

2. METHODEN

2.1. Patienten und allgemeine Angaben

2.1.1. Patienten

Insgesamt sind 49 Patienten mit linksventrikulärer Funktionsstörung (globale Ejektionsfraktion <50%) bzw. lokoregionaler LV-Funktionsstörung (global normale Ejektionsfraktion) in einem Zeitraum von 14 Monaten (Juni '95-August '96) im Rahmen eines stationären Aufenthaltes einmalig herzmuskelbiopsiert worden. Die Indikation zur Entnahme von rechtsventrikulären Biopsien wurde nach Ausschluß von KHK, Cor hypertensivum, Vitien und sekundären CM zur weiteren Abklärung der LV-Funktionsstörung gestellt. Während des hierzu notwendigen stationären Aufenthaltes wurden die Patienten sorgfältig zu ihren Beschwerden befragt und klinisch umfassend untersucht (Zeitpunkt eins = ZP 1). Durch eine ambulante Nachuntersuchung (Zeitpunkt zwei = ZP 2) oder Erkundigungen bei den entsprechenden Hausärzten konnten 39 dieser Patienten nach zwei bis drei Jahren erneut überprüft und die Untersuchungsergebnisse mit den Vorbefunden in Bezug gesetzt werden. Hierbei sollten keine weiteren Biopsien entnommen werden, sondern eine ausführliche klinische Inspektion einschließlich Anamnese und einiger klinischer Tests durchgeführt werden. Die retrospektiv erhobene Anamnese und Untersuchungsergebnisse wurden in einem standardisierten Protokoll dokumentiert.

2.1.2. Gruppeneinteilung

Anhand der Befunde von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden (siehe 2.4.8.2. Molekularbiologische Techniken) wurden die Patienten in vier Gruppen eingeteilt. In Abhängigkeit der Nachweisbarkeit des Enterovirus in der Myokardbiopsie wurde eine Gruppe von virusnegativen (Gruppe A, n= 29) und viruspositiven (Gruppe B/C, n= 20) Patienten unterschieden. Unter Verwendung noch sensitiverer molekularbiologischer Verfahren ließ sich die viruspositive Gruppe B/C in Abhängigkeit der nachweisbaren Virusaktivität in zwei weitere Untergruppen unterteilen {Gruppe B (n= 9) und C (n= 11)}. Die genaue Gruppeneinteilung wird in dem nachfolgenden molekularbiologischen Teil beschrieben.

2.2. Anamnese

Neben der erhobenen Familien- und Sozialanamnese wurde versucht, den Krankheitsverlauf der Patienten, die Ausprägung ihrer kardialen Symptomatik und körperlichen Belastbarkeit herauszuarbeiten. Besondere Aufmerksamkeit galt vor allem den Symptomen und der Belastbarkeit der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie und der Nachuntersuchung. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit richtete sich auf den Verlauf der verschiedenen Gruppen und nicht auf den Verlauf einzelner Patienten. Ferner wurden nur die Ergebnisse derjenigen Patienten berücksichtigt, die an beiden Untersuchungsterminen möglichst vollständig komplettiert werden konnten. Diese Personen wurden als Subgruppen in ihrer Entwicklung über den Zeitraum von zwei bis drei Jahren analysiert. Da der Anamnesebeginn von Patient zu Patient erheblich variierte, wurde ein annähernd gleiches Zeitfenster (vom Biopsiezeitpunkt bis zur Nachuntersuchung) gewählt, um den Krankheitsverlauf und die Symptomentwicklung der Patientengruppen verfolgen zu können.

2.3. Klinisch-körperliche Untersuchung

Es wurde ein internistischer Status mit Betonung der Herz- Kreislauffunktionen angefertigt. Durch einen erfahrenen Kardiologen wurden die Patienten anhand ihrer klinischen Belastbarkeit und des Untersuchungsbefundes der New York Heart Association - Klassifizierung (NYHA) entsprechend in vier Stadien eingeteilt [23]. Neben der Herz-Lungenauskultation, der indirekten Blutdruckmessung nach Riva-Rocci und der Beurteilung der peripheren Pulse wurde auch eine orientierende neurologische Untersuchung durchgeführt.

2.4. Technische Untersuchungen

Zum Biopsiezeitpunkt wurde neben der Krankenanamnese und der körperlichen Inspektion einige klinische Tests vorgenommen. Diese beinhalteten EKG in Ruhe, Echokardiogramm in Ruhe, RNV in Ruhe und Belastung, Links-, Rechtsherzkatheter und serologische Laboruntersuchungen. Da die spätere Nachuntersuchung nur in einem kleineren Rahmen

durchgeführt werden konnte, wurden die Patienten neben erhobener Anamnese und körperlichem Status einer echokardiographischen Untersuchung, einem EKG und RNV in Ruhe und unter Belastung zugeführt. Durch diese klinischen Untersuchungen sollten Erkrankungen wie KHK, Cor hypertensivum, Vitien und sekundäre Kardiomyopathien als Auslöser einer eingeschränkten Herzfunktion ausgeschlossen werden.

2.4.1. Laboruntersuchungen

Kontrolliert wurde der übliche internistische Laborstatus unter besonderer Beachtung der Entzündungszeichen (Blutsenkungsgeschwindigkeit, C-reaktives Protein, Leukozyten) und Myokardnekrosezeichen (Troponin, Creatinkinase, Transaminasen, Laktatdehydrogenase). Des Weiteren erfolgte die Messung der Schilddrüsenparameter (Thyrotropin, Trijodthyronin, Thyroxin), der Elektrolyte, der Harnretentionswerte, verschiedener Enzyme und Proteine, des Blutzuckers und der Gerinnung. Anhand dieser Parameter sollte die Frage einer entzündlichen Aktivität, aber auch die Möglichkeit eines bestehenden Diabetes mellitus oder einer extrakardialen Schädigung durch eine Schilddrüsenerkrankung erörtert werden. Sämtliche Laboruntersuchungen wurden wegen inkompletter Angaben lediglich zum Biopsiezeitpunkt dokumentiert.

2.4.2. Elektrokardiogramm in Ruhe

In üblicher Weise wurde ein 12 Kanal-Standard-EKG mit den Extremitätenableitungen nach Einthoven und Goldberger und Brustwandableitungen nach Wilson geschrieben [82]. Mit Hilfe des EKGs konnten Aussagen über die Lage der elektrischen Herzachse (Lagety), Herzfrequenz, Herzrhythmus, Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen gemacht werden. Ferner konnten so, falls vorhanden, Repolarisationsstörungen und Zeichen der Links- oder Rechtsherzbelastung erkannt werden [83]. Ein positiver Sokolow-Lyon-Index in den Brustwandableitungen kann auf eine chronische Links- und oder Rechtsherzbelastung des Patienten hinweisen [97].

2.4.3. Elektrokardiogramm unter Belastung

Auch hier wurde ein 12-Kanal-Standard-EKG mit den oben genannten Ableitungen aufgezeichnet. In sitzender Position wurden die Patienten auf einem Fahrradergometer mit 50 Watt beginnend belastet. Je nach Leistungsfähigkeit oder Angaben von Beschwerden wurde die Belastung um 25 Watt in zwei Minutenabständen gesteigert und durch eine EKG-Mitschrift und Blutdruckmessung dokumentiert. Die Blutdruckmessung erfolgte auch hier indirekt nach Riva-Rocci und wurde in mmHg angegeben. Die Belastungsfähigkeit wurde in Watt dokumentiert, die Belastungsausdauer in Minuten. Die Herzfrequenzen wurden in QRS/min gezählt. Als Ruheherzfrequenz wurde die Ausgangsherzfrequenz vor Beginn der Belastung definiert. Zur Belastungsherzfrequenz wurde die Herzfrequenz erklärt, welche unter maximaler Belastung auftrat. Dem entsprechend wurden auch die Ruhe- und Belastungsblutdrucke definiert. Horizontale oder deszendierende ST-Streckensenkungen $>0,15\text{mV}$ wurden als Repolarisationsstörungen bewertet. Nach den gängigen Abbruchskriterien eines Belastungs-EKGs wurde bei Auftreten von Herzrhythmusstörungen, EKG-Veränderungen, extremen Blutdruck- oder Herzfrequenzschwankungen, Angina pectoris, Dyspnoe oder muskulären Beinbeschwerden, die Belastung abgebrochen [33].

2.4.4. Echokardiographie

Durch diese nicht invasive Methode konnte man die anatomischen Verhältnisse des Herzens und die Herzfunktion beurteilen. Geprüft wurden hiermit die Größenverhältnisse der Herzhöhlen, die globale LV-Funktion sowie mögliche Wandbewegungsstörungen. Des Weiteren wurden die Herzwanddicken (insbesondere des linken Ventrikels), die Beweglichkeit und Struktur der Herzklappen, die Frage intrakardialer Fehlstrukturen (wie Ventrikelthromben und Tumoren) und echofreier Zonen im Perikardbereich (Ergußbildungen) beurteilt. Die Herzgröße ließ sich mit Bestimmung des enddiastolischen und -systolischen Durchmessers des linken Ventrikels abschätzen, dem sogenannten linksventrikulären enddiastolischen Diameter und linksventrikulären endsystolischen Diameter. Beide wurden in Millimetern (mm) angegeben. Anhand dieser Parameter ließ sich das Fractional Shortening berechnen, welches ein Maß für die globale LV-Funktion darstellt und in Prozent (%)

angegeben wurde (Formel, siehe Anhang). Die intrakardialen Flußverhältnisse und Fließgeschwindigkeiten wurden mit dem Farbdoppler beurteilt (per definitionem ist das auf den Schallkopf zufließende Blut rot kodiert und das vom Schallkopf wegfließende blau). Ventildefekte an den Herzklappen (Insuffizienzen und Stenosen) ließen sich auf diese Weise darstellen.

2.4.5. Radionuklidventrikulographie

Es wurde eine RNV in Ruhe durchgeführt und wenn es der Zustand der Patienten zuließ, auch unter Belastung. Die mit Technetium (^{99m}TC) markierten Erythrozyten wurden aus der Left-Anterior-Oblique-Position in einem Winkel von 30° - 45° mit einer Gammakamera EKG-getriggert aufgenommen. Die beiden Ventrikel des Herzens ließen sich in dieser Position besonders gut darstellen, da sie sich hier nicht überlagerten. Gemittelt über 600 Herzaktionen (gemessen von R zu R = RR-Zyklus) wurden 16 Bilder festgehalten und zu einem zusammengesetzt (aufeinander projiziert). Dieses stellte alle Volumenphasen einer Herzaktion dar. Mit dieser Untersuchung ließ sich neben der Belastungsfähigkeit des Patienten in Watt (W), der Belastungsdauer in Minuten (min) und der Ejektionsfraktion in Prozent (%), das enddiastolische Volumen des linken Ventrikels in Millilitern (ml) ermitteln. Des Weiteren konnten Wandbeweglichkeitsstörungen, regionale und globale Kontraktilitätsstörungen erfaßt werden. Die Ejektionsfraktion entspricht der Blutmenge, die der linke Ventrikel während der Kontraktion auswirft. Das enddiastolische Volumen ist das Volumen, welches sich am Ende der Diastole im linken Ventrikel befindet. Sowohl die Ejektionsfraktion als auch die Ventrikelvolumina wurden in Ausgangslage und unter Belastung bestimmt, sofern es die Belastbarkeit des Patienten zuließ. Zur Beurteilung der kardialen Leistungsreserve wurden die Ruhe- und Belastungs-Ejektionsfraktionen miteinander verglichen und der prozentuale Anstieg der Ejektionsfraktion unter Belastung bewertet. Eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion wurde bei einem Ejektionsfraktions-Anstieg von weniger als fünf Prozent während der Belastung angenommen. Dem Belastungs-EKG entsprechend erfolgte die Festlegung der Ruheherzfrequenz und Belastungsherzfrequenz während der RNV-Untersuchung.

2.4.6. Linksherzkatheter

Über eine arterielle Punktion der Femoralarterie wurden die linken Herzhöhlen mit einem Pigtailkatheter und die Koronargefäßabgänge mit einem Judkinskatheter sondiert. Anschließend konnte unter Röntgendurchleuchtung Kontrastmittel über den Katheter zur Darstellung des linken Herzens (Lävographie) und der Koronargefäße (Koronarangiographie) gegeben werden. Darüber hinaus erfolgte eine „blutige“ Druckmessung in der Aorta und im linken Ventrikel in üblicher Weise. In der Aorta wurde der systolische systemische Blutdruck gemessen. Im linken Ventrikel wurde der ventrikuläre enddiastolische Druck erfaßt und in mmHg angegeben. Des Weiteren wurde in dieser Untersuchung planimetrisch die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bestimmt. Anhand dieser Untersuchungstechniken konnte eine entscheidende Aussage zur Frage des kardialen Grundleidens (z.B. Ausschluß von KHK) sowie zum Funktionszustand des Herzens getroffen werden. Überdies konnten Ventildefekte an den Herzklappen und Kontraktilitätsstörungen des linksventrikulären Myokards diagnostiziert werden.

2.4.7. Rechtsherzkatheter

Dieses Verfahren dient der transvenösen Sondierung der rechten Herzhälfte. Mittels der Seldinger Technik erfolgte die transkutane Punktion der Vena femoralis oder Vena jugularis. Bei dieser Technik wurde durch eine liegende Kanüle eine elastische Führungssonde in das Gefäß eingeführt, dann die Kanüle entfernt und unter Röntgenkontrolle über die Führungssonde ein röntgenpositiver Katheter in das Gefäßsystem vorgeschoben. Durch einen aufblasbaren Ballon an der Katheterspitze wurde der Katheter als Einschwemmkatheter mit dem Blutstrom herzwärts getragen. Anhand dieses Katheters konnte nach Entfernung der Führungssonde Kontrastmittel injiziert, Blut entnommen oder eine Druckmessung vorgenommen werden. Über diverse Lumina des Katheters war es möglich, verschiedene Drücke an unterschiedlichen Standorten des Niederdrucksystems zu messen: Auf Höhe des rechten Vorhofs wurde der mittlere rechtsatriale Druck erfaßt. Auf Höhe des rechten Ventrikels wurde der enddiastolische Druck des rechten Ventrikels gemessen. Direkt in der Pulmonalarterie wurde der arterielle systolische, diastolische und der mittlere Blutdruck

gemessen. Mittels eines kleinen aufgeblasenen Ballons an der Katheterspitze konnte man den pulmonal-kapillären Verschlußdruck messen, welcher näherungsweise dem linken Vorhofdruck entspricht. Diese hämodynamischen Informationen ließen sich durch die Entnahmemöglichkeit gemischt-venöser Blutgasanalysen aus der Arteria pulmonalis und die Messung des Herzzeitvolumens komplettieren. Das Herzzeitvolumen wurde nach der Thermodilutionsmethode über ein an der Katheterspitze angebrachtes Thermoelement bestimmt: Hierzu wurde eine $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlte physiologische Kochsalzlösung in den rechten Vorhof unter gleichzeitiger Messung der Temperaturänderung des Pulmonalblutes über einen Temperaturfühler an der Katheterspitze injiziert. Dieser Temperaturanstieg ließ sich als Kurve darstellen, aus deren Fläche man anhand des Fickschen Prinzips das Herzminutenvolumen berechnen konnte. Veranschaulichend läßt sich sagen: Je kleiner die Fläche unterhalb der Kurve war, desto schneller änderte sich die Temperatur und um so größer war das Herzzeitvolumen. Dividierte man das kardiale Schlagvolumen durch die Körperoberfläche des Patienten, so erhielt man den Schlagvolumenindex [51]. Die Entnahme der Herzmuskelbiopsien erfolgte mit einem Cordis-Biotom [99]. Von jedem Patienten wurden mindestens fünf rechtsventrikuläre Endomyokardbiopsien entnommen und anschließend der molekularbiologischen, histologischen und immunhistologischen Weiterverarbeitung zugeführt.

2.4.8. Molekularbiologie

2.4.8.1. Molekularbiologischer Hintergrund der Gruppeneinteilung

Durch molekularbiologische Untersuchungsmethoden, welche die enterovirale Aktivität im endomyokardialen Biopsat genau erfassen konnten, wurden die Patienten in vier Gruppen A, B/C, B und C eingeteilt. Nachdem eine erste Differenzierung der Patienten in eine Gruppe von virusnegativen (A) und viruspositiven (B/C) Patienten erfolgt war, wurde die viruspositive Gruppe in Abhängigkeit der nachweisbaren Virusaktivität in zwei weitere Untergruppen (B und C) eingeteilt:

In Gruppe A (n= 29) konnte kein Virusgenom im Endomyokard nachgewiesen werden. Sie bildete die Gruppe der virusnegativen Patienten.

Bei den Patienten der Gruppe B/C (n= 20) war enterovirales Genom in der Endomyokardbiopsie nachweisbar, sie formten den viruspositiven Patientenpool.

Die Untergruppen der Viruspositiven (Gruppe B, n= 9 und Gruppe C, n= 11) unterschieden sich hinsichtlich ihrer enteroviralen Aktivität in der Myokardbiopsie: Latente Viruspersistenz (Gruppe B) versus aktive Virusreplikation (Gruppe C).

Latent persistent war enterovirales Genom, wenn es im Myokard vorhanden war, sich aber nicht aktiv vermehrte. Molekularbiologisch entsprach dies dem Nachweis von einsträngiger RNA positiver Polarität (Gruppe B). Hat man nun aber Stränge negativer Polarität in dem Biopsat erfassen können, war dies der Beweis einer aktiv stattfindenden Replikation enteroviraler RNA, und die Patienten wurden der Gruppe C zugeordnet.

2.4.8.2. Molekularbiologische Techniken

Das enterovirale Genom konnte durch die Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in Kombination mit der Southern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden. Hierbei wurde die aus dem Biopsat gewonnene enterovirale Messenger-RNA (m-RNA) durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in DNA (Desoxiribonucleidacid) umgeschrieben. Mittels spezifischer enteroviraler DNA-Primer ließen sich durch die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kleinste Mengen dieser viralen DNA vervielfältigen (= enzymatische Amplifikation der DNA Sequenz). Die spezifischen DNA-Primer waren in der nicht kodierenden 5'Region des enteroviralen Genoms lokalisiert, da dieser Bereich durch eine hohe Homologie zwischen den verschiedenen Enteroviren gekennzeichnet ist. Des Weiteren gelang es unter Verwendung spezifischer Primer für die Reverse Transkription auch strangspezifisch enterovirale RNA nachzuweisen. Eine Steigerung der Sensitivität konnte durch die Southern Blot Hybridisierungstechnik erlangt werden, anhand derer die verschiedenen PCR-Produkte spezifisch nachgewiesen wurden [94]. Die hohe Sensitivität der beschriebenen Verfahren ermöglichte den Nachweis einer akuten und persistierenden viralen

kardialen Infektion. Wie eingangs schon beschrieben, erfolgte durch dieses spezielle virusaktivitätsspezifische Nachweisverfahren die Einteilung des Patientenkollektivs in die vier Gruppen (A, B/C, B und C).

2.4.9. Histologie

Die Endomyokardbiopsate wurden nach Anfertigung von Paraffinschnitten mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. In der histologischen Bewertung der Proben wurde die Präsenz von mononukleären Infiltraten beurteilt. Überdies wurden die Biopsien auf Texturstörungen (Fibrose, Hypertrophie und zelluläre Nekrose) untersucht. Entsprechend den Dallaskriterien [5] wurde bei Anwesenheit eines entzündlichen Infiltrats mit angrenzender Myozytolyse und fakultativem Vorhandensein von Fibrose eine aktive Myokarditis diagnostiziert. Die Konstellation entzündlicher Infiltrate mit fakultativer Fibrose und Fehlen von Nekrosen wurde als grenzwertige Myokarditis (Borderline-MC) befundet. Bei Fehlen von Infiltraten und Myozytolyse wurde eine MC ausgeschlossen.

2.4.10. Immunhistologie

Die in Tissue-Tek® (OCT-Compound; Sakura Finetek Europe B.V.; Zoeterwoude, Niederlande) eingebetteten und in Flüssigstickstoff schockgefrorenen Endomyokardbiopsien wurden im Kryotom (Jung CM3000, Leica GmbH, Bensheim, Deutschland) in 5µm dicke serielle Kryoschnitte (sechs pro Antikörperfeld) geschnitten und in kaltem Azeton fixiert. Die Gefrierschnitte wurden anhand von sensitiven monoklonalen Antikörpern gegen zahlreiche am Entzündungsprozeß beteiligte Zellen untersucht. Hierunter fielen die Lymphozyten-Antigene (CD3, CD4 und CD8), Makrophagen (27E10) und die Moleküle der MHC-Klasse I und II. Die zellulären Infiltrate wurden als statistisches Mittel pro Gesichtsfeld bei einer 400-fachen Vergrößerung gezählt (High Power Field = HPF; Auswahl der Gesichtsfelder im Mäander-Muster). Als positiv im Sinne einer intramyokardialen Entzündung wurden Biopsien $\geq 2,0$ CD3, CD4 und CD8- positiven Lymphozyten/ HPF bewertet, dies entsprach bei einer

400-fachen Vergrößerung ≥ 7 Zellen/ mm^2 . Die Anzahl der aktivierten Makrophagen wurde als pathologisch erhöht bewertet, wenn sie $\geq 1,5$ Zellen/ HPF war, dies entsprach ≥ 5 Zellen/ mm^2 . Umgekehrt galten die Endomyokardbiopsien als immunhistologisch unauffällig, sobald die Anzahl der aktivierten Lymphozyten 2,0 CD3, CD4 und CD8- positiven Lymphozyten/ HPF (< 7 Zellen/ mm^2) und die Anzahl der aktivierten Makrophagen 1,5 Zellen/ HPF (< 5 Zellen/ mm^2) unterschritt. Die Expression der MHC-Moleküle auf den interstitiellen Zellen und dem vaskulären Endothel wurde semiquantitativ evaluiert (Grad eins = normale, Grad zwei = verstärkte Immunreaktivität) [53, 56]. Aus der Kombination dieser Ergebnisse ergab sich dann die endgültige immunhistologische Diagnose. Hierbei wurde lediglich zwischen einem negativen und einem positiven Befund unterschieden.

2.5. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Statistiksoftware JMP (SAS Institut, Carry, USA; Version 3.2.6) vorgenommen. Die Meßergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Häufigkeit der Symptome in den verschiedenen Gruppen wurde in Perzentilen angegeben. Der statistische Vergleich der Ergebnisse in den beiden Patientengruppen (Virusnegative und Viruspositive) erfolgte durch den χ^2 -Test. Statistische Signifikanzen wurden bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Um statistische Signifikanzen im Vergleich von zwei oder mehr Patientengruppen zu ermitteln, wurde die Post-Hoc Analyse nach Tukey-Kramer einem Wilcoxon-/Mann-Whitney U-Test angeschlossen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden Gruppen wurden hierbei graphisch durch einander wenig berührende Kreise verdeutlicht oder durch den Schnittwinkel der aufeinander treffenden Tangenten, wenn dieser kleiner 90° betrug:

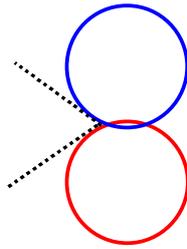


Abbildung 1: Wenn die Kreise sich nur wenig oder gar nicht überschneiden oder der Winkel des Schnittpunktes der Tangenten $<90^\circ$ war, war der Gruppenunterschied statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Überlagerten sich jedoch die beiden Gruppenkreise deutlich oder überschnitten sich die Tangenten der beiden Kreise in einem Winkel $>90^\circ$, verdeutlichte dies den fehlenden statistisch signifikanten Unterschied zweier Gruppen.

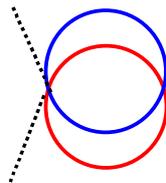


Abbildung 2: Wenn die Kreise sich bedeutend oder ganz überschnitten oder der Schnittwinkel der Tangenten $>90^\circ$ war, war der Unterschied der beiden Gruppen statistisch unsignifikant ($p > 0,05$).

Um eine statistisch signifikante Veränderung der Werte der Gruppen im zeitlichen Beobachtungsverlauf von zwei Jahren beurteilen zu können, wurde der Manova-Test (Multivariate Analysis Of Variance) nach dem Repeated Time Measure Model durchgeführt. Auch hier wurde die statistische Signifikanz bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Da dieser Test die Veränderung von Meßwerten oder Ergebnissen im Verlauf erfaßt, mußten die Patienten ausgeschlossen werden, deren Merkmale nur an einem Untersuchungstermin erhoben werden konnten.