

8. Diskussion

8.1. Diskussion von Material und Methoden

In dieser Studie wurden rechtsventrikuläre Rejektions-Kontrollbiopsien von 210 herztransplantierten Patienten ausgewertet, die aus einer Gesamtpopulation von 213 HTx-Patienten stochastisch ausgewählt wurden.

Es wurden bei den Patienten mehrere Biopsien untersucht, die zu keinem definierten Zeitpunkt entnommen wurden. Die Biopsieentnahme erfolgte vielmehr nach klinischen Gesichtspunkten.

Die Endomyokardbiopsie ist ein etabliertes Verfahren zur Erkennung von Abstoßungsreaktionen [19,27,77]. Im Rahmen der Aufarbeitung der Biopsien werden immunhistochemische Färbemethoden mit einer Auswahl von Antikörpern (z.B. HLA DR-Antikörper) an entnommenen rechtsventrikulären Kontrollbiopsien angewandt. Dieses Verfahren ist ohne eine zusätzliche invasive Untersuchung der Patienten durchführbar. Es ermöglicht anhand von Farbniederschlägen den Nachweis von bestimmten Antigenen und deren mögliche Bedeutung für die Rejektion nach HTx zu prüfen.

Die immunhistochemische Aufbereitung aller Präparate wurde nach dem gleichen Standard vorgenommen. Die morphometrische Auswertung der Biopsien erfolgte manuell vom Untersucher unter Wahrung morphometrischer Messprinzipien. Die Beurteilung der HLA DR-Expression erfolgte anhand der Anzahl der Farbniederschläge und Farbintensität in den Biopsien. Da die Biopsien auch nur von einem Untersucher mit langjähriger Erfahrung begutachtet wurden, ist ein standardisiertes Ergebnis zu erwarten.

Die mikroskopische Histomorphometrie wird somit durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Einige Autoren zweifeln aufgrund der oben genannten Einschränkungen die Reproduzierbarkeit dieser Methode an [56]. Zunehmend werden daher auch computergestützt morphometrische Auswertungen durchgeführt.

Ferner war die Qualität der gewonnenen Präparate weiterhin abhängig von chemischen und physikalischen Einflussgrößen, wie z.B. Verdünnungen, Inkubationszeiten und der Raumtemperatur. Es ist daher erforderlich, zunächst eine möglichst optimale Konstellation der verschiedenen Reagenzien in Anlehnung an die

vom Hersteller empfohlenen Richtlinien auszutesten. Ein Vergleich der Ergebnisse in der unterschiedlichen Durchführung der immunhistochemischen Färbemethoden unter den Instituten ist daher nur unter Vorbehalt möglich.

Die verwendeten monoklonalen Antikörper zeichnen sich durch ihre weitreichende Homogenität sowie das Fehlen chargenabhängiger Qualitätsschwankungen aus. Es ist jedoch zu beachten, dass der Verlust des Antigens oder die Beeinflussung seiner Reaktivität durch die Fixierung sowie die Existenz von mehr als einem möglichen Zielantigen (Kreuzaktivität) die Aussagekraft und Qualität der histologischen Schnitte beeinflusst.

In unserer Studie fanden sich keine Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Agenzien und den Herzmuskelzellen. Der verwendete Antikörper reagierte mit aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten.

Mit den angewandten Methoden und dem zufallsbedingt ausgewählten Material von 704 Biopsieproben bietet sich eine ausreichende Grundlage, den Einfluss des HLA DR-Antigens auf das Abstoßungsgeschehen zu überprüfen.

8.2. Diskussion der Ergebnisse

In den letzten Jahren und auch heute wird intensiv geforscht, um die genauen Ursachen der Abstoßungsreaktionen zu ergründen und damit eine Möglichkeit der Prophylaxe zu finden.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete starke Zunahme der HLA DR-Expression kurz nach der Transplantation und unabhängig vom Rejektionszustand ist möglicherweise als Reaktion auf das Fremdeiweiß zu deuten. Denn sowohl in den Biopsien ohne Abstoßungsreaktion als auch mit Abstoßungsreaktionen war eine starke HLA DR-Expression im 1. Monat post HTX zu verzeichnen.

Labarrere et al. beschreiben, dass die Expression von HLA DR auf Endothelzellen post HTX auf eine endotheliale Aktivierung beruht [49].

Neben dem allgemein akzeptierten Kardiomyozytenödem reagiert das Transplantat früh post-HTx mit einem relevanten Ödem der kapillären Endothelzellen [46]. Die vermehrte Endothelschwellung könnte ein Hinweis auf eine Schädigung des Endothels aber auch ein Hinweis auf den Funktionszustand des Endothels sein. Somit könnte bereits eine temporäre Schädigung der Endothelzellen möglicherweise schon für die Zunahme der HLA DR-Expression verantwortlich sein.

Als ein Grund dieser initialen Schädigung der Endothelzellen (Zunahme der Endothelschwellung) wäre die Reperfusion anzusehen [111]. Ab dem 1. Monat nach HTx beobachteten wir eine Remissionsphase der Endothelschwellung. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die initiale Schädigung der Endothelzellen auch reversibel ist.

Damit keine bleibenden Schäden am Transplantat entstehen, sollte eine kurzmöglichste Ischämiezeit angestrebt werden [111]. In diesem Rahmen ist die Wichtigkeit der Ischämiezeit zu erwähnen. Verlängerte Ischämiezeiten beim Transport des zu transplantierenden Organs führen zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die dann die Intima angreifen können. Auch Tambur et al. messen der Ischämiezeit eine besondere Bedeutung bei, denn die Länge der Ischämiezeit korrelierte mit dem Auftreten von HLA DR-Antikörpern [95].

Aufgrund der anhaltenden Auseinandersetzung mit dem Transplantat kommt es zur immunologisch bedingten endothelialen Aktivierung bzw. endothelialen Dysfunktion mit Expression von HLA DR.

Es wäre aber auch denkbar, dass die Ursache der starken HLA DR-Expression direkt nach HTx am schon von Arteriosklerose befallenen Transplantat liegt. Das heißt, dass eine endotheliale Aktivierung bzw. Dysfunktion schon im Transplantat präexistent war. Dieser Zustand wäre bei Spenderorganen denkbar, die von KHK befallen sind, mit der Folge der HLA DR-Expression.

In der Literatur wird von einer Minderzahl an HLA DR-positiven Endothelzellen ausgegangen [10]. Studien belegen hierzu, dass die ‚Grundexpression‘ von HLA Klasse II-Antigenen auf den Endothelzellen unter anderem durch zirkulierendes Interferon Gamma sowie natürliche Killerzellen reguliert bzw. aufrecht gehalten wird [60]. Kwak et al. empfehlen nach ihrer Studie die Anwendung von HMG-CoA-Reduktasehemmern. Hierbei hat man nach Gabe von HMG-CoA-Reduktasehemmern die Interferon-Gamma induzierte HLA DR Expression auf Endothelzellen reduzieren können [48].

Die koronarvaskulären Endothelzellen im Transplantat bilden eine Barriere zwischen den zirkulierenden immunaktiven Zellen des Empfängers und dem transplantierten Organ [107]. Unabhängig von der Ursache, die zur Verletzung der koronaren Endothelzellen im Herztransplantat führt, kommt es durch Aktivierung proatherogener Kaskade zur vermehrten Adhäsion und Transmigration von Entzündungszellen mit der Folge einer schnellen Okklusion kleiner Gefäße. Dieser Zustand führt letztlich zu einer Nekrotisierung des Spendergewebes mit dem Untergang des Transplantats [80,96]. Daher werden die Endothelzellen unter anderem als Ausgangspunkt der Abstoßungsreaktionen angesehen.

Die Endothelzellen können sowohl als Antigen-präsentierende Zellen (HLA DR-Expression) [66,78,79], als auch als Ziel der allogenen Lymphozyten-Reaktion dienen [72,96]. Während der humoralen Abstoßung erkennen z.B. T-Zellen auf HLA-DR-positiven Endothelzellen Antigene [80]. Der Nachweis der HLA DR-Expression in unseren Untersuchungen ist mit dem Nachweis von Infiltratzellen gleichzusetzen. Da die Infiltratzellen unmittelbar in engem Zusammenhang mit dem Parenchymuntergang im Transplantat stehen, darf angenommen werden, dass hier eine positive Korrelation mit der HLA DR-Expression besteht. Rabin et al. konnten

auch eine Korrelation zwischen der Abstoßung und der Zunahme der HLA DR-Antigene auf den Endothelzellen nachweisen [73].

Unsere Untersuchungen zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der HLA DR-Expression und der Rejektion.

Die Zunahme der HLA DR-Expression in Fällen der Rejektion war in der frühen postoperativen Phase ein progredienter Prozess, dessen Intensität sich jenseits des 3. postoperativen Monats abschwächte und ein Plateau bildete. Die Vermutung liegt nahe, dass die anhaltende Auseinandersetzung mit dem Transplantat ursächlich dafür ist.

Offen bleibt jedoch die Frage, ob sich ab dem 3. postoperativen Monat noch eine Reversibilität im Sinne eines Regenerationsprozesses einschaltet und das Transplantatversagen noch abgewendet wird.

Die HLA DR-Expression auf Endothelzellen spielt auch bei der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie (TVP) eine besondere Rolle [52]. Autoren beschreiben, dass die starke Expression von HLA DR während des 1. Trimesters nach HTx mit dem späteren Auftreten der chronischen Rejektion bzw. der Transplantatvaskulopathie streng assoziiert ist [52,92,102]. Vermutlich wird die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie innerhalb von 3 Monaten nach HTx determiniert. Wir beobachteten in unseren Untersuchungen, dass in Biopsien mit Zeichen einer Abstoßung zwischen dem 1. und 3. Monat post HTx sowohl die HLA DR-Expression, die Endothelschwellung als auch die Wandverdickung im gesamten Beobachtungszeitraum am stärksten nachzuweisen waren.

Die von uns beobachtete stärkste Ausprägung der Wandverdickung in den ersten 3 Monaten nach HTx wird in der Literatur ebenfalls beschrieben. Diese vaskuläre Veränderung darf als ein mit der HTx einhergehendes Phänomen gewertet werden.

Diese signifikante Korrelation zwischen der HLA DR-Expression, der Endothelschwellung und der Wandverdickung bestand während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Ab dem 6. Monat nach HTx fiel eine Remission der untersuchten Parameter auf. Etwa 5 bis 10% der Biopsien zeigten sowohl mit Zeichen der Rejektion als auch mit fehlender Rejektion noch HLA DR-Expression, Endothelschwellung und Wandverdickung. Dieses Phänomen erklärt sicherlich die andauernde immunologische Auseinandersetzung des Empfängers mit dem Transplantat.

In Fällen der fehlenden Rejektion fällt zwischen dem 12. und 24. Monat nach HTx eine Zunahme der untersuchten Parameter auf. Diese Beobachtung scheint auf eine Zunahme der Parameter schließen zu lassen, denn dieser Beobachtungsabschnitt beläuft sich auf 12 Monate. Blicke der Beobachtungsabschnitt wie die vorherigen Beobachtungszeiträume weiterhin bei 6 Monaten, würden wir hier eher einen plateauähnlichen Verlauf beobachten.

Allerdings bleibt der Grund der Remission der untersuchten Parameter zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin spekulativ. Diese Remission ist auch von Hiemann et al. beobachtet worden [32]. Zu diskutieren wäre die weitgehend wieder durch eine optimierte Immunsuppression eingestellte Transplantatfunktion.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit sank bei starker HLA DR-Expression (HLA DR Grad 2) ab dem 24. Monat post HTx rapide. Wir postulieren daher, dass eine u.a. schon bestehende Transplantatvaskulopathie die Ursache hierfür ist.

Diese Annahme wird durch verschiedene Autoren unterstützt. Die Aktivierung des arteriellen Endothels bedingt also die Entwicklung einer TPV und vermittelt ein erhöhtes Risiko für Transplantatversagen [50,65,101]. Wichtige Induktoren einer Endothelzellaktivierung sind der Ischämie-Reperfusionsschaden, eine verstärkte angeborene bzw. adaptive Immunantwort, die koronare Denervation, Virusinfektion (CMV), eine Therapie mit Immunsuppressiva bzw. das Vorhandensein von klassischen Risikofaktoren, wie Hypercholesterinmie und Hyperglykämie [109].

Diese wiederholte Endothelaktivierung führt zur Endotheldysfunktion und weiterhin zur Intimahyperplasie [107].

Castellot et al. haben beobachtet, dass ‚gesunde‘ Endothelzellen in-vitro einen heparinähnlichen Wachstumsinhibitor der glatten Muskelzellen produzieren [12]. Folglich darf man annehmen, dass zum einen die Schädigung der Endothelzellen die Progression der TVP als proliferative Erkrankung der vaskulären glatten Muskelzellen unterhält und fördert [2]. Zum anderen ist festzuhalten, dass das vermehrte Auftreten von immunkompetenten Zellen [38] und deren Sekretionsprodukte wie TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor) und FGF (Fibroblast Growth Factor), die als potente Mitogene für glatte Muskelzellen dienen, somit die immunologisch bedingte Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen unterstützt.

Die Transplantatvaskulopathie wird als ein diffus lumenverengender Prozess der Arterien angesehen, der mit zellulären Infiltraten und Proliferation einhergeht mit Okklusion der Gefäße und schließlich in organspezifische Läsionen einmündet. Sie ist jedoch nicht ausschließlich erworben, da bereits unmittelbar nach der Transplantation erhebliche und damit spenderbedingte arteriosklerotische Veränderungen vorkommen können. Sie ist also auch zum Teil übertragen und beeinflusst möglicherweise die weitere Progression [100]. Man hat beobachtet, dass der TVP-Prozess sehr schnell im transplantierten Organ fortschreitet und die histopathologischen Veränderungen auf dem transplantierten Gewebe beschränkt bleiben [69]. Die rasche Entwicklung der TPV innerhalb des ersten Jahres lässt eine schlechte Prognose für größere klinische Ereignisse erwarten [26] und stellt insgesamt ein großes Hindernis für den Langzeiterfolg der Herztransplantation dar [37].

Erste klinische Manifestation der Vaskulopathie ist oftmals eine progressive Herzinsuffizienz, ventrikuläre Arrhythmie oder der plötzliche Herztod durch Ischämie [106].

Die Pathogenese der Transplantatvaskulopathie ist multifaktoriell [106]. Sie ist jedoch sehr wahrscheinlich immunologisch initiiert [89]. Auch nichtimmunologische Faktoren [109] spielen bei der Entwicklung der Transplantatvaskulopathie eine große Rolle [30]. Diese beinhalten Empfängercharakteristiken (Alter, Geschlecht, Adipositas, Hypertonie, Hyperlipidämie, Insulinresistenz, CMV-Infektion), Spendereigenschaften (Alter, Geschlecht, bestehende Koronarerkrankung) [15,26,42,105] sowie eine potentielle Endothelschädigung während der HTx durch Ischämie-Reperfusion-Verletzungen [40,85,98,104] bzw. eine Vielzahl von neurohumoralen Komponenten, die während einer Stresssituation (post HTX) ausgeschüttet werden. Es ist statistisch signifikant gesichert, dass physischer sowie emotionaler Stress hämodynamische Alterationen verursachen kann.

Es entwickelt sich nach stressinduzierter Aktivierung vom autonomen Nervensystem mit Erhöhung der Katecholamin- und Angiotensin II-Spiegel eine starke Rigidität der Arterien. Auch die Herzfrequenzzunahme und der erhöhte periphere Widerstand gehören zu den stressbedingten Folgen. Plante vertritt die Meinung, dass es hierbei zu Veränderungen der Endothelpermeabilität (sekundäre Veränderungen des RR) kommt, die wiederum zum interstitiellen Ödem und somit zu Veränderungen der physiochemischen Eigenschaften führen. Im weiteren Verlauf entstehen zunehmend

mehr „Abfallprodukte“ im Endstrombett. Diese toxischen Stoffe sorgen im Endeffekt zum Remodelling der Gefäßwand und somit zur Zunahme der Transplantatvaskulopathie [71].

In diesem Zusammenhang ist auch die ‚mikrovaskuläre Prothrombogenität‘ während dem ersten Halbjahr nach HTX zu erwähnen, denn sie ist stark assoziiert mit der späteren Entwicklung der TVP [49]. Auch Holzknicht et al. beschreiben, dass die akute vaskuläre Rejektion durch einen aktivierten metabolischen Prozess (Zunahme der Thrombogenität im Bereich der terminalen Strombahn) und nicht durch die Apoptose des Endothels hervorgerufen wird [34].

Pathophysiologisch kann sogar eine anhaltende kapilläre Endothelschwellung die Thrombogenität fördern, indem sie Inhomogenitäten im Bereich der kapillären Perfusion auslöst und somit insgesamt das Transplantatüberleben limitiert.

Verschiedene Faktoren sind bei der Thrombogenität im Bereich der terminalen Strombahn gegenwärtig.

Bekannt ist, dass sie verstärkt wird durch

- Präsenz der Endothelaktivierung (**‚Upregulation‘ von HLA DR** und endothelialen interzellulären Adhäsions-Molekül-1) im Transplantat,
- Verlust von Antikoagulation (Verlust von Antithrombin),
- Verlust der Fibrinolyse-Aktivität (Verlust des Gewebs-Plasminogen-Aktivators) und
- Lagerung von myokardialen Fibrin [49,50].

Demnach würde möglicherweise die Reduzierung der Prothrombogenität im Bereich der terminalen Strombahn [51] und somit die ‚Downregulation‘ der HLA DR die Entwicklung der TVP verlangsamen und somit auch das Langzeitüberleben des Transplantats verbessern.

Verschiedene Untersuchungen konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie und der Bildung von Anti-HLA Klasse II-Antikörper sowie der Infiltration von aktivierten T-Zellen zeigen [16,102,103,110].

Aziz TM et al. beschreibt dagegen, dass es keine Korrelation zwischen HLA DR und der Inzidenz der TVP besteht. Er beschreibt eine strenge Korrelation zwischen HLA DR und der Entwicklung der akuten zellulären Abstoßung (Grad 2 und höher) [3].

Die fehlende HLA DR-Expression wird in der Literatur für einen wichtigen und aussagekräftigen Parameter für das Transplantatüberleben gehalten. Die Autoren schlussfolgern, dass die Messung von Markern der humoralen Abstoßung eine Prognoseabschätzung nach HTx zulässt [95].

Eine signifikant erhöhte HLA DR-Expression konnte bei Rejektionszuständen [47] und auch bei Todesfällen [92] nachgewiesen werden. Wir können dieses Ergebnis mit unserer Studie bestätigen. Um den 24. Monat post HTX beträgt die Überlebenswahrscheinlichkeit in Fällen mit fehlender HLA DR-Aktivität (HLA DR 0) etwa 97% und in Fällen der HLA DR-Expression (HLA DR 1, HLA DR 2) HLA DR Aktivität etwa 83%.

In der Transplantationsmedizin rechnet man der HLA-Typisierung zwischen Spender und Empfänger eine große Bedeutung zu [68].

Der Einfluss von HLA-Typisierung auf das ‚Outcome‘ der HTX wurde schon in zahlreichen Studien kontrovers diskutiert [14,18,25,54,70,112].

Bei der Untersuchung der Beziehungen zwischen HLA DR-mismatch und Transplantatorganfunktion fällt Folgendes auf:

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen erhöhtem HLA DR-mismatch (zwischen Spender und Empfänger) und Rejektion [17,55,86,87,90,97,112].

Kaczmarek et al. konnten in einer Zentrumsanalyse nachweisen, dass insbesondere ein HLA DR-matching mit einem verbesserten Überleben und einer geringeren Inzidenz der Transplantatvaskulopathie assoziiert ist [44]. Hornick et al. konnten dagegen diese Assoziation nicht belegen [35].

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass ein optimales HLA DR-matching erst dann zu einer effektiven Reduktion der akuten Rejektion nach HTX führt, wenn beim Transplantatempfänger eine bestimmte Allelkonstellation im IL-2 Gen vorliegt [33].