger E, Munzel T.

- Hypoxia and Myocardial Remodeling in Human Cardiac Allografts: A Time-course Study.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2009;28(11):1119-26.
- (73) Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Anderson CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suci-Focia N, Zeevi A, Billingham ME.
Revision of the 1990 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Heart Rejection.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2005;24(11):1710-20.
- (74) Hiemann NE, Hetzer R.
Aufklärung zur Studie "Erarbeitung von Prognosefaktoren für die Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation".
intern zur Verfügung gestellt. Version vom 29.12.2004.
- (75) Hiemann NE, Wellnhofer E, Knosalla C, Lehmkuhl HB, Stein J, Hetzer R, Meyer R.
Prognostic impact of microvasculopathy on survival after heart transplantation: evidence from 9713 endomyocardial biopsies.
Circulation 2007;116(11):1274-82.
- (76) Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S, Menlove RL, Renlund DG, Bristow MR, Gay WA Jr, Jones KW, O'Connell JB.
Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 1989;8(6):430-4.
- (77) Kfoury AG, Hammond ME.
Controversies in defining cardiac antibody-mediated rejection: need for updated criteria.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2010;29(4):389-94.
- (78) Nair V, Butany J.
Heart transplant biopsies: interpretation and significance.
Journal of Clinical Pathology 2010;63:12-20.
- (79) Steinmann AN.
Eine Verlaufsbeobachtung transplantierte humaner Herzen: Quantitative lichtmikroskopische Untersuchungen von Kardiomyozyten, Interstitium und intramuralen Arteriolen bis vier Jahre nach Herztransplantation, 2001.

- Dissertation. Universität Freiburg (Kurzfassung, accessed online June 06, 2014, at: <http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/2193/1/ArneSteinmannDRMED.pdf>)
- (80) Mc Allister HA.
Endomyocardial Biopsy in the Evaluation of Conditions Leading to Cardiac Transplantation and in the Evaluation of Cardiac allograft Rejection.
Texas Heart Institute Journal 1995;22(1):53-66.
- (81) Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI.
Sirius red F3BA as a stain for connective tissue.
Archives of Pathology 1964;78:69-72.
- (82) Junquiera LC, Junquiera LC, Brentani RR.
A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen.
Analytical Biochemistry 1979;94(1):96-9.
- (83) Constantine VS, Mowry RW.
Selective staining of human dermal collagen II. The use of picrosirius red F3BA with polarization microscopy.
The Journal of Investigative Dermatology 1968;50(5):419-23.
- (84) Montes GS, Junqueira LCU.
The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen.
Memorio Instituto Oswaldo Cruz 1991;86(Supplement III):1-11.
- (85) Pichler M, Rainer PP, Schauer S, Hoefler G.
Cardiac fibrosis in human transplanted hearts is mainly driven by cells of intracardiac origin.
Journal of the American College of Cardiology 2012;59(11):1008-16.
- (86) Puchtler H, Sweat F, Valentine LS.
Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red F3A.
Beiträge zur Pathologie 1973;150:174-87.
- (87) Shamhardt PE, Meszaros JG.
Non-fibrillar collagens: Key mediators of post-infarction cardiac remodeling?
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2010;48:530-7.
- (88) Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG.
Mammalian Collagen IV.
Microscopy Research and Technique 2008;71:357-70.
- (89) Mollnau H.

Strukturelle Umbauprozesse im Myokard als Ursache eines circulus vitiosus im Stadium des "endstage heart failure" bei dilatativer Kardiomyopathie, 2003. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Giessen.

(accessed online October 09, 2013, at: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2004/1458/pdf/MollnauHanke-2003-10-15.pdf>)

- (90) Li YY, McTiernan CF, Feldman AM.
Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling.
Cardiovascular Research 2000;46(2):214-24.
- (91) Dorent RF, Beaudoux JL, Tezenas S, Ghossoub JJ, Roussouliere AL, Leger P, Vaissier E, Bonnet N, Leprince P, Regan M, Pavie A, Foglietti MJ, Cacoub P, Gandjbakhch I.
Circulating levels of matrix metalloproteinases in heart transplant recipients.
Transplantation Proceedings 2000;32(8):2750-1.
- (92) Kassiri Z, Khokha R.
Myocardial extra-cellular matrix and its regulation by metalloproteinases and their inhibitors.
Thrombosis and Haemostasis 2005;93(2):212-9.
- (93) Yamani MH, Tuzcu EM, Starling RC, Ratliff NB, Yu Y, Vince DG, Powell K, Cook D, McCarthy P, Young JB.
Myocardial ischemic injury after heart transplantation is associated with upregulation of vitronectin receptor (alpha(v)beta3), activation of the matrix metalloproteinase induction system, and subsequent development of coronary vasculopathy.
Circulation 2002;105(16):1955-61.
- (94) van Suylen RJ, van Bekkum EEC, Boersma H, de Kok LB, Balk AH, Bos E, Bosman FT.
Collagen content and distribution in the normal and transplanted heart: a postmortem quantitative light microscopic analysis.
Cardiovascular Pathology 1996;5(2):61-8.
- (95) 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;81:949-58.
- (96) Caspari PG, Newcomb M, Gibson K, Harris P.
Collagen in the normal and hypertrophied human ventricle.

- Cardiovascular Research 1977;11:554-8.
- (97) Wegelius O, von Knorring J.
The hydroxyproline and hexosamine content in human myocardium at different ages.
Acta Medica Scandinavica 1964;175(S412):233-7.
- (98) Keller F, Leutert G.
Zur Altersabhängigkeit der kollagenen Strukturen des menschlichen Herzens.
Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie 1993;27:186-93.
- (99) Roffe C.
Ageing of the heart.
British Journal of Biomedical Science 1998;55:136-48.
- (100) Lakatta EG.
Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons.
Heart Failure Reviews 2002;7:29-49.
- (101) Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P.
Cardiomyopathy of aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy.
Circulation Research 1991;68:1560-8.
- (102) Mays PK, McAnulty RJ, Laurent GJ.
Age-related changes in rates of protein synthesis and degradation in rat tissues.
Mechanisms of Ageing and Development 1991;59:229-41.
- (103) Robert V, Besse S, Sabri A, Silvestre JS, Assayag P, Nguyen VT, Swynghedauw B, Delcayre C.
Differential regulation of matrix metalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart.
Laboratory Investigation 1997;76(5):729-38.
- (104) Besse S, Robert V, Assayag P, Delcayre C, Swynghedauw B.
Nonsynchronous changes in myocardial collagen mRNA and protein during aging: effect of DOCA-salt hypertension.
American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 1994;267:H2237-44.
- (105) Kwak HB, Kim JH, Joshi K, Yeh A, Martinez DA, Lawler JM.
Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart.
The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2011;25:1106-17.

- (106) Lakhan SE, Harle L.
Cardiac fibrosis in the elderly, normotensive athlete: case report and review of the literature.
Diagnostic Pathology 2008;3:12.
- (107) Eghbali M, Eghbali M, Robinson TF, Seifter S, Blumenfeld OO.
Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging.
Cardiovascular Research 1989;23:723-9.
- (108) Annoni G, Luvara G, Arosio B, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, Jeremic G, Mircoli L, Latini R, Vergani C, Masson S.
Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in the rat myocardium.
Mechanisms of Ageing and Development 1998;101:57-72.
- (109) Burkauskiene AF, Mackiewicz ZF, Virtanen IF, Konttinen YT.
Age-related changes in myocardial nerve and collagen networks of the auricle of the right atrium.
Acta Cardiologica 2006;61(5):513-8.
- (110) Gramley F, Lorenzen J, Knackstedt C, Rana OR, Saygili E, Frechen D, Stanzel S, Pezzella F, Koellensperger E, Weiss C, Münzel T, Schauerte P.
Age-related atrial fibrosis.
Age (Dordrecht, Netherlands) 2009;31(1):27-38.
- (111) Gazoti Debessa CR, Mesiano Maifrino LB, Rodrigues de Souza R.
Age related changes of the collagen network of the human heart.
Mechanisms of Ageing and Development 2001;122(10):1049-58.
- (112) Burgess ML, McCrea JC, Hedrick HL.
Age-associated changes in cardiac matrix and integrins.
Mechanisms of Ageing and Development 2001;122(10):1739-56.
- (113) Frasik W, Garlicki M, Lazar A, Dziatkowiak A.
Histologic analysis of myocardial biopsies from donor hearts before transplantation.
Polish Journal of Pathology 1994;45(2):93-9.
- (114) Arbustini E, Gavazzi A, Pozzi R, Pucci A, Grasso M, Diegoli M, Campana C, Graziano G, Martinelli L, Goggi C.
Endomyocardial biopsy of normal donor hearts before cardiac transplantation. A morphological and morphometrical study in 97 cases.
The American Journal of Cardiology 1992;4(1):1-8.

- (115) Novitzky D, Rhodin J, Cooper DKC, Ye Y, Min K-W, DeBault L.
Ultrastructure changes associated with brain death in the human donor heart.
Transplant International 1997;10:24-32.
- (116) Sack FU, Lange R, Schnabel PA, Gösele S, Amman K, Magener A, Mehmanesh H, Otto HF, Hagl S.
Der Einfluss von Ischämiezeit auf die rechtsventrikuläre Hypertrophie und Fibrose in der Frühphase nach Herztransplantation.
Transplantationsmedizin 1996;8(Suppl.):55.
- (117) Rowan RA, Billingham ME.
Pathologic changes in the long-term transplanted heart: a morphometric study of myocardial hypertrophy, vascularity, and fibrosis.
Human Pathology 1990;21(7):767-72.
- (118) Lin Y-H, Liu C-P, Hsu RB, Lee CM, Wang SS, Kao HL, Chao CL, Shiau YC, Hung CS, Liao LC, Ho YL.
Association of amino-terminal propeptide of type III procollagen and acute myocardial rejection in male patients receiving heart transplantation.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2007;45:1004-8.
- (119) Hiemann NE, Wellnhofer E, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R, Meyer R.
Everolimus prevents endomyocardial remodeling after heart transplantation.
Transplantation 2011;92(10):1165-72.
- (120) Host NB, Aldershvile J, Horslev-Petersen K, Hoyer S, Haunso S.
Serum aminoterminal propeptide of type III procollagen after cardiac transplantation and the effect of rejection.
The American Journal of Cardiology 1996;78:1406-10.
- (121) Nath DS, Tiriveedhi V, Basha HI, Phelan D, Moazami N, Ewald GA, Mohanakumar T.
A role for antibodies to human leukocyte antigens, Collagen-V, and K-L1-Tubulin in antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy.
Transplantation 2011;91(9):1036-43.
- (122) Kfoury AG, Stehlik J, Renlund DG, Snow G, Seaman JT, Gilbert EM, Stringham JS, Long JW, Hammond ME.
Impact of repetitive episodes of antibody-mediated or cellular rejection on cardiovascular mortality in cardiac transplant recipients: defining rejection patterns.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2006;25(11):1277-82.

- (123) Michaels PJ, Espejo ML, Kobashigawa J, Alejos JC, Burch C, Takemoto S, Reed EF, Fishbein MC.
Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2003;22(1):58-69.
- (124) Mohacsi PF, Martinelli MF, Banz YF, Boesch C.
The clinical relevance of antibody-mediated rejection: a new era of heart transplantation.
European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 2012;42(6):1047-9.
- (125) Karch SB, Billingham ME.
Cyclosporine induced myocardial fibrosis: a unique controlled case report.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 1985;4(2):210-2.
- (126) Stovin PG, English TA.
Effects of cyclosporine on the transplanted human heart.
The Journal of Heart Transplantation 1987;6(3):180-5.
- (127) Greenberg ML, Uretsky BF, Reddy PS, Bernstein RL, Griffith BP, Hardesty RL, Thompson ME, Bahnson HT.
Long-term hemodynamic follow-up of cardiac transplant recipients treated with cyclosporine and prednisone.
Circulation 1985;71:487-94.
- (128) Imakita M, Tazelaar HD, Rowan RA, Masek MA, Billingham ME.
Myocyte hypertrophy in the transplanted heart. A morphometric analysis.
Transplantation 1987;43(6):839-42.
- (129) Valantine HA, Zuckermann A.
From clinical trials to clinical practice: an overview of Certican (Everolimus) in heart transplantation.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2005;24(4 Supplement): S185-90, discussion S210-1.
- (130) Lehmkuhl HB, Mai D, Dandel M, Knosalla C, Hiemann NE, Grauhan O, Huebler M, Pasic M, Weng Y, Meyer R, Rothenburger M, Hummel M, Hetzer R.
Observational study with everolimus (Certican) in combination with low-dose cyclosporine in de novo heart transplant recipients.
The Journal of Heart and Lung Transplantation 2007;26(7):700-4.
- (131) Eisen HJ, Tuzcu M, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppler HA, Starling RC, Sørensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH, Bernhardt P.

Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients.

New England Journal of Medicine 2003;349:847-58.

- (132) Eisen HJ.

Late myocardial remodeling in cardiac allografts: challenges and opportunities.

The Journal of Heart and Lung Transplantation 2009;28:1127-8.

- (133) Zhuang YF, Corone-Alden S, Duval AM, Benvenuti C, Albo C, Deleuze P, Loisanche D, Benhayem N, Heudes D, Nicoletti A.

Right ventricular late filling termination time and its relation to interstitial collagen content in early transplanted heart: a color M-mode Doppler digital analysis.

The Journal of Heart and Lung Transplantation 1995;14(5):846-55.

- (134) Goland S, Siegel RJ, Burton K, De Robertis MA, Rafique A, Schwarz E, Zivari K, Mirocha J, Trento A, Czer LS.

Changes in left and right ventricular function of donor hearts during the first year after heart transplantation.

Heart 2011;97:1681-6.

- (135) Yamani MH, Haji SA, Starling RC, Tuzcu EM, Ratliff NB, Cook DJ, Abdo A, Crowe T, Secic M, McCarthy P, Young JB.

Myocardial ischemic-fibrotic injury after human heart transplantation is associated with increased progression of vasculopathy, decreased cellular rejection and poor long-term outcome.

Journal of the American College of Cardiology 2002;39(6):970-7.

Anhang

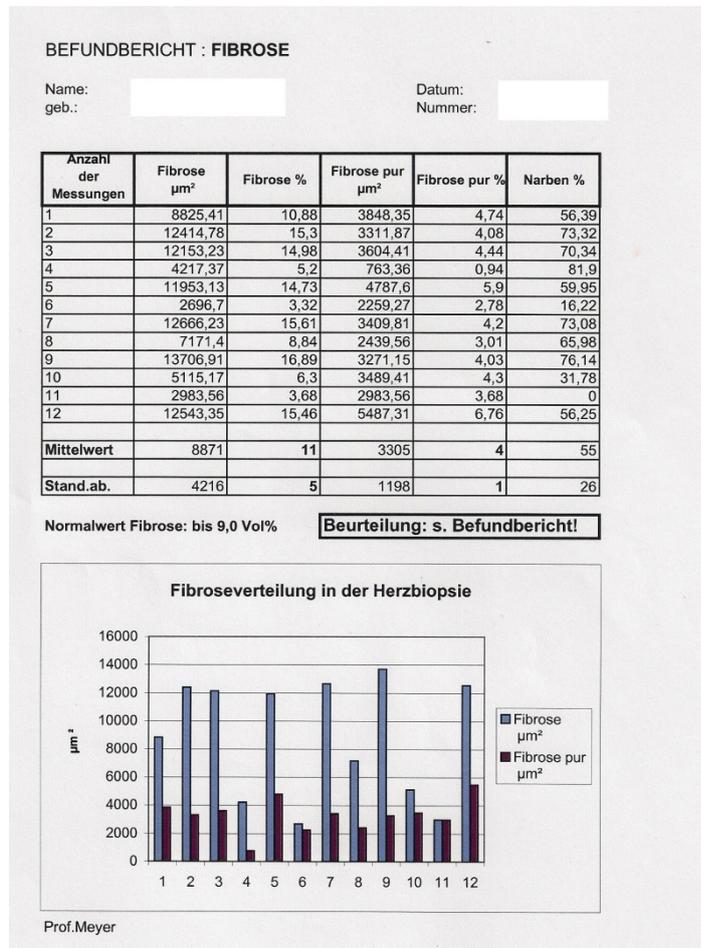


Abbildung A 1: Befundbericht für die histomorphometrische Vermessung von Fibrose

BEFUNDBERICHT : Kollagen III

Name: Datum:
geb.: Nummer:
verst.: Art FU:

Anzahl der Messungen	Kollagen III in μm^2	Kollagen III in %
1	12806,73	15,78
2	14662,67	18,07
3	24863,67	30,64
4	21921,01	27,02
5	21364,35	26,33
6	18325,77	22,59
7	13736,62	16,93
8	12556,37	15,48
9	17877,33	22,03
10	17294,45	21,32
11	20857,95	25,71
12	25683,88	31,66
Mittelwert	18496	23
Stand.ab.	4519	6

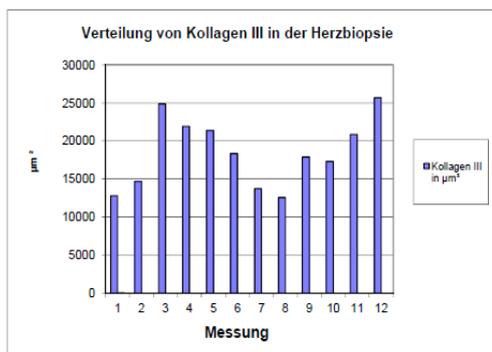


Abbildung A 2: Befundbericht für die histomorphometrische Vermessung von Kollagen Typ III

BEFUNDBERICHT : Kollagen IV

Name:
geb.:
verst.:

Datum:
Nummer:
Art FU:

Anzahl der Messungen	Kollagen IV in μm^2	Kollagen IV in %
1	1561,2	1,92
2	4639,58	5,72
3	6045,99	7,45
4	3098,93	3,82
5	3094,16	3,81
6	5047,12	6,22
7	2920,1	3,6
8	1286,82	1,59
9	4215,9	5,2
10	3027,94	3,73
11	1960,67	2,42
12	843,69	1,04
Mittelwert	3145,18	3,88
Stand.ab.	1599,53	1,97

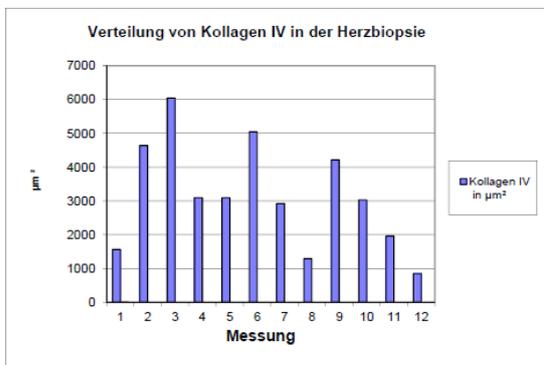


Abbildung A 3: Befundbericht für die histomorphometrische Vermessung von Kollagen Typ IV

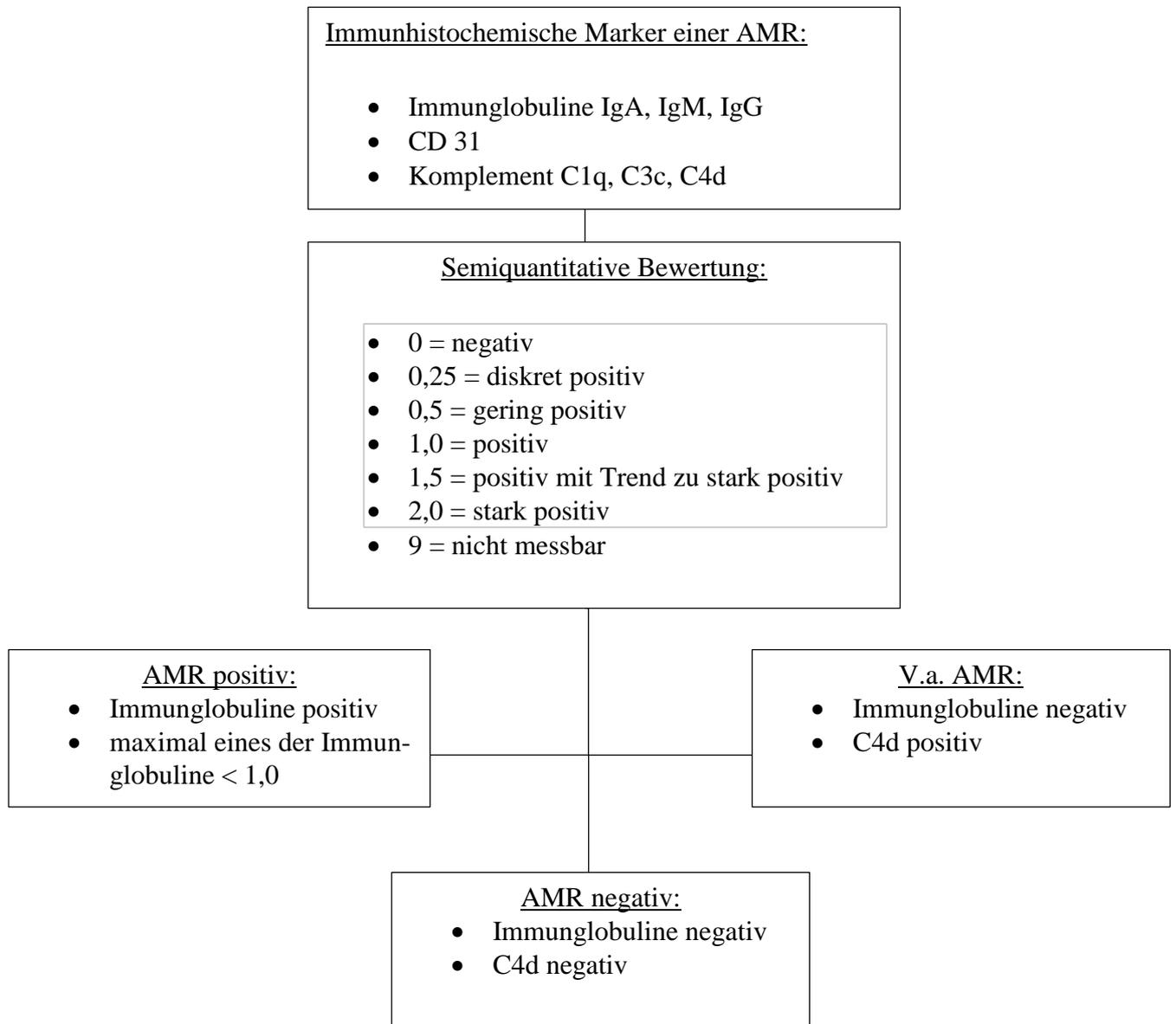
Tabelle A 1: Klassifizierung der akuten zellulären Rejektion gemäß ISHLT

<i>Grad</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>ISHLT Grad Stand 2004*</i>
0	keine Hinweiszeichen für eine akute Abstoßungsreaktion bzw. Schäden an Myozyten; wird auch bei nicht eindeutiger Rejektion vergeben	0
01A**	minimal beginnende Abstoßung sowie begleitende perivasale und/oder interstitielle Lymphozyteninfiltrate	nicht vergeben
<i>1 - mild</i> 1A	fokale perivaskuläre oder interstitielle Lymphozyteninfiltrate ohne begleitende myozytäre Schäden in mindestens einer Probe	1R – mild
1B	Ausmaß diffuser als bei Grad 1A	
2	begrenzter Fokus eines Lymphozyteninfiltrates (mit oder ohne begleitende Eosinophilie) mit architektonischen Läsionen bzw. Myozytenschäden	
<i>3 – moderat</i> 3A	multifokale Infiltrate aus Lymphozyten und Eosinophilen in mindestens einer Probe	2R – moderat
3B	diffuse Entzündungsinfiltrate aus Lymphozyten, Eosinophilen und ggf. Neutrophilen in mehreren Proben; begleitende myozytäre Läsionen	
4	diffuses Entzündungsinfiltrat aus Lymphozyten, Eosinophilen und Neutrophilen; deutliche myozytäre Läsionen bis hin zu Nekrosen; begleitende Ödeme, Hämorrhagien und Vaskulitiden	3R –schwer

* Die entnommenen EMB wurden in die Grade 0 bis 4 anhand der alten ISHLT-Klassifizierung von 1990 eingeteilt. Im Jahr 2004 wurde das Graduierungssystem durch die ISHLT überarbeitet und verschlankt. Die neuen Gradeinteilungen sind daher zur Vollständigkeit in der letzten Spalte der Tabelle aufgeführt.

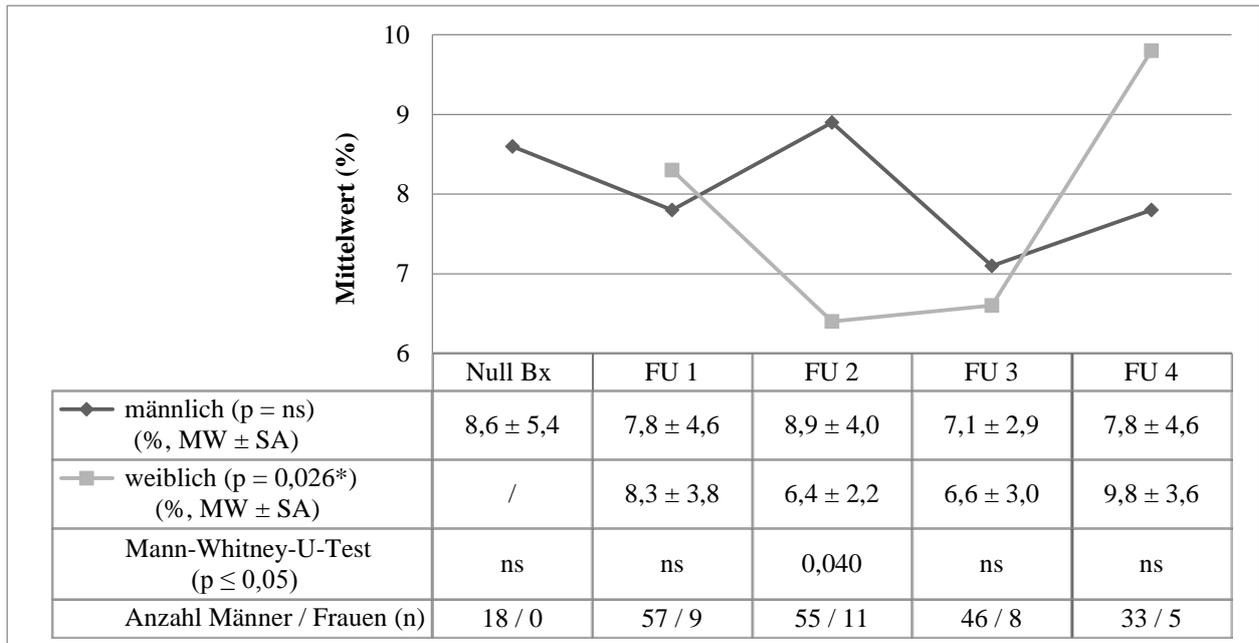
** Der Abstoßungsgrad 01A ist eine DHZB-spezifische Erweiterung durch Prof. Dr. sc med. R. Meyer.

DHZB – Deutsches Herzzentrum Berlin; ggf. – gegebenenfalls; ISHLT – International Society of Heart and Lung Transplantation



AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; Cx – Komplementfaktor x; Ig X – Immunglobulin X

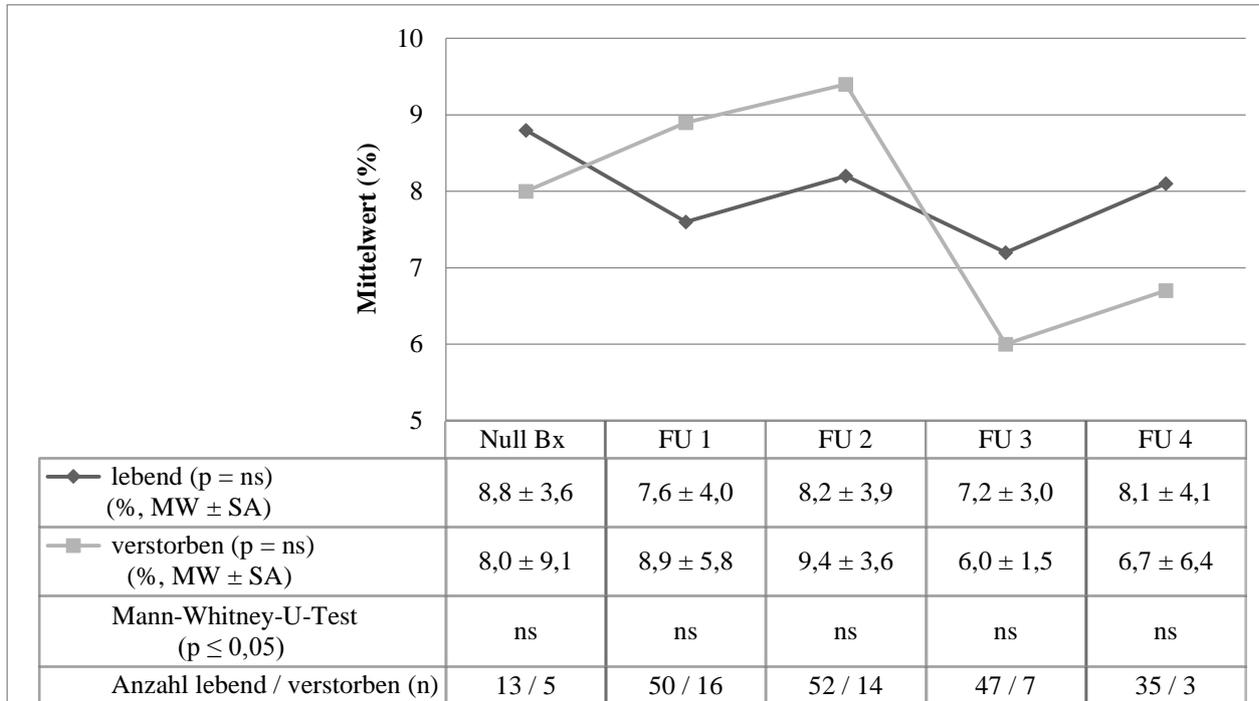
Abbildung A 4: Diagnose einer antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion im Deutschen Herzzentrum Berlin



* für den Zeitraum nach HTx

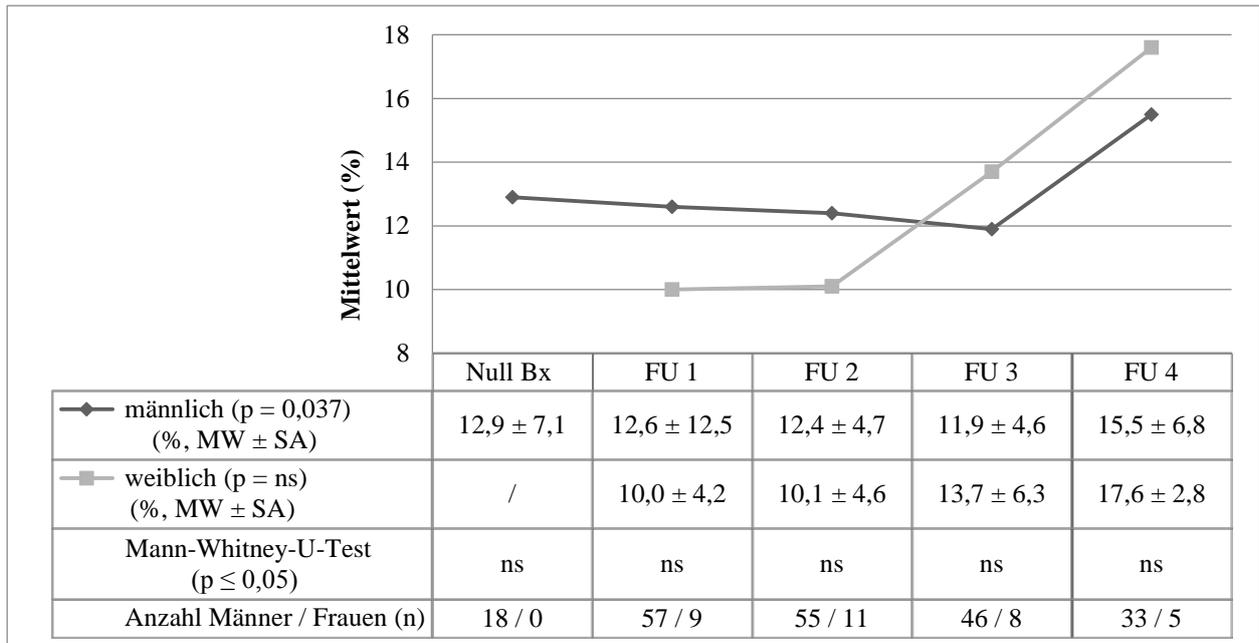
FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung A 5: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in Abhängigkeit vom Geschlecht in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU4)



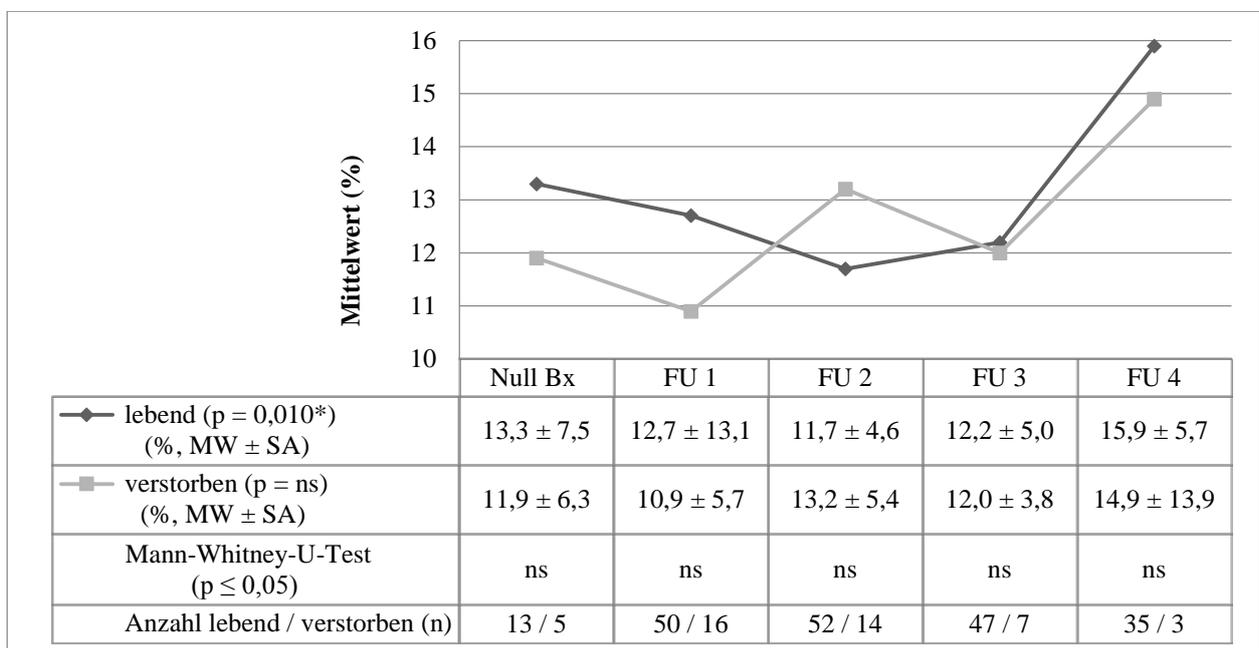
FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung A 6: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in Abhängigkeit vom Überlebensstatus in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)



FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

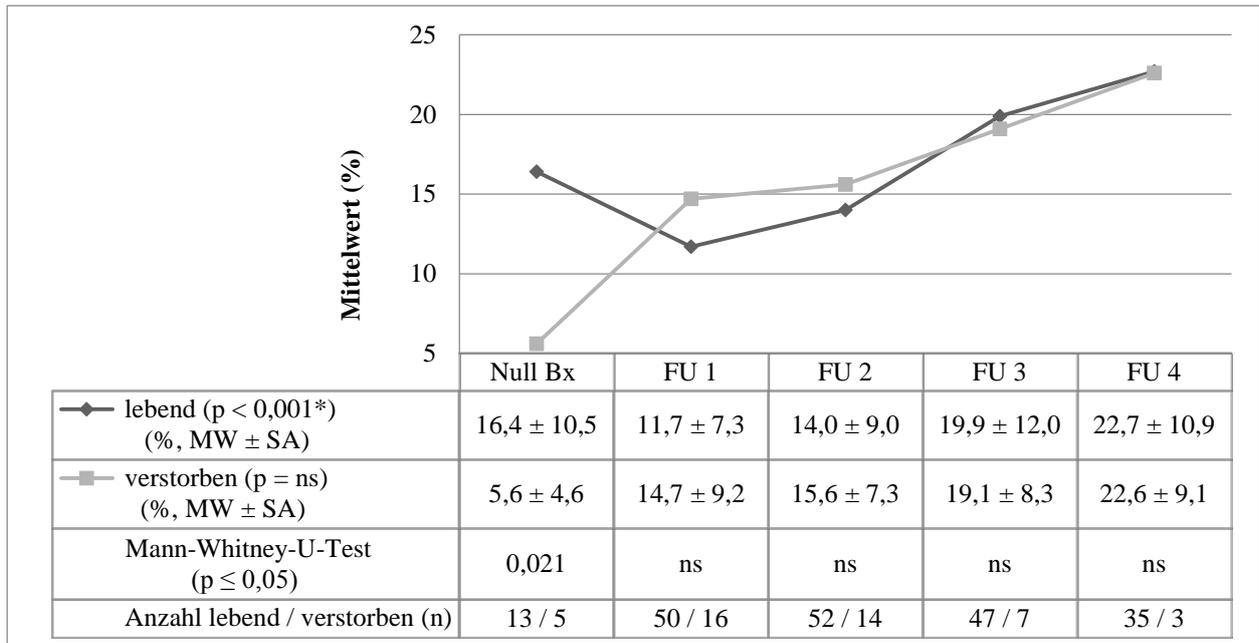
Abbildung A 7: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in Abhängigkeit vom Geschlecht in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)



* für den Zeitraum nach HTx

FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

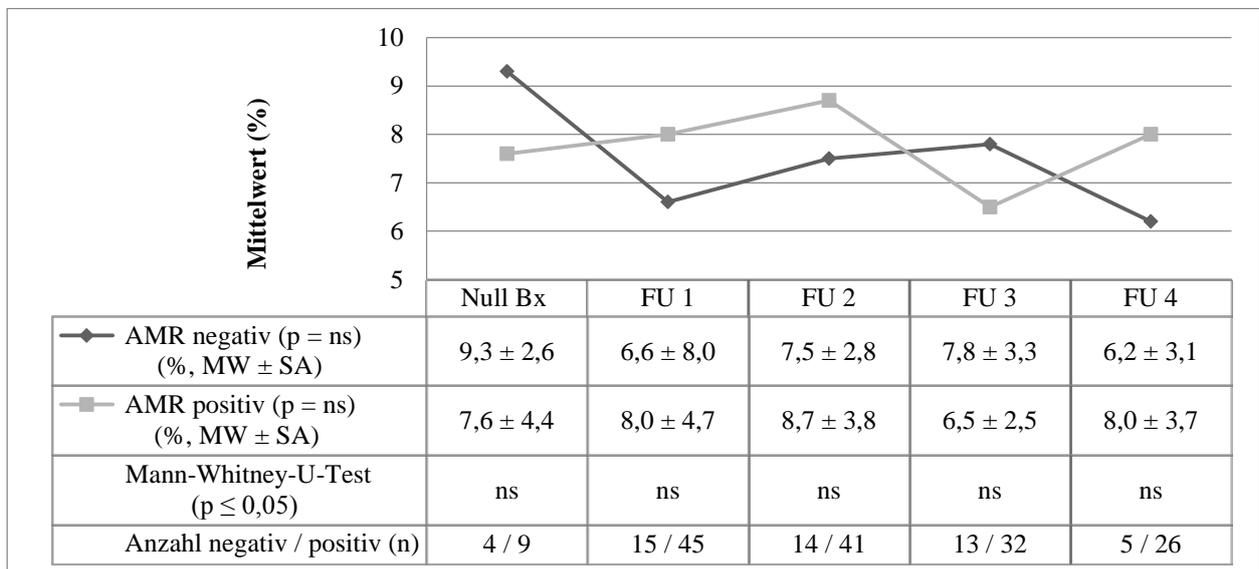
Abbildung A 8: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in Abhängigkeit vom Überlebensstatus in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)



* für den Zeitraum nach HTx

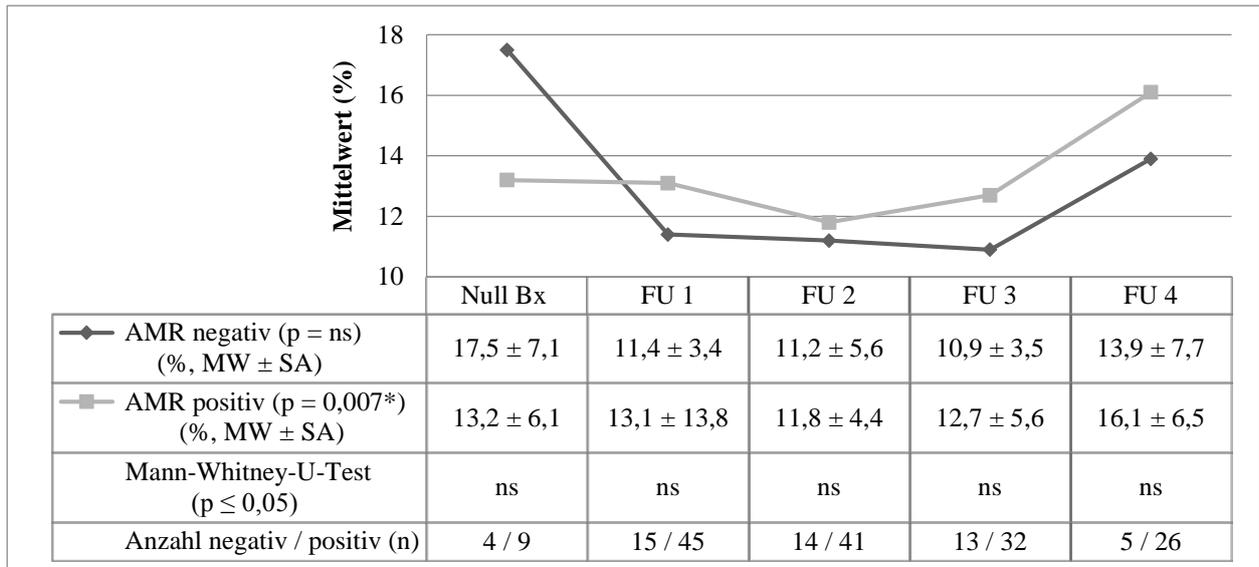
FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung A 9: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in Abhängigkeit vom Überlebensstatus in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4)



AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

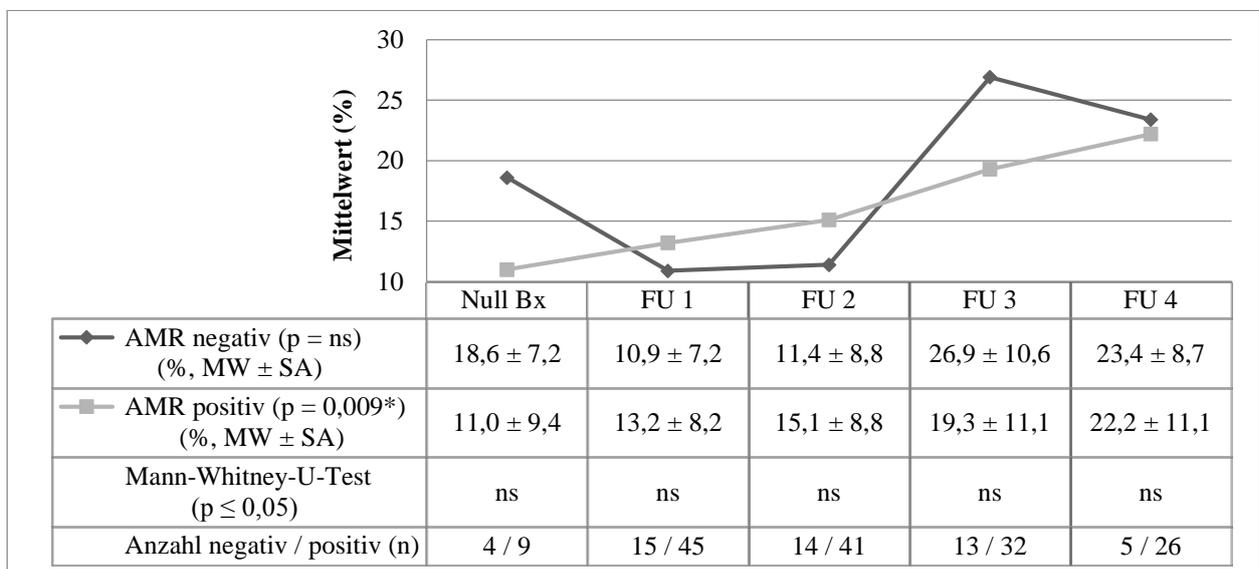
Abbildung A 10: mittlerer Gehalt von Gesamtfibrose (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4) in Abhängigkeit von einer AMR innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx



* für den Zeitraum nach HTx

AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung A 11: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ III (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4) in Abhängigkeit von einer AMR innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx



* für den Zeitraum nach HTx

AMR – antikörpervermittelte Abstoßung; FU – Follow Up; HTx – Herztransplantation; MW – Mittelwert; n – Anzahl an Patienten; ns – nicht signifikant; Null Bx – Null Biopsie; p – Signifikanzniveau; % – Prozent; SA – Standardabweichung

Abbildung A 12: mittlerer Gehalt von Kollagen Typ IV (%) in fünf Jahren post HTx (Null Bx bis FU 4) in Abhängigkeit von einer AMR innerhalb der ersten 30 Tage nach HTx

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophie Barabasch (geb. Kretschmer), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleichende histomorphometrische Analyse des interstitiellen Herzgewebes 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.“

25.01.2016

Sophie Barabasch (geb. Kretschmer)

Lebenslauf

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

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

Publikationen

Vorträge und Poster mit publiziertem Abstract

Erstautorenschaft

Kretschmer S, Hiemann NE, Hetzer R, Meyer R.

Histomorphometric analysis of myocardial fibrosis after heart transplantation.

33rd Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation,

Montréal, Canada, 24.-27.04.2013.

Journal of Heart and Lung Transplantation 2013;32(4 Suppl):S263.

Kretschmer S, Hiemann NE, Hetzer R, Meyer R.

Histomorphometric analysis of myocardial fibrosis after heart transplantation.

97. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.,

Heidelberg, 23.-26.05.2013.

Der Pathologe 2013;34(Suppl 1):111.

Kretschmer S, Wellnhofer E, Kandolf R, Klingel K, Christan C, Knosalla C, Lehmkuhl HB, Hetzer R, Meyer R, Hiemann NE.

Cardiotropic Viruses Trigger Antibody Mediated Rejection in Heart Transplantation Recipients.

31st Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation,

San Diego, CA, USA, 13.-16.4.2011.

Journal of Heart and Lung Transplantation 2011;30(Suppl 1):S227-8.

Kretschmer S, Wellnhofer E, Kandolf R, Klingel K, Christan C, Knosalla C, Lehmkuhl HB, Hetzer R, Meyer R, Hiemann NE.

Cardiotropic viruses trigger antibody mediated rejection in heart transplantation recipients (Poster).

77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 27.-30.4.2011.

Clinical Research in Cardiology 2011;100(Suppl 1):P1602.

Kretschmer S, Wellnhofer E, Kandolf R, Klingel K, Christan C, Knosalla C, Lehmkuhl HB, Hetzer R, Meyer R, Hiemann NE.

Cardiotropic viruses trigger antibody mediated rejection in heart transplantation recipients (Poster).

21st World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, Berlin, 12.-15.6.2011.

Heart Surgery Forum 2011;14(Suppl 2):S103.

Coautorenschaft

Hiemann NE, Wellnhofer E, Christan C, Kretschmer S, Meyer R, Valantine H, Hetzer R. Non-stenotic coronary vasculopathy is associated with reduced survival after heart transplantation.

42nd Annual Meeting of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. In Kooperation mit der Österreichischen Gesellschaft für Thorax- und Herzchirurgie, Freiburg, 17.-20.02.2013.

Thoracic and Cardiovascular Surgeon 2013;61(Suppl 1):S49.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Christan C, Kretschmer S, Meyer R, Valantine H, Hetzer R, Khush KK.

New model to assess prognosis of transplant vasculopathy following cardiac transplantation. 33rd Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation,

Montréal, Canada, 24.-27.04.2013.

Journal of Heart and Lung Transplantation 2013;32(4 Suppl):S27.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Christan C, Kretschmer S, Meyer R, Valantine H, Hetzer R, Khush KK.

Non-stenotic coronary vasculopathy is associated with reduced survival after heart transplantation.

32nd Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, Prague, Czech Republic, 18.-21.4.2012.

Journal of Heart and Lung Transplantation 2012;31(4 Suppl):S122.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Kretschmer S, Christan C, Hetzer R, Meyer R.

Antibody-Mediated Rejection is Associated with Microvasculopathy after Heart Transplantation (Poster).

Scientific Sessions of the American Heart Association 2012,

Los Angeles, CA, USA, 03.-07.11.2012.

Circulation 2012;126(21 Suppl):A15745.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Kretschmer S, Christan C, Lehmkuhl H, Knosalla C, Hetzer R, Meyer R.

Antibody-mediated rejection is associated with microvasculopathy after heart transplantation (Poster).

96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.,

Berlin, 31.05.-01.06.2012.

Der Pathologe 2012;33(Suppl 1):121.

Christan C, Wellnhofer E, Kretschmer S, Meyer R, Lehmkuhl HB, Valantine HA, Khush K, Hetzer R, Hiemann NE.

Prognostic value of the ISHLT and German working formulations for transplant vasculopathy in survival after heart transplantation (Poster).

77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 27.-30.4.2011.

Clinical Research in Cardiology 2011;100(Suppl 1):P718.

Christan C, Wellnhofer E, Kretschmer S, Meyer R, Lehmkuhl HB, Valantine HA, Khush KK, Hetzer R, Hiemann NE.

Prognostic Value of the ISHLT and DGK Working Formulations for Transplant Vasculopathy in Survival after Heart Transplantation (Poster).

31st Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation,

San Diego, CA, USA, 13.-16.4.2011.

The Journal of Heart and Lung Transplantation 2011;30(Suppl 1):S177.

Christan C, Wellnhofer E, Kretschmer S, Meyer R, Lehmkuhl HB, Valantine HA, Kush, Hetzer R, Hiemann NE.

Prognostic value of the ISHLT and German formulations for transplant vasculopathy in survival after heart transplantation.

21st World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons,
Berlin, 12.-15.6.2011.

Heart Surgery Forum 2011;14(Suppl 2):S67.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Kretschmer S, Christan C, Lehmkuhl H, Knosalla C, Hetzer R, Meyer R.

Antibody-Mediated Rejection Is Associated with Microvasculopathy after Heart Transplantation.

31st Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation,

San Diego, CA, USA, 13.-16.4.2011.

Journal of Heart and Lung Transplantation 2011;30(Suppl 1):S227.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Kretschmer S, Christan C, Lehmkuhl H, Knosalla C, Hetzer R, Meyer R.

Effect of Gender on Everolimus Treatment for Antibody-Mediated Rejection after Heart Transplantation.

31st Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation,

San Diego, CA, USA, 13.-16.4.2011.

Journal of Heart and Lung Transplantation 2011;30(Suppl 1):S174.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Kretschmer S, Christan C, Lehmkuhl H, Knosalla C, Hetzer R, Meyer R.

Antibody-mediated rejection is associated with microvasculopathy after heart transplantation.

21st World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons,
Berlin, 12.-15.6.2011.

Heart Surgery Forum 2011;14(Suppl 2):S39.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Kretschmer S, Christan C, Lehmkuhl H, Knosalla C, Hetzer R, Meyer R.

Effect of gender on Everolimus treatment for antibody-mediated rejection after heart transplantation.

21st World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, Berlin, 12.-15.6.2011.

Heart Surgery Forum 2011;14(Suppl 2):S87.

Hiemann NE, Wellnhofer E, Kretschmer S, Christan C, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R, Meyer R.

Antibody-mediated rejection is associated with microvasculopathy after heart transplantation (Poster).

77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 27.-30.4.2011.

Clinical Research in Cardiology 2011;100(Suppl 1):P1614.

Danksagung

Bei Frau PD Dr. med. Hiemann möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas und die engagierte Betreuung bis zur Beendigung ihres Arbeitsverhältnisses im Deutschen Herzzentrum Berlin bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. sc med. Meyer für die fachliche Beratung insbesondere in der Endphase der Erarbeitung der Dissertationsschrift.

Mein weiterer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen des Arbeitsbereiches Herzpathologie im Deutschen Herzzentrum Berlin und Frau Zoschke für die technische Unterstützung im Rahmen der Untersuchung. Bei Frau Rahmstorf bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Organisation der Messdurchführung. Frau Benhennour möchte ich für ihre Unterstützung bei der Literaturrecherche danken.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. R. Hetzer danke ich für die wohlwollende Kenntnisnahme und die Möglichkeit, das Untersuchungsmaterial sowie die Arbeitsgeräte der Herzpathologie nutzen zu dürfen.

Abschließend möchte ich meinem lieben Norman sowie meinen Eltern meinen tiefen Dank für die ausdauernde moralische Unterstützung und motivierenden Worte aussprechen.