

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Rolle zirkulierender vaskulärer
Progenitoren bei der Entwicklung der
Transplantatvaskulopathie nach
Herztransplantation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Barbara Anna Löhr
aus Heidelberg
Jahr 2013

**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Hae-Young Sohn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralf Sodian

Prof. Dr. Michael Weis

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2013

1 EINLEITUNG	1
1.1 BEDEUTUNG DER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE (TVP) NACH HERZTRANSPLANTATION	1
1.2 BESONDERHEITEN DER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE (TVP)	2
1.3 PATHOPHYSIOLOGISCHES VERSTÄNDNIS DER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE (TVP)	3
1.4 ROLLE ZIRKULIERENDER PROGENITOREN BEI KORONARER HERZKRANKHEIT UND TRANSPLANTATVASKULOPATHIE (TVP)	4
1.5 DIAGNOSTIK DER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE (TVP)	5
1.5.1 KLINISCHE PARAMETER	5
1.5.2 ANGIOGRAPHISCHE BEURTEILUNG	5
1.5.3 INTRAVASKULÄRER ULTRASCHALL (IVUS) MIT RADIOFREQUENZANALYSE (IVUS-VH)	6
1.6 FRAGESTELLUNGEN	7
2 MATERIAL UND METHODEN	8
2.1 PATIENTENPOPULATION	8
2.1.1 EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN	8
2.1.2 KLINISCHE DATEN	9
2.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	10
2.2.1 MATERIALGEWINNUNG	10
2.2.2 PROBENVORBEREITUNG	10
2.2.3 KALIBRIERUNG DES DURCHFLUSSZYTOMETERS (FACS)	11
2.2.4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER PROGENITORZELLEN	12
2.3 KORONARANGIOGRAPHIE	15
2.3.1 DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNG	15
2.3.2 AUSWERTUNG DER ANGIOGRAPHISCHEN SEQUENZEN	15
2.4 INTRAVASKULÄRER ULTRASCHALL MIT RADIOFREQUENZANALYSE	17
2.4.1 DURCHFÜHRUNG DER IVUS-VH UNTERSUCHUNG	17
2.4.2 AUSWERTUNG DER IVUS-VH DATEN	17
2.5 STATISTISCHE METHODEN	21
3 ERGEBNISSE	23
3.1 PATIENTENKOLLEKTIV	23
3.1.1 BESCHREIBUNG DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS	23
3.1.2 BESCHREIBUNG DER STUDIENPOPULATION MIT IVUS-DATEN	27
3.2 KORONARANGIOGRAPHISCHE EINSCHÄTZUNG DER TVP (SCORING)	29
3.3 EINFLUSSFAKTOREN AUF DAS VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE	31
3.3.1 KORRELATION ZWISCHEN DEM VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE UND PATIENTENCHARAKTERISTIKA	31

3.3.2 KORRELATION ZWISCHEN DEM VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE UND KARDIOVASKULÄREN RISIKOFAKTOREN	31
3.3.3 KORRELATION ZWISCHEN DEM VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE UND HTX ASSOZIIERTEN RISIKOFAKTOREN	32
3.3.4 KORRELATION ZWISCHEN DEM VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE UND DER IMMUNSUPPRESSIVEN THERAPIE	33
3.3.5 KORRELATION ZWISCHEN DEM VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE UND LABORPARAMETERN	33
3.3.6 KORRELATION ZWISCHEN DEM VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE UND DER BEGLEITMEDIKATION	34
3.4 VASKULÄRE PROGENITORZELLEN	36
3.4.1 BESTIMMUNG VON GLATTMUSKULÄREN UND ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN	36
3.4.2 KORRELATION ZWISCHEN ZIRKULIERENDEN PROGENITOREN UND DEM VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE	37
3.5 KORRELATION ZWISCHEN KLINISCHEN FAKTOREN UND DEM VORLIEGEN EINER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE: MULTIVARIATE ANALYSE	38
3.6 CHARAKTERISIERUNG DER IVUS PARAMETER BEI DER TVP	39
3.7 KORRELATION DER IVUS BZW. IVUS-VH PARAMETER MIT DER KORONARANGIOGRAPHIE	40
3.8 KORRELATION DER IVUS PARAMETER MIT KLINISCHEN DATEN	41
3.8.1 KORRELATION ZWISCHEN IVUS PARAMETERN UND DEN PATIENTENCHARAKTERISTIKA	41
3.8.2 KORRELATION ZWISCHEN IVUS PARAMETERN UND DEN KARDIOVASKULÄREN RISIKOFAKTOREN	41
3.8.3 KORRELATION ZWISCHEN IVUS PARAMETERN UND HTX ASSOZIIERTEN RISIKOFAKTOREN	41
3.8.4 KORRELATION ZWISCHEN IVUS PARAMETERN UND DER IMMUNSUPPRESSIVEN THERAPIE	42
3.8.5 KORRELATION ZWISCHEN IVUS PARAMETERN UND LABORPARAMETERN	42
3.8.6 KORRELATION ZWISCHEN IVUS PARAMETERN UND DER BEGLEITMEDIKATION	42
3.9 KORRELATION DER IVUS-VH PARAMETER MIT KLINISCHEN DATEN	44
3.9.1 KORRELATION ZWISCHEN IVUS-VH PARAMETERN UND DEN PATIENTENCHARAKTERISTIKA	44
3.9.2 KORRELATION ZWISCHEN IVUS-VH PARAMETERN UND DEN KARDIOVASKULÄREN RISIKOFAKTOREN	44
3.9.3 KORRELATION ZWISCHEN IVUS-VH PARAMETERN UND HTX ASSOZIIERTEN RISIKOFAKTOREN	44
3.9.4 KORRELATION ZWISCHEN IVUS-VH PARAMETERN UND DER IMMUNSUPPRESSIVEN THERAPIE	45
3.9.5 KORRELATION ZWISCHEN IVUS-VH PARAMETERN UND LABORPARAMETERN	45
3.9.6 KORRELATION ZWISCHEN IVUS-VH PARAMETERN UND DER BEGLEITMEDIKATION	45
3.10 KORRELATION ZWISCHEN ZIRKULIERENDEN VASKULÄREN PROGENITOREN UND IVUS- SOWIE IVUS-VH-PARAMETERN	47
3.11 KORRELATION ZWISCHEN KLINISCHEN FAKTOREN UND IVUS PARAMETERN – MULTIVARIATE ANALYSE	49
3.12 KORRELATION ZWISCHEN KLINISCHEN FAKTOREN UND IVUS-VH-PARAMETERN – MULTIVARIATE ANALYSE	50
4 DISKUSSION	51
4.1 MATERIAL UND METHODEN	51
4.1.1 PATIENTENPOPULATION	51
4.1.2 METHODIK DER BESTIMMUNG VON ZIRKULIERENDEN VASKULÄREN PROGENITORZELLEN	53

4.1.3 KORONARANGIOGRAPHISCHE EVALUATION DER SCHWERE DER TRANSPLANTATVASKULOPATHIE	54
4.1.4 INTRAVASKULÄRER ULTRASCHALL UND IVUS-VH	54
4.2 ERGEBNISSE	56
4.2.1 KORONARANGIOGRAPHISCHE EINSCHÄTZUNG DER TVP	56
4.2.2 EINSCHÄTZUNG DER TVP MITTELS IVUS UND IVUS-VH	56
4.2.3 KORRELATION DER KLINISCHEN PATIENTENDATEN MIT TVP, IVUS UND IVUS-VH	57
4.2.3.1 ALTER UND GESCHLECHT	57
4.2.3.2 KARDIOVASKULÄRE RISIKOFAKTOREN	57
4.2.3.3 TRANSPLANTATASSOZIIERTE DATEN	58
4.2.3.4 IMMUNSUPPRESSION	59
4.2.3.5 LABORPARAMETER	61
4.2.3.6 BEGLEITMEDIKATION	61
4.2.4 KORRELATION DES VORLIEGENS ZIRKULIERENDER VASKULÄRER PROGENITORZELLEN IM BLUT MIT DEM VORLIEGEN EINER TVP UND DEN IVUS- UND IVUS-VH-PARAMETERN	62
4.4 SCHLUSSFOLGERUNG MIT ANTWORT AUF DIE FRAGESTELLUNG	68
4.5 AUSBLICK	69
5 ZUSAMMENFASSUNG	70
6 ANHANG	73
6.1 LITERATURVERZEICHNIS	73
6.2 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	83
6.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	86
6.4 DANKSAGUNG	87

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Transplantatvaskulopathie (TVP) nach Herztransplantation

Seit der ersten erfolgreichen Herztransplantation, die 1967 von Christian Barnaard in Kapstadt durchgeführt wurde, hat sich die orthotope allogene Herztransplantation zu einer weltweit anerkannten therapeutischen Option für Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz entwickelt. Laut dem Register der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation werden derzeit weltweit ca. 5000 Herztransplantationen pro Jahr durchgeführt. Insgesamt wurden seit 1967 mehr als 85.000 Herzen transplantiert (Taylor et al. 2009).

Nach erfolgreicher Transplantation wird die Prognose der Patienten durch verschiedene Faktoren beeinflußt. Im ersten postoperativen Jahr stellen akute Abstossungsreaktionen und schwere Infektionen die Haupttodesursache der Patienten dar. Allerdings konnte durch Fortschritte der immunsuppressiven und antibiotischen Therapie die Überlebensrate der ersten 6 -12 Monate deutlich verbessert werden (Taylor et al. 2009).

Nach den ersten 1-2 Jahren wird das Langzeitüberleben dann in erster Linie durch die sogenannte Transplantatvaskulopathie (TVP) – eine besondere Atheroskleroseform der Koronarien des Donorherzens (s. Kapitel 1.2) – limitiert (Schmauss et al. 2008). Die aktuelle Datenlage zeigt, dass die TVP angiographisch sehr häufig anzutreffen ist: 1 Jahr nach der Transplantation können 8%, nach 5 Jahren 32% und nach 10 Jahren 52% der herztransplantierten Patienten betroffen sein. Patienten, die an einer TVP leiden, haben eine deutlich reduzierte 5 Jahres-Überlebensrate, die gegenüber gesunden Patienten um 9–12% geringer ist (Taylor et al. 2009). Da die Behandlungsoptionen der TVP derzeit noch stark limitiert sind, liegt

die jährliche Sterblichkeitsrate 6 Monate nach HTX unverändert bei 3.5% (Taylor et al. 2009).

1.2 Besonderheiten der Transplantatvaskulopathie (TVP)

Bei der TVP handelt es sich um eine besondere Form der koronaren Herzerkrankung, die sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zur klassischen Atherosklerose aufweist.

Beide Erkrankungen sind gekennzeichnet durch eine gestörte Endothelfunktion und eine Hyperplasie der Intima beginnend mit überwiegend fibrotisch-lipidhaltigen Plaques. Im Gegensatz zur Atherosklerose, bei welcher die Läsionen fokal und exzentrisch zu finden sind, zeichnet sich die typische Transplantatvaskulopathie durch konzentrische Stenosen mit diffuser Beteiligung des gesamten Koronarbettes aus (Colvin-Adams et al. 2011). Zusätzlich beteiligt die TVP nicht nur epikardiale Koronargefäße, sondern auch intramurale und venöse Gefäße (Aranda J.M. et al. 2000).

Hinsichtlich der Progredienz der Erkrankung unterscheiden sich die beiden Entitäten auch deutlich: Während sich die klassische Atherosklerose über mehrere Jahrzehnte entwickelt, kann die TVP bereits ein bis zwei Wochen nach der Transplantation nachweisbar sein und innerhalb weniger Monate deutlich forschreiten (Rahmani et al. 2006).

1.3 Pathophysiologisches Verständnis der Transplantataskulopathie (TVP)

Die Pathogenese der TVP ist heute noch weitgehend unbekannt. Man geht jedoch davon aus, dass eine Dysfunktion der Endothelzellen die Schlüsselrolle spielt (Colvin-Adams et al. 2011). Endothelzellen besitzen protektive Wirkungen und verhindern bei intakter Funktion eine Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion. (Aranda et al. 2000, Schmauss et al. 2008). Bei einer Endotheldysfunktion kann innerhalb der Gefäßwand eine inflammatorische Reaktion und in deren Rahmen eine deutliche Proliferation glattmuskulärer Zellen entstehen, die zu einer Intimahyperplasie mit konsekutiver Lumenreduktion führt.

Ein Endothelschaden kann durch mehrere Noxen verursacht werden: Durch während der Transplantation entstehende Ischämie- und Reperfusionsphasen, durch das Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren bei dem Organempfänger, aber auch durch nicht beeinflussbare Faktoren wie beispielsweise das Alter des Spenders (Aranda et al. 2000, Rahmani et al. 2006, Schmauss et al. 2008, Vassalli et al. 2003, Valentine 2003). Zudem scheint die immunologische Erkennung des fremden Organs durch das Immunsystem des Empfängers eine große Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von HLA-DR identischen Organen einen unabhängigen Prädiktor für das Überleben darstellt (Hosenpud et al. 1996, Kaczmarek et al. 2006b).

1.4 Rolle zirkulierender Progenitoren bei koronarer Herzkrankheit und Transplantatvaskulopathie (TVP)

Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass bei der Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque auch Komponenten des klassischen Immunsystems wie T-Lymphozyten und bestimmte Zytokine beteiligt sind. Ein neuer und interessanter Aspekt in diesem Forschungsfeld ist die Feststellung, dass offenbar auch sogenannte Progenitorzellen, die in der Blutbahn zirkulieren, bei der Pathogenese der Atherosklerose involviert sind (Vasa et al. 2007, Werner et al 2005).

Zirkulierende Progenitoren sind Zellen, die aus dem Knochenmark stammen und über die Blutbahn in die Peripherie gelangen. Sie haben bereits einen gewissen Reifungsgrad erlangt, besitzen aber noch pluripotente Eigenschaften (Hristov et al. 2008b). Es gibt bisher nur lückenhafte Daten über die genaue physiologische Rolle der Progenitoren. Für vaskuläre Vorläufer wie endotheliale und glattmuskuläre Progenitoren wurde jedoch gezeigt, dass sie möglicherweise an der postnatalen Angiogenese beteiligt sein könnten (Hristov et al. 2008b). Zudem konnten bereits mehrere Arbeiten darlegen, dass zirkulierende Progenitoren bei der Regeneration der Gefäßwand nach Verletzung oder Ischämie eine Rolle spielen. So scheinen CD34+/KDR+, endotheliale Progenitorzellen hinsichtlich der Progredienz der koronaren Herzkrankheit protektive Eigenschaften zu besitzen (Werner et al. 2005). Für einen Anteil der glattmuskulären Zellen in der Neointima des atherosklerotischen Plaques konnte nachgewiesen werden, dass sie von vaskulären Progenitoren stammen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben (Caplice et al. 2003). Ob und inwiefern die zirkulierenden vaskulären Progenitoren auch bei der Entwicklung der TVP beteiligt sind, wurde bisher nicht untersucht.

1.5 Diagnostik der Transplantatvaskulopathie (TVP)

1.5.1 Klinische Parameter

Herztransplantierte Patienten, die unter einer TVP leiden, präsentieren sich aufgrund der Denervation der Herzen üblicherweise nicht mit klassischen Angina pectoris-Beschwerden (Aranda et al. 2000, Cai et al. 2011, Weis M. et al. 1997), sondern klagen vielmehr über klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz, wie verminderte Belastbarkeit, Dyspnoe bis Orthopnoe und Beinödeme. Eine ganze Reihe von Patienten ist trotz massiv fortgeschrittenener TVP völlig asymptatisch, so dass eine rein symptomorientierte Diagnostik einer TVP praktisch nicht möglich ist.

1.5.2 Angiographische Beurteilung

Da es bisher keinen nicht-invasiven Test auf das Vorliegen einer TVP gibt, der eine relevant hohe Sensitivität und Spezifität aufweist, werden herztransplantierte Patienten in regelmäßigen Abständen koronarangiographiert. Typisch für die TVP ist ein diffuses Verteilungsmuster, das auch kleine periphere Äste betrifft und häufig zu Verlusten von Endästen führt. Weiterhin zeigt sich charakteristischerweise eine diffuse konzentrische Lumenreduktion des gesamten Gefäßes. Daher kann, bedingt durch die Tatsache, dass die Angiographie ein zweidimensionales Luminogramm darstellt, eine Unterschätzung der Ausprägung der TVP resultieren. Somit sind serielle Untersuchungen zur Diagnostik der TVP von großer Bedeutung (Cai et al. 2011, Nissen S.E. 2001b).

1.5.3 Intravaskulärer Ultraschall (IVUS) mit Radiofrequenzanalyse (IVUS-VH)

Obwohl die Referenzmethode Koronarangiographie eine sehr gute Übersicht über das gesamte Koronarsystem mitsamt Stenoseverteilung geben kann, gilt der intravaskuläre Ultraschall (IVUS) aufgrund höherer Sensitivität inzwischen als Goldstandard zur Darstellung von Gefäßwandstrukturen (Schmauss et al. 2008). Bereits früh nach Transplantation kann durch die Methode des IVUS das Vorliegen einer Atherosklerose diagnostiziert werden, während die Angiographie keine Auffälligkeiten aufzeigen kann (König et al. 2008a und 2008b). Limitiert wird der IVUS allerdings durch die Größe des Katheters, der es nicht ermöglicht, auch kleine Gefäße und Gefäßäste von luminaler Seite zu untersuchen.

Während mit dem sogenannten „Grauskalen-IVUS“ eine Beurteilung der Plaquemorphologie nur vage anhand der Echogenität einer Läsion möglich ist, kann mit der neuen Methode der Radiofrequenzanalyse (IVUS-VH) eine Gewebecharakterisierung *in vivo* in die vier histologischen Plaquekomponenten „fibrotisch“, „fibrotisch–lipidhaltig“, „nekrotisch“ und „kalzifiziert“ erfolgen (Cai et al. 2011). Welche Rolle die IVUS-VH Analyse bei der TVP spielen könnte, ist jedoch bisher nicht ausreichend untersucht.

1.6 Fragestellungen

In diesem Zusammenhang haben uns folgende Fragestellungen interessiert:

1. Spielen zirkulierende vaskuläre Progenitoren eine Rolle bei der Transplantatvaskulopathie? Ist die Anzahl der glattmuskulären oder der endothelialen Progenitoren mit dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie assoziiert?
2. Korrelieren klassische IVUS bzw. die IVUS-VH Parameter mit der angiographischen Charakterisierung der Transplantatvaskulopathie?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen glattmuskulären oder endothelialen Progenitoren und IVUS bzw. IVUS-VH Parametern?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenpopulation

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Studie kamen alle Patienten in Frage, die sich im Rahmen der Nachsorge nach Herztransplantation regelmäßig zu Kontrolluntersuchungen in den HTX-Ambulanzen der Medizinischen Poliklinik Campus Innenstadt und in der Medizinischen Klinik und Poliklinik 1 - Großhadern des Klinikums der Universität in München vorstellten und zeitnah eine Koronarangiographie erhielten.

Ausgeschlossen wurden Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung, einer akuten Infektion oder einer akuten Abstoßungsreaktion litten. Des Weiteren wurden Patienten ausgeschlossen, die in den vergangenen 3 Monaten einen Myokardinfarkt erlebten oder weniger als 3 Monate transplantiert waren.

Im Zeitraum zwischen Oktober 2007 und Oktober 2008 wurden prospektiv insgesamt 207 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, die alle ihr schriftliches Einverständnis gaben. 19 Patienten wurde im Verlauf der Studie aus folgenden Gründen ausgeschlossen: bei 11 Patienten ergaben sich auf Grund unvollständiger Erythrozytolyse nicht verwertbare Messdaten bei der Durchflusszytometrie, bei 8 Patienten wurde aufgrund individueller Gründe kurzfristig keine Koronarangiographie durchgeführt. Insgesamt konnten dementsprechend 188 vollständige Datensätze für die Studie erhoben werden.

2.1.2 Klinische Daten

Als Stammdaten wurden von allen Patienten das Geschlecht, das Alter, die Indikation zur Transplantation, der Zeitpunkt der Transplantation, das Spenderalter, die Ischämiezeit, die Anzahl der Abstötungen und die aktuelle immunsuppressive Medikation aus den klinischen Akten erhoben. Aus den Labordaten wurden neben der Spiegelkontrolle der Immunsuppressiva unter anderem die Leukozytenzahl, die Retentionswerte, das CRP und das pro-BNP untersucht.

Des Weiteren wurde die Anwesenheit von klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren dokumentiert. Ein Diabetes mellitus galt als vorhanden, wenn bereits eine diätetische oder medikamentöse Therapie eingeleitet wurde oder erhöhte Nüchternblutzuckerwerte über 126mg/dl auffielen. Eine Hypertonie lag vor, wenn die Diagnose bereits gesichert und eine Therapie eingeleitet war oder der Blutdruck über 140/90mmHg lag. Von einer Hyperlipidämie wurde ausgegangen, wenn sie bekannt war oder das Cholesterin > 240mg/dl, das LDL > 160mg/dl oder die Triglyceride > 200mg/dl lagen. Das Vorliegen eines Nikotinabusus wurde anamnestisch eruiert bzw. aus der Aktenlage erhoben.

2.2 Durchflusszytometrie

2.2.1 Materialgewinnung

Die Blutentnahmen, die zur Bestimmung der vaskulären Progenitoren notwendig waren, wurden mit den geplanten, regelmäßigen Spiegelkontrollen der Immunsuppressiva zwischen 8.00 Uhr und 10.00 Uhr durchgeführt. Den Patienten wurde 7,5ml peripheres, venöses Blut in EDTA Röhrchen entnommen. Die Bearbeitung der Blutprobe erfolgte unmittelbar, spätestens jedoch 4-6 Stunden nach der Entnahme.

2.2.2 Probenvorbereitung

100 µl Vollblut wurden mit jeweils 10 µl monoklonaler Antikörper inkubiert. Dabei wurde ein Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) konjugierter CD34 Antikörper (Klon 581, 10 µl, BD Pharmingen) zusammen mit einem Phycoerythrin (PE) konjugierten KDR Antikörper (Klon 89106, 10µl, R&D Systems) zur Blutprobe zugegeben, um endothiale Progenitorzellen zu selektieren. In einer zweiten Probe wurde zum CD34 Antikörper ein PE-konjugierter CD140b Antikörper (Klon 28D4, 10µl, BD Pharmingen) zugemischt, um glattmuskuläre Progenitoren zu bestimmen.

Für jede Blutprobe wurde eine Negativkontrolle mit einem Maus FITC-IgG₁, κ Antikörper (Klon MOPC-31C, BD Pharmingen) in Verbindung mit PE-konjugiertem IgG2a, κ Antikörper (Klon G155-178, BD Pharmingen) und in der zweiten Kontrolle zusammen mit einem PE-konjugierten IgG1 (AbDSerotec) durchgeführt. Dies diente der Messung der unspezifischen Bindung und der Autofluoreszenz der Zellen.

Die vier Proben wurden für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis gelagert. Um potentielle Störungen der durchflusszytometrischen Messung durch Erythrozyten zu vermeiden, wurden diese im nächsten Schritt durch Lyse

eliminiert. Zuvor wurde die FACS Lysing solution (Becton Dickinson) im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Jede Probe wurde mit 1ml der Lösung versetzt und 10 Minuten inkubiert, wobei nach 5 Minuten erneut durchmischt wurde. Durch zweimaliges Waschen mit PBS wurden Reste der Lösung entfernt und die Zellen anschließend mit einigen Tropfen PBS resuspendiert.

2.2.3 Kalibrierung des Durchflusszytometers (FACS)

Die Proben wurden mit einem FACS Canto Durchflusszytometer (BD Bioscience) untersucht. Die Progenitoren wurden als Prozent der mononukleären Zellen dargestellt. Vor der ersten Messung musste zunächst die Geräteempfindlichkeit kalibriert und optimiert werden. Hierfür kamen FITC- (Fluoreszeinisothiocyanat) und PE- (Phycoerythin) markierte Beads zum Einsatz. Diese wurden zusammen mit isotoner Kochsalzlösung in ein Analyseröhrchen gegeben, um die optische Bank zu justieren. Da es aufgrund des breiten Emissionsspektrums der Fluorochrome zum ‚Überstrahlen‘ in den Fluoreszenzbereich anderer Fluorochrome kommt, wurde eine Kompensation mit Anti-FITC und Anti-PE durchgeführt.

Für das Vorwärtsstreulicht, das eine Aussage über die Zellgröße ermöglicht, wurde ein sog. Schwellenwert (Diskriminator, Threshold) gesetzt. Dadurch konnten alle Impulse unterhalb des Schwellenwerts ausgeschlossen werden, um Verunreinigungen oder nicht erwünschte Partikel wie Zelldetritus nicht zu erfassen. Der Schwellenwert für FSC wurde in dieser Arbeit bei 50×10^3 gesetzt. Kleinere Events wurden somit nicht in das Messergebnis übertragen.

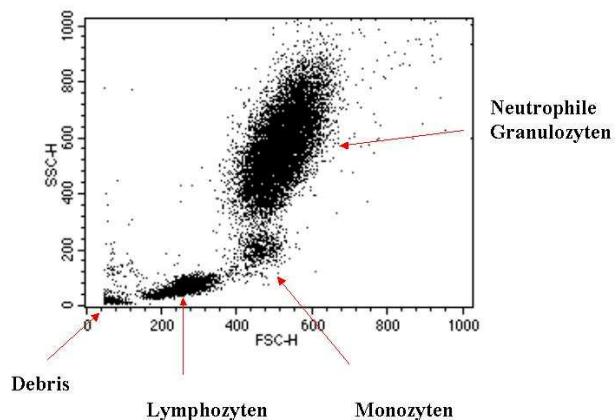
Zur optimalen optischen Darstellung der gemessenen Events war des Weiteren eine Justierung der Voltage von FITC und PE nötig. Für FITC und

PE erwies sich nach mehreren Tests eine Voltage von jeweils 500 als optimal. Diese wurde über die gesamte Studie nicht abgeändert.

Nach Durchführung dieser Kalibrierungen am Durchflusszytometer wurden pro Proberöhrchen 10 000 Events gemessen. Die Durchflussrate betrug bei mittlerer Geschwindigkeit zwischen 300-700 Events pro Sekunde.

2.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Progenitorzellen

Die vorbereiteten Proben wurden im Durchflusszytometer durch eine schmale Kapillare gesaugt und durch einen koaxialen Hüllstrom fokussiert (hydrodynamische Fokussierung). Durch dieses Vorgehen ist gewährleistet, dass alle Zellen einzeln nacheinander den Laserstrahl passieren und dabei eine für die Zellart charakteristische Streustrahlung verursachen. Gemessen wird einerseits die Intensität des Lichts, das in Vorwärtsrichtung des einfallenden Lichtstrahls in einem Winkel von 0,5°–2° gestreut wird, die ein Maß für die Zellgröße ist (Forward Scatter). Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter), dem die Intensität des Lichts in einem Ablenkungswinkel von 90° entspricht, gibt Informationen über die Granularität einer Zelle wieder. Nachdem sich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten in ihrer Größe und Granularität unterscheiden, können die Populationen damit in einzelnen Gruppen getrennt darstellt werden. In einer Graphik, auf deren X- Achse die Zellgröße und auf der Y- Achse die Granularität aufgetragen sind, werden die drei Gruppen graphisch separiert (Abbildung I).



<http://www.rrk-berlin.de/nephrologie/pics/durch3.png>

Abbildung I: Darstellung der Zellpopulationen nach Detektion im Durchflusszytometer.

Um bestimmte Subpopulationen der Leukozyten, in unserem Fall die Lymphozyten, näher untersuchen zu können, wurde diese Zellgruppe durch das sogenannte „Gating“ selektioniert, s. Abbildung II.

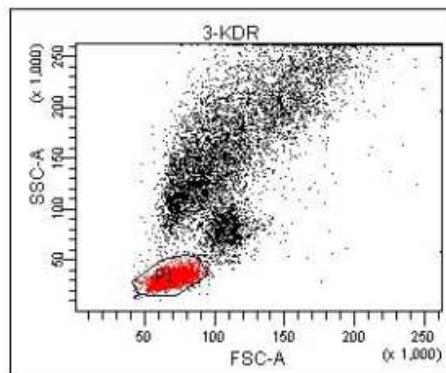


Abbildung II: Selektion der Lymphozyten durch „Gating“.

In einem weiteren Diagramm wurden alle durch Gating selektionierte Lymphozyten in vier Gruppen aufgeteilt dargestellt. Im linken unteren Quadrat befinden sich Zellen, von denen kein fluoreszierendes Signal ausgeht, an die also kein Antikörper gebunden hat. An allen Zellen, die sich im rechten oberen Quadrat befinden, heften beide verwendete Antikörper, die in ihrer Kombination spezifisch die gesuchten Progenitorzellen markieren (Abbildung III).

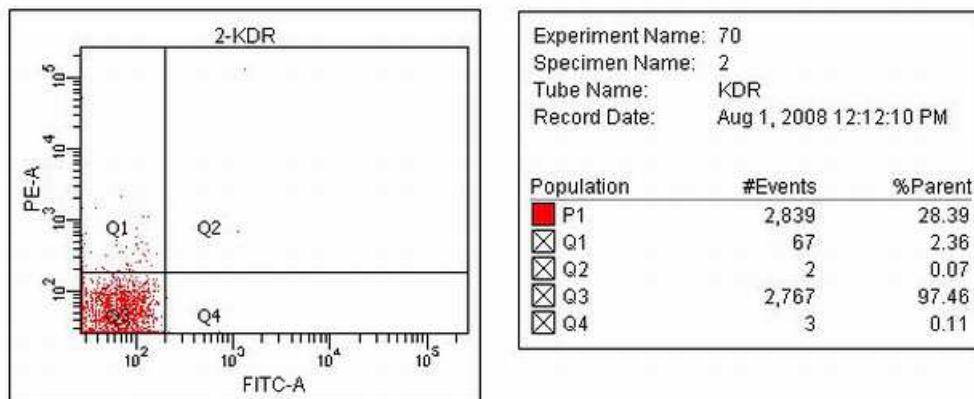


Abbildung III: Differenzierte Darstellung der Lymphozyten als Subpopulationen abhängig von der Antikörperbindung.

Nachdem die Lymphozytenpopulation durch Gating selektiert wurde, wurde das Raster so angepasst, dass sich mindestens 98% aller Zellen im linken unteren Quadrat befanden. Alle Zellen im rechten oberen Quadrat stellen die gesuchte Population dar, da sie durch beide Antikörper gebunden wurden. Sie sind dargestellt als Prozent der mononukleären Zellen.

2.3 Koronarangiographie

2.3.1 Durchführung der Untersuchung

Die Koronarangiographie wurde nach den üblichen Empfehlungen der Fachgesellschaften mit Standardprojektionen durchgeführt. Die diagnostischen Eingriffe wurden mit 4-French Kathetern durchgeführt. Bei zusätzlichen IVUS Untersuchungen fanden 6-French Führungskatheter Verwendung.

2.3.2 Auswertung der angiographischen Sequenzen

Die semiquantitative Auswertung der verblindeten Angiographien erfolgte unabhängig von zwei erfahrenen Kardiologen. Es wurde dabei ein standardisierter Score angewandt, der bereits von anderen Arbeitsgruppen zur Charakterisierung der TVP für das gesamte Koronarsystem vorgeschlagen wurde (Kaczmarek et al. 2006, Aziz et al. 2000). In diesen fließt einerseits die Anzahl und Verteilung der Stenosen und andererseits der Schweregrad der Stenosen ein, was in der nachfolgenden Abbildung IV und der Tabelle I zu sehen ist.

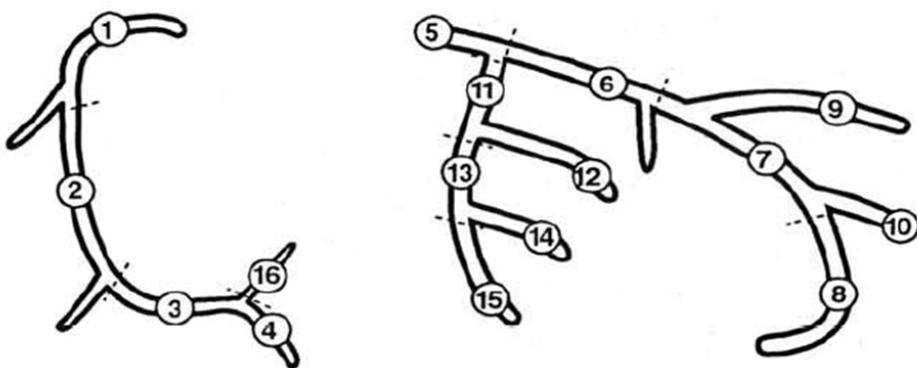


Abbildung IV: Schematische Darstellung der Koronararterien und deren Hauptäste.

	Linker Hauptstamm	proximaler Abschnitt	distaler Abschnitt
Normale Morphologie	0	0	0
< 50%ige Stenose	3	2	1
50 - 70%ige Stenose	6	4	2
70 - 90%ige Stenose	9	6	3
> 90%ige Stenose	12	8	4

Tabelle I: Bewertung koronarer Stenosen anhand Lokalisation und Schweregrad als Grundlage des TVP-Score Systems (Kaczmarek et al. 2006, Aziz et al. 2000).

Eine Beteiligung proximaler Gefäßabschnitte wurde entsprechend höher bewertet, z.B. wurde für eine 60%ige Stenose der rechten Koronararterie in ihrem proximalen Anteil 4 Punkte vergeben. Eine 60%ige Stenose in einem Seitenast ergab dagegen nur 2 Punkte. Nachdem alle Stenosen kategorisiert waren, wurden die Punktewerte aller Läsionen addiert und somit der Schweregrad der TVP festgelegt (Tabelle II).

0	Keine TVP
1 – 3	Minimale TVP
4 – 7	Milde TVP
8 - 10	Moderate TVP
> 10	Schwere TVP

Tabelle II: Bestimmung des Schweregrades der TVP anhand des TVP-Score Systems (Kaczmarek et al. 2006, Aziz et al. 2000).

2.4 Intravaskulärer Ultraschall mit Radiofrequenzanalyse

Bei 40 Patienten der Studienpopulation erfolgte zusätzlich zur Koronarangiographie eine intravaskuläre Ultraschalluntersuchung (IVUS). Der IVUS wurde bei 34 Patienten (85%) im Ramus interventricularis anterior, bei 3 Patienten (7.5%) im Ramus circumflexus, bei 2 Patienten (5%) in der rechten Koronararterie und bei einem Patienten (2.5%) im Ramus intermedium durchgeführt.

2.4.1 Durchführung der IVUS-VH Untersuchung

Die IVUS Untersuchungen wurden, unabhängig von der Studie, im Rahmen der regelmäßigen Herzkatheteruntersuchungen nach HTX durchgeführt. Nach Darstellung der Koronarien und intrakoronarer Applikation von Nitroglycerin (0,25mg) wurde der IVUS-Katheter in die medialen Abschnitte der Koronararterie vorgesoben. Es wurde ein elektronischer Sektor-Scanner (Eagle Eye catheter, 2.9F/40MHz, Fa. Volcano) verwendet. Die Datenakquisition erfolgte mit einem motorisierten Katheterrückzug (0,5 mm/s). Die Radiofrequenzdaten für die „virtuelle Histologie“ wurden EKG - getriggert und zeitgleich mit den IVUS Aufnahmen erhoben. Die Rekonstruktion der Gefäßabschnitte und die farbcodierte Darstellung der Plaquekomponenten erfolgte durch eine spezielle Software (Real Time VH, Volcano corporation, Rancho Cordova, CA).

2.4.2 Auswertung der IVUS-VH Daten

Die Volcano pcVH Review Software, mit der die IVUS Filme ausgewertet wurden, stellt die Gefäße sowohl im Quer- als auch im Längsschnitt dar und ermöglichte es, diese in Segmente beliebiger Länge zu unterteilen (s. Abbildung V). Wir wählten die proximalen 20mm und 30mm der jeweiligen

Koronarien für unsere Untersuchungen, wobei immer distal des linken Hauptstammes mit der Messung begonnen wurde.

Durch eine automatische Konturerkennung wurden als Grenze zwischen dem Gefäßlumen und der Intima gelbe Linien eingezeichnet (Gefäßlumen). Die orangefarbene Linie kennzeichnet die Membrana elastica externa, die Grenzlinie zwischen der echoarmen Media und der echodichten Adventitia (Gefäßfläche), s. Abbildung V. Da eine korrekte Definition von Plaque- und Gefäßgrenzen Voraussetzung für die Berechnung der Plaquekomponenten ist, mussten die Begrenzungslinien von Frame zu Frame systematisch kontrolliert und bei Bedarf manuell korrigiert werden.

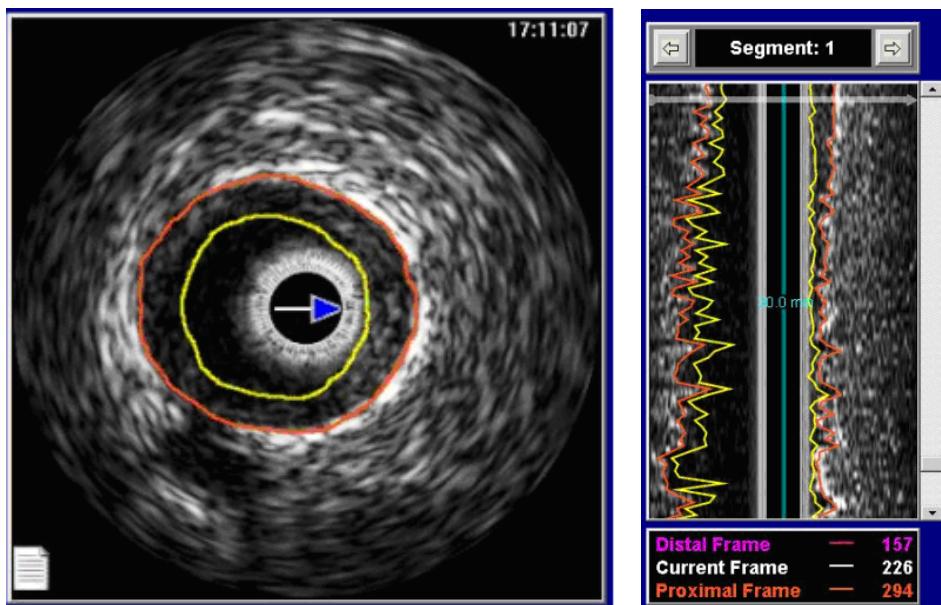


Abbildung V: Darstellung eines Gefäßes in Längs- und Querschnitt mit eingebblendeten Gefäß- und Lumengrenzen im Grauskalen IVUS.

Für die Segmente von 20mm bzw. 30mm Länge wurden folgende IVUS-Parameter ermittelt:

- Gefäßvolumen (mm^3) = External elastic membrane volume (mm^3)
- Plaquevolumen (mm^3) = External elastic membrane volume – Lumen volume (mm^3)
- Plaquelast (in %) = (Plaquevolumen/ Gefäßvolumen) x 100
= (Plaque plus media volume/ EEM volume) x 100
- Maximale Plaquefläche (mm^2) = major Plaque plus media area within the segment (mm^2)
- Minimale Lumenfläche in mm^2 = minimal Lumenarea (mm^2)

Für die Segmente von 20mm bzw. 30mm Länge wurden folgende IVUS-VH Daten ermittelt:

- Plaquekomponenten als prozentualer Anteil des gesamten Plaquevolumens:
 - fibrotisch (grün),
 - fibrotisch–lipidhaltig (gelb),
 - nekrotisch (rot) und
 - kalzifiziert (weiß) (s. Abbildung VI).

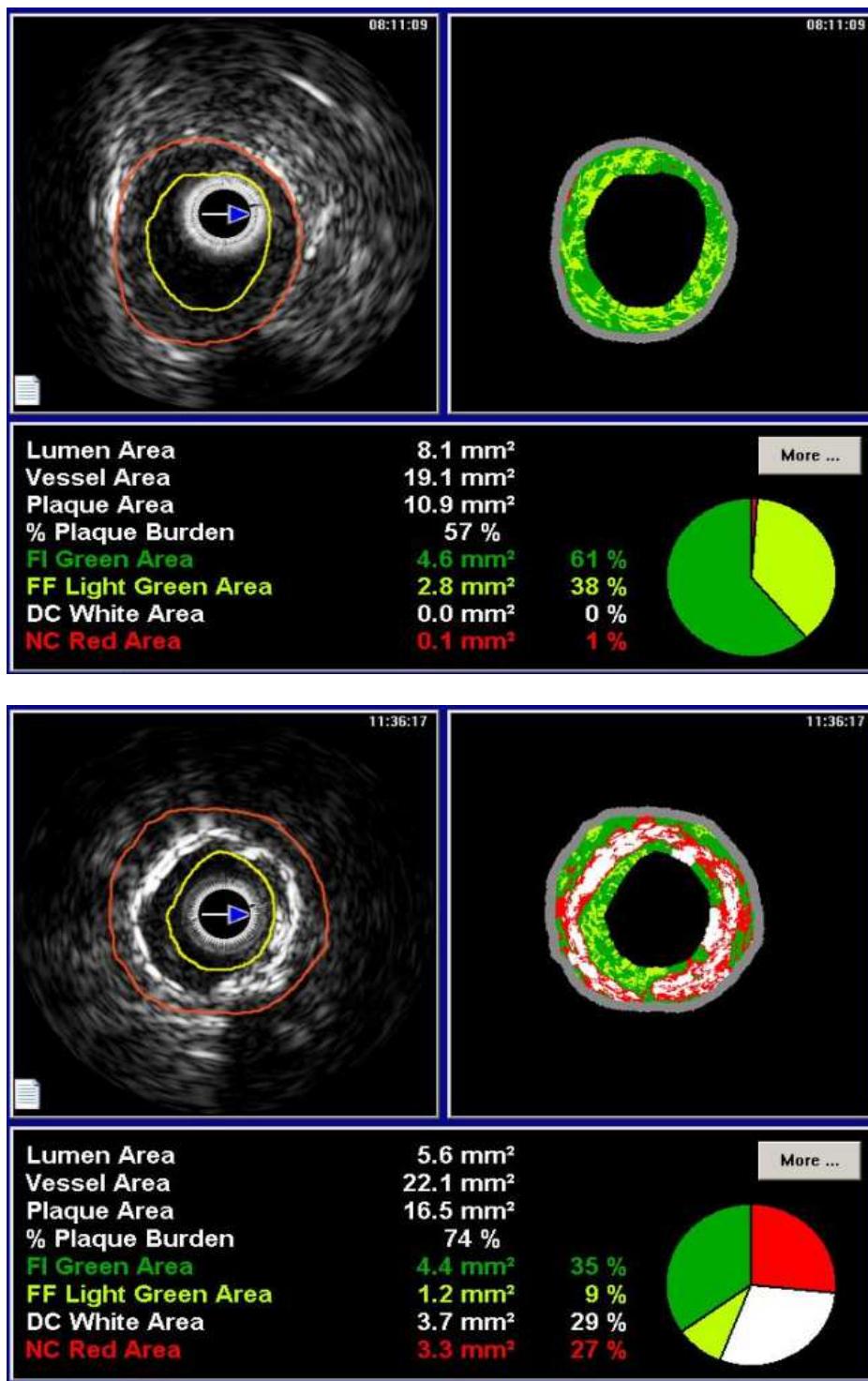


Abbildung VI: Darstellung der Gewebekomponenten anhand der IVUS-VH-Analyse von zwei Gefäßabschnitten mit erheblicher Plaquebildung.

2.5 Statistische Methoden

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden alle metrischen Variablen als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben. Die kategorialen Variablen wurden in ihrer Häufigkeit und als prozentualer Anteil der Gesamtgruppe dargestellt.

Vor Beginn der weiteren statistischen Auswertung wurde für alle Parameter nach Extremwerten gesucht, die weit außerhalb der sonst ermittelten Werte lagen. Diese Ausreißer entsprechen Messwerten, die nicht in die erwartete Messreihe passen und das Ergebnis einer multivariaten Analyse unter Umständen beeinflussen können. Nachdem bei 2 Patienten sehr hohe SPC-Werte und bei 5 Patienten hohe Kreatininwerte auffielen und Messfehler nicht sicher ausgeschlossen werden konnten, wurden insgesamt 7 Patienten von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen, während in der rein deskriptiven Statistik Daten von allen 188 Patienten berücksichtigt wurden, s. Abbildung VII.

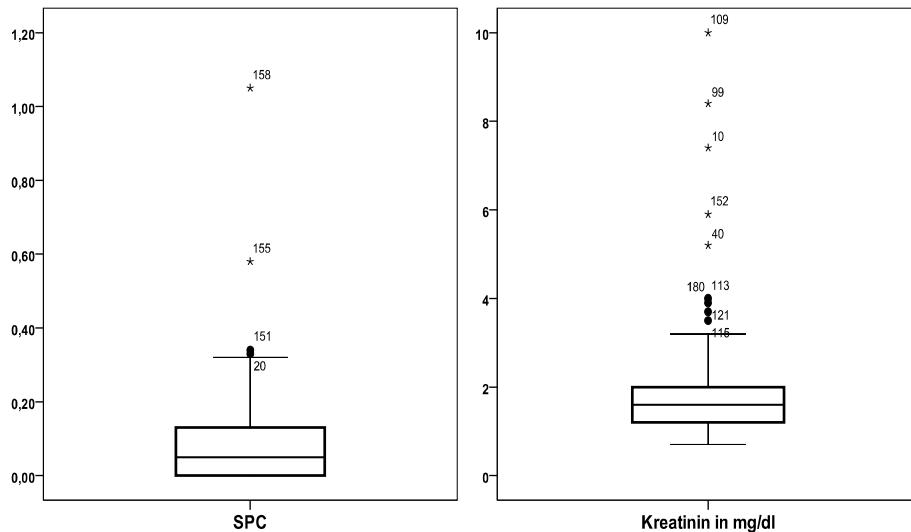


Abbildung VII: Darstellung der Extremwerte.

Auch bei der Analyse der verschiedenen Variablen der IVUS-VH Untersuchungen wurden Extrem-Ausreißer aus der jeweiligen Auswertung herausgenommen, um eine Beeinflussung der multivariaten Statistik auszuschließen. Zunächst wurde univariat getestet, um den Zusammenhang bekannter Risikofaktoren und den im Blut nachgewiesenen Progenitorzellen mit der Entwicklung und Ausprägung der TVP zu untersuchen. Hierbei kamen bei der Analyse zweier kategorialer Variablen der Chi²-Test und bei der Untersuchung zweier metrischer Variablen der Spearman-Korrelationskoeffizient zur Anwendung, da die Variablen keine Normalverteilung aufwiesen. Binär kategoriale Variablen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben auf Zusammenhänge mit metrischen Variablen untersucht, mehrkategoriale Variablen mit dem Kruskal-Wallis-H-Test. Alle Parameter, die hier unter Annahme eines Signifikanzniveaus von $p < 0.05$ eine Korrelation aufwiesen, wurden in der Folge in die Regressionsanalyse eingeschlossen. Um zu überprüfen, ob sich die Gruppe der an TVP erkrankten Patienten von gesunden Patienten hinsichtlich der Risikofaktoren unterschieden, wurde die binär logistische Regression verwandt. Es wurde eine Rückwärts-Selektion nach Wald mit dem Schwellenwert 0.05 gewählt. Die lineare Regression wurde eingesetzt, um den Einfluss der Risikofaktoren auf die verschiedenen IVUS Parameter zu untersuchen. Auch hier wurde die Rückwärts-Selektion mit einem Schwellenwert von 0.05 genutzt. Welche Parameter der IVUS Untersuchung die koronarangiographischen Befunde widerspiegeln, wurde mit dem Mann-Whitney- U- Test untersucht. Für jeden Test wurde 0.05 als Signifikanzniveau festgelegt. Alle Auswertungen erfolgten mit der SPSS Software V 17.0-19.0.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Beschreibung des gesamten Patientenkollektivs

Die Studie umfasste 188 Patienten, wobei 123 (65.4%) Patienten in der HTX Ambulanz der Herzchirurgie Klinikum Großhadern betreut wurden und 65 (34.6%) an die Herztransplantationsambulanz der Medizinischen Poliklinik Innenstadt angebunden waren.

Die Patienten waren im Mittel 58.6 (± 12.7) Jahre alt, 161 (85.6%) Patienten waren männlich, 27 (14.4%) weiblich.

142 Patienten (75.5%) litten unter einer arteriellen Hypertonie, 72 Patienten (38.3%) unter einem Diabetes mellitus und 69 Patienten (36.7%) unter einer Hyperlipidämie. Nur 11 Patienten (5.9%) waren Raucher. Der BMI lag bei einem Mittel von 26.2 (± 5.0) (s. Tabelle III).

Die Patienten waren im Schnitt seit 8.1 Jahren transplantiert (± 5.8), die Ischämiezeit vor Transplantation betrug im Mittel 212.1 Minuten (± 60.7). Das mittlere Spenderalter betrug 36.3 Jahre (± 13.3). 19.2% (N=36) der Patienten erlebten in der Vergangenheit mindestens eine therapiebedürftige, akute Abstoßungsreaktion.

Als kardiale Grunderkrankung vor Transplantation lag bei 59% der Patienten (N=111) eine dilative Kardiomyopathie vor, 23.4% der untersuchten Personen (N=44) mussten aufgrund einer ischämischen Kardiomyopathie transplantiert werden. 17.6% (N=33) litten vor der Transplantation an anderen kardialen Grunderkrankungen, mehrheitlich unter einer hypertrophen Kardiomyopathie (N=16) (s. Tabelle IV).

Einen Calcineurininhibitor als Immunsuppression erhielten 165 Patienten, 119 (63.3%) erhielten Tacrolimus, 46 (24.5%) Patienten Ciclosporin A. 135

Patienten (71.8%) erhielten Mycophenolatmofetil, 38 Sirolimus (20.2%). Die häufigste Kombination bestand aus Tacrolimus und Mycophenolatmofetil (N=86, 45.7%). 23 Patienten (12.2%) erhielten ein Calcineurininhibitor-freies Regime (Sirolimus + Mycophenolatmofetil bzw. Sirolimus + Azathioprin), s. Tabelle III.

Die Leukozytenanzahl lag am Tag der Bestimmung der Progenitorzellen im Durchschnitt bei 6.9 G/l (± 5.3). Der mittlere Wert für Kreatinin wurde mit 1.81 mg/dl (± 1.2) bestimmt (s. Tabelle III).

Patientendaten		Patientenanzahl (N=188)
Alter		58.6 ± 12.7
Geschlecht		
	männlich	161 (85.6%)
	weiblich	27 (14.4%)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren		
Diabetes mellitus		72 (38.3%)
Hyperlipidämie		69 (36.7%)
Arterielle Hypertonie		142 (75.5%)
BMI		26.2 ± 5.02
Rauchen		11 (5.9%)
Transplantatassoziierte Daten		
Zeit nach HTX (Jahre)		8.09 ± 5.76
Spenderalter (Jahre)		36.31 ± 13.25
Ischämiezeit		212.06 ± 60.68
Abstoßungen		36 (19.2%)
Indikation zur HTX (ICM/DCM/andere)		44/ 111/ 33 (23.4%/59%/17.6%)
Immunsuppression		
Tacrolimus		119 (63.3%)
Sirolimus		38 (20.2%)
Mycophenolat		135 (71.8%)
Ciclosporin A		46 (24.5%)
Laborparameter		
Leukozytenwert (G/l)		6.9 ± 5.27
Kreatinin (mg/dl)		1.81 ± 1.16
Pro BNP (pg/ml)		2330.21 ± 4100.3
CRP (mg/dl)		0,87 ± 1.68
Begleitmedikation		
Statin		156 (83%)
ACE-Hemmer		99 (52.7%)
β-Blocker		38 (20.2%)
Kalziumkanal-Blocker		95 (50.5%)
Diuretika		122 (64.9%)

Tabelle III: Beschreibung des gesamten Patientenkollektivs (N=188).

Patientendaten	Patientenzahl (N=188)
Indikation zur HTX	
Dilatative CMP	111 (59%)
Ischämische CMP	44 (23,4%)
Hypertrophische CMP	16 (8,5%)
Angeborene Anomalien	7 (3,7%)
Pulmonale Hypertonie	6 (3,2%)
Restriktive CMP	1 (0,5%)
Muskeldystrophie	1 (0,5%)
Myokarditis	1 (0,5%)
Arythmogene rechtsventrikuläre CMP	1 (0,5%)

Tabelle IV: Indikationen zur Transplantation (N=188).

3.1.2 Beschreibung der Studienpopulation mit IVUS-Daten

Bei 40 Patienten der Gesamtgruppe wurde zusätzlich zur Koronarangiographie ein IVUS durchgeführt. Dieses Kollektiv bestand zu 87.5% aus männlichen Patienten, das Durchschnittsalter lag bei 63.7 Jahren (± 9.1). Während 34 dieser Patienten (85%) unter einer arteriellen Hypertonie litten, waren 16 Patienten (40%) an einem Diabetes mellitus erkrankt und 19 Patienten (47.5%) an einer Hyperlipidämie. 2 Patienten (5%) rauchten. Der BMI lag bei einem Mittelwert von 27.8 (± 6.8).

Die Patienten waren im Mittel seit 8.98 Jahren (± 5.9) transplantiert, 12.5% erlebten in der Vergangenheit mindestens eine therapiebedürftige Abstoßungsreaktion. Das mittlere Spenderalter betrug 37.7 Jahre (± 14.7), die Ischämiezeit vor Transplantation durchschnittlich 216.4 Minuten (± 52).

Zur Suppression des Immunsystems erhielten 23 Patienten (57.5%) Mycophenolat, 25 (62.5%) bekamen Tacrolimus, 14 (35%) Ciclosporin A und 4 Personen Sirolimus (10%) (s. Tabelle V).

Am Tag der Bestimmung der Progenitoren lagen die Leukozytenwerte durchschnittlich bei 6.33 G/l (± 1.7). Der mittlere Wert für Kreatinin wurde mit 1.82 mg/dl (± 1.1) bestimmt.

Patientendaten		Patientenzahl (N=40)
Alter		63.7 ± 9.15
Geschlecht		
	männlich	35 (87.5%)
	weiblich	5 (12.5%)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren		
Diabetes mellitus		16 (40%)
Hyperlipidämie		19 (47.5%)
Arterielle Hypertonie		34 (85%)
BMI		27.78 ± 6.77
Rauchen		2 (5%)
Transplantatassoziierte Daten		
Zeit nach HTX (Jahre)		8.98 ± 5.93
Spenderalter (Jahre)		37.7 ± 14.72
Ischämiezeit		216.37 ± 51.96
Abstoßungen		5 (12.5%)
Indikation zur HTX (ICM/DCM/andere)		12/ 27/ 1 (30%/67.5%/2.5%)
Immunsuppression		
Tacrolimus		25 (62.5%)
Sirolimus		4 (10%)
Mycophenolat		23 (57.5%)
Ciclosporin A		14 (35%)
Laborparameter		
Leukozytenwert (G/l)		6.33 ± 1.7
Kreatinin (mg/dl)		1.82 ± 1.08
Pro BNP (pg/ml)		2286.86 ± 3998.1
CRP (mg/dl)		0.66 ± 0,87
Begleitmedikation		
Statin		33 (82.5%)
ACE-Hemmer		20 (50%)
ß-Blocker		7 (17.5%)
Kalziumkanal-Blocker		23 (57.5%)
Diuretika		29 (72.5%)

Tabelle V: Beschreibung der Patientengruppe mit IVUS-Untersuchung (N=40).

3.2 Koronarangiographische Einschätzung der TVP (Scoring)

In der Angiographie wurden bei 85 Patienten (45.2%) Stenosen der Koronararterien nachgewiesen, während 103 Patienten (54.8%) als angiographisch unauffällig beurteilt wurden (s. Abbildung VIII). Nach der Beurteilung durch das Scoring-System (s. Methoden, Punkt 2.3.2) zeigten 39 Patienten (20.7%) eine minimal ausgeprägte, 22 Patienten (11.7%) eine milde, 5 Patienten (2.7%) eine moderate und 19 Patienten (10.1%) eine schwere Form der TVP (s. Abbildung IX). Bei 23 Patienten (12.2%) wurde bereits im Vorfeld eine Stentimplantation durchgeführt.

Bei 9.6% (N=18) der Fälle waren nur die proximalen Segmente von der TVP betroffen, während bei 19.1% (N=36) alle Segmente betroffen waren. In 16.5% (N=31) waren nur die distalen Segmente betroffen.

Von den 40 Patienten der IVUS-Gruppe wiesen 22 (55%) angiographisch eine TVP auf.

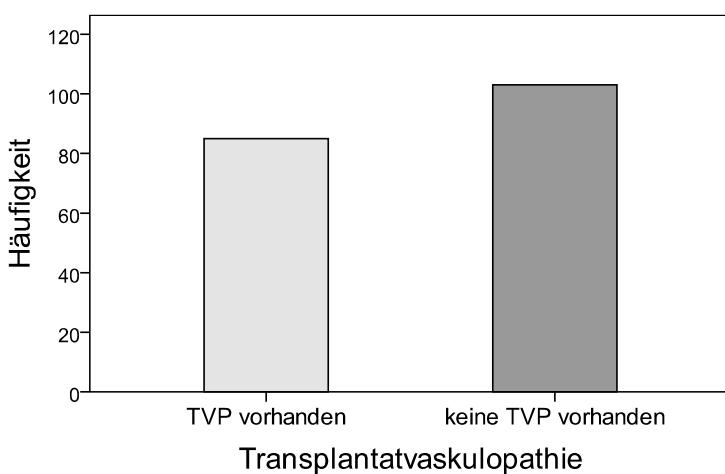


Abbildung VIII: Häufigkeit des Vorliegens einer TVP anhand koronarangiographischer Diagnostik (N=188).

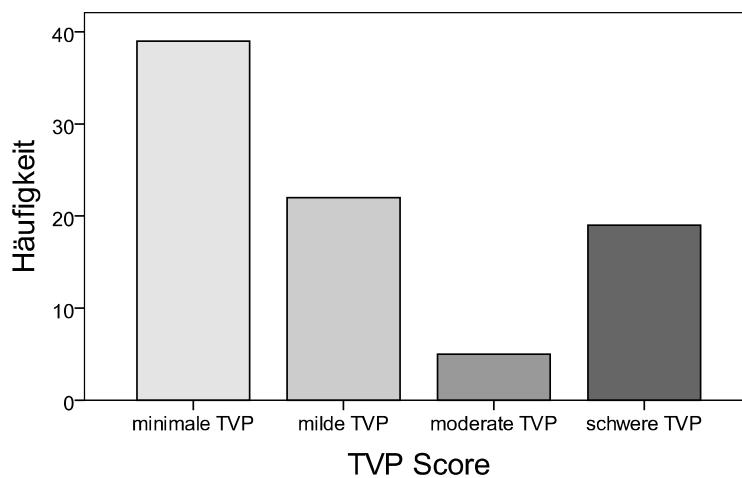


Abbildung IX: Verteilung der Schweregrade der TVP innerhalb der Gesamtgruppe analysiert anhand des TVP-Score Systems (N=188).

3.3 Einflussfaktoren auf das Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie

3.3.1 Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie und Patientencharakteristika

In Tabelle VI sind die Daten der Patienten, die unter einer TVP leiden, mit den Daten der Patienten, die keine TVP aufweisen verglichen. Als erkrankt galt dabei jeder Patient, bei dem mindestens eine minimale Form der Transplantatvaskulopathie diagnostiziert wurde.

In die Auswertung waren in der Folge noch 181 Patienten eingeschlossen, da 7 Patienten, bei denen in der deskriptiven Statistik Extremwerte aufgefallen waren, aus der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen wurden (s. 2.5 Statistische Methoden).

Die beiden Patientengruppen unterschieden sich nicht bezüglich des Geschlechts ($p=0.2$). Je älter die Patienten waren, desto häufiger hatten sie eine angiographisch nachweisbare TVP ($p=0.057$).

3.3.2 Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie und kardiovaskulären Risikofaktoren

Die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren unterschieden sich in den beiden Gruppen nicht wesentlich voneinander. Während 75.5% (N=77) der Patienten ohne angiographisch nachweisbare TVP eine arterielle Hypertonie aufwiesen, waren es 78.5% (N=62) der Patienten, die unter einer TVP litten ($p=0.64$). Auch ein Diabetes mellitus fiel mit 41.2% (N=42) bzw. 35.4% (N=28) in ähnlicher Häufigkeit auf ($p=0.43$).

Der Nachweis einer Hyperlipidämie war in der TVP-Gruppe etwas häufiger als in der Vergleichsgruppe (44.3% versus 30.4% ($p=0.054$)). Lediglich

bezüglich des Body Mass Index zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. So war der BMI mit 25.5 ± 5 bei den Patienten ohne TVP signifikant niedriger als in der Gruppe der erkrankten Patienten mit einem BMI von 27.3 ± 5 ($p=0.01$). Die Daten sind in der Tabelle VI zusammengefasst aufgeführt.

3.3.3 Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie und HTX assoziierten Risikofaktoren

Es zeigte sich, dass die Spender der an einer TVP erkrankten Patienten mit 39.2 ± 13.2 Jahren im Durchschnitt älter waren, als die der Patienten ohne TVP, die im Mittel 34.3 ± 13 Jahre alt waren ($p=0.031$). Des Weiteren war die von der TVP betroffene Gruppe mit durchschnittlich 9.3 ± 6.2 Jahren länger transplantiert als die Vergleichsgruppe, die durchschnittlich 6.9 ± 5 Jahre transplantiert war ($p=0.011$).

Die initiale Ischämiezeit unterschied sich in diesem Kollektiv nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen, 224.1 ± 58.6 min bei den nicht betroffenen vs. 202.8 ± 58.7 min bei den betroffenen Patienten ($p=0.09$). Auch bezüglich der Anzahl der Patienten, die bereits therapiebedürftige akute Abstoßungsreaktionen erlebt haben, zeigte sich in unserer Population kein signifikanter Unterschied. So erlebten 19 (24.1%) Patienten mit TVP und 16 (15.7%) ohne TVP mindestens eine Abstoßungsreaktion ($p=0.09$).

Allerdings unterschieden sich die Indikationen, die zur Transplantation geführt haben. Patienten, bei denen keine TVP festgestellt wurde, wurden vermehrt aufgrund einer ischämischen Kardiomyopathie transplantiert, während Patienten, denen eine TVP nachgewiesen werden konnte, eher unter einer dilatativen Kardiomyopathie litten, bevor sie ein neues Organ

erhielten ($p=0,019$). Die Daten sind in der Tabelle VI zusammengefasst aufgeführt.

3.3.4 Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie und der immunsuppressiven Therapie

Auch die immunsuppressive Therapie schien einen Einfluss auf die Entwicklung der TVP zu haben. So zeigte sich in unserem Kollektiv, dass bei 75% (N=27) der Patienten, die eine Sirolimus-haltige Immunsuppression erhielten, keine Transplantatvaskulopathie nachweisbar war ($p=0.01$). Im Gegensatz dazu litten 65.1% der Patienten, die Ciclosporin in ihrem Therapieschema hatten, an einer TVP ($p=0.001$).

Eine Immunsuppression mit Mycophenolatmofetil schien keinen Einfluss auf die Entwicklung einer TVP zu haben (74.5% der Patienten ohne TVP, 68.4% der Patienten mit TVP, $p=0.36$), während Tacrolimus in der Gruppe ohne Nachweis einer TVP etwas häufiger eingenommen wurde (70.6% der nicht betroffenen Patienten, 57% der betroffenen Patienten, $p=0.058$). Die Daten sind in der Tabelle VI zusammengefasst aufgeführt.

3.3.5 Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie und Laborparametern

Laborwerte, die bei den von der TVP betroffenen Patienten pathologisch verändert waren, waren einerseits das Kreatinin, andererseits das pro-BNP. So betrug das Kreatinin im Durchschnitt 1.8 ± 0.7 mg/dl bei den Patienten mit TVP und nur 1.6 ± 0.5 mg/dl bei Patienten ohne TVP ($p=0.041$). Das pro-BNP war mit 2243.2 ± 2233.2 bei den betroffenen Patienten signifikant höher als bei den nicht betroffenen mit 970.5 ± 875.5 ($p=0.023$). Die Daten sind in der Tabelle VI zusammengefasst aufgeführt.

3.3.6 Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie und der Begleitmedikation

Entsprechend ähnlicher Hypertonieprävalenz unterschieden sich die beiden Populationen nicht hinsichtlich ihrer Hypertoniemedikation. Diuretika wurden von 61.8% (N=63) der Patienten ohne TVP und von 72.2% (N=57) der Patienten mit TVP eingenommen ($p=0.14$). Auch in der Therapie mit ACE-Hemmern (53.9% der nicht Betroffenen, 51.9% der Erkrankten, $p=0.79$), β -Blockern (16.7% der Gesunden, 22.8% der Erkrankten, $p=0.3$) und Kalziumkanalblockern (51% der Gesunden, 51.9% der Erkrankten, $p=0.9$) unterschieden sich die beiden Gruppen nicht. In beiden Gruppen hatte die überwiegende Anzahl der Patienten eine Statintherapie (81.4% vs. 86.1%; $p=0.4$). Die Daten sind in der Tabelle VI zusammengefasst aufgeführt.

	Keine TVP (n=102)	TVP (n=79)	p-Wert
Alter	56.4 ±13.6	60.7 ± 11.1	0.057
Geschlecht %			0.2
Männlich	83.3	89.9	
Weiblich	16.7	10.1	
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Diabetes mellitus	42 (41.2%)	28 (35.4%)	0.43
Hyperlipidämie	31 (30.4%)	35 (44.3%)	0.054
Arterielle Hypertonie	77 (75.5%)	62 (78.5%)	0.64
BMI	25.5 ± 5 (n=97)	27.3 ± 5 (n=70)	0.01
Transplantatassoziierte Daten			
Zeit nach HTX (Jahre)	6.9 ± 5 (n=102)	9.3 ± 6.2 (N=79)	0.011
Spenderalter (Jahre)	34.3 ± 13 (N=70)	39.2 ± 13.2 (N=66)	0.031
Ischämiezeit	224.1 ± 58.6 (N=65)	202.8 ± 58.7 (N=53)	0.09
Abstoßungen	16 (15.7%)	19 (24.1%)	0.21
Indikation zur HTX (ICM/DCM/andere)	29/53/20	15/52/12	0.019
Immunsuppression			
Tacrolimus	72 (70.6%)	45 (57%)	0.058
Sirolimus	27 (26.5%)	9 (11.4%)	0.01
Mycophenolat	76 (74.5%)	54 (68.4%)	0.362
Ciclosporin A	15 (14.7%)	28 (35.4%)	0.001
Laborparameter			
Leukozytenwert (G/l)	6.7 ± 2.0 (N=99)	7.3 ± 7.8 (N=75)	0.74
Kreatinin (mg/dl)	1.6 ± 0.5 (N=100)	1.8 ± 0.7 (N=74)	0.041
Pro BNP (pg/ml)	970.5 ± 875.5 (N=26)	2243.2 ± 2233.2 (N=27)	0.023
CRP (mg/dl)	0.8 ± 1.3 (N=80)	0.8 ± 1.8 (N=56)	0.81
Begleitmedikation			
Statin	83 (81.4%)	68 (86.1%)	0.4
ACE-Hemmer	55 (53.9%)	41 (51.9%)	0.79
β-Blocker	17 (16.7%)	18 (22.8%)	0.30
Kalziumkanal-Blocker	52 (51%)	41 (51.9%)	0.90
Diuretika	63 (61.8%)	57 (72.2%)	0.14

Tabelle VI: Vergleich der an einer TVP erkrankten Patienten mit den koronargesunden Patienten hinsichtlich Einflussfaktoren, die für das Entstehen einer TVP eine Rolle spielen (N=181).

3.4 Vaskuläre Progenitorzellen

3.4.1 Bestimmung von glattmuskulären und endothelialen Progenitorzellen

Der Nachweis CD34+/CD140b+ glattmuskulärer Progenitoren („smooth muscle progenitor cells“, SPC) im peripheren Blut gelang bei 119 Patienten (63.6%). Im Durchschnitt wurden 0.824 ± 0.12 glattmuskuläre Vorläuferzellen pro 1000 Leukozyten festgestellt. Bei 69 Patienten waren keine SPCs nachweisbar.

Endotheliale Progenitoren (CD34+/KDR+, „endothelial progenitor cells“ EPC) wurden bei 51.6% der Patienten (N=97) ermittelt, der durchschnittliche Wert betrug 0.495 ± 0.07 pro 1000 Leukozyten. 91 Patienten wiesen keine endothelialen Vorläuferzellen auf (Tabelle VII).

	Patientenzahl (N=188)
Anzahl der Patienten mit CD34 ⁺ CD140b ⁺ SPCs	119 (63.3%)
Anzahl der Patienten mit CD34 ⁺ KDR ⁺ EPCs	97 (51.6%)

Tabelle VII: Anzahl der Patienten mit positivem Nachweis zirkulierender vaskulärer Progenitoren (N=188).

3.4.2 Korrelation zwischen zirkulierenden Progenitoren und dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie

Bei Patienten mit TVP waren deutlich häufiger CD34+/CD140b+ Zellen nachweisbar (80%, N=68) als bei Patienten ohne TVP (49.5%, N=51, p<0.001, s. Tabelle VIII).

Im Gegensatz dazu wurden die endothelialen Vorläuferzellen (CD34+/KDR+, EPC) sowohl bei erkrankten als auch bei gesunden Patienten in ähnlicher Häufigkeit festgestellt (48.2% vs. 54.4% p=0.4, s. Tabelle VIII).

	Keine TVP (n=102)	TVP (n=79)	p-Wert
Anzahl der Patienten mit CD34 ⁺ CD140b ⁺ SPCs	50 (49.0%)	63 (79.8%)	<0.001
Anzahl der Patienten mit CD34 ⁺ KDR ⁺ EPCs	55 (53.9%)	38 (48.1%)	0.44

Tabelle VIII: Korrelation zwischen dem angiographischen Vorliegen einer TVP und dem positiven Nachweis zirkulierender vaskulärer Progenitorzellen im Blut (N=181).

3.5 Korrelation zwischen klinischen Faktoren und dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie: Multivariate Analyse

Um zu überprüfen, welche der untersuchten Parameter in unserer Patientenpopulation unabhängig die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie beeinflussen, wurde eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt. In dieser Analyse wurden nur jene Parameter berücksichtigt, die zuvor in der bivariaten Analyse ein Signifikanzniveau von mindestens 0.05 aufwiesen (Spenderalter, Transplantationsjahre, Kreatinin, Therapie mit Sirolimus bzw. Ciclosporin, glattmuskuläre Progenitorzellen).

Als unabhängige, die TVP beeinflussende Parameter wurden die glattmuskulären Progenitoren ($p<0.001$), die Therapie mit Ciclosporin ($p=0.002$), das Spenderalter ($p=0.003$) und ein erhöhter Kreatininwert ($p=0.015$) ermittelt (Tabelle IX).

Einflussfaktoren auf TVP	p-Wert
glattmuskuläre Progenitoren	<0.001
Cyclosporintherapie	0.002
Spenderalter	0.003
Kreatinin	0.015

Tabelle IX: Unabhängige Einflussfaktoren auf die TVP nach multivariater Analyse.

3.6 Charakterisierung der IVUS Parameter bei der TVP

Das absolute Plaquevolumen in den proximalen 20mm der untersuchten Koronarien betrug im Mittel $141.44 \pm 56.8 \text{ mm}^3$ und in den ersten 30mm $208.47 \pm 82.0 \text{ mm}^3$. Sowohl die Plaquelast ($35.74\% \pm 10.0$ vs. $37.05\% \pm 9.3$) als auch die maximale Plaquefläche ($11.05 \pm 4.6 \text{ mm}^2$ vs. $11.59 \pm 4.2 \text{ mm}^2$) nahm im Gefäßverlauf eher relativ zur Gefäßfläche zu.

Die minimale Lumenfläche (MLA) betrug in den proximalen 20mm bzw. 30mm der untersuchten Gefäße $8.87 \pm 3.2 \text{ mm}^2$ bzw. $7.44 \pm 4.6 \text{ mm}^2$.

Die Detektion der Plaquezusammensetzung durch die IVUS-Radiofrequenzanalyse („virtual histology™“) war in beiden untersuchten Segmenten vergleichbar. Die Plaques bestanden überwiegend aus fibrotischem Material (56.33%). Der fibrotisch-lipidhaltige Anteil machte durchschnittlich 16.28% aus, 10.41% waren kalkhaltige und 17.03% nekrotische Areale (Tabelle X).

	20mm	30mm
Plaquevolumen in mm^3	141.44 ± 56.8	208.47 ± 82.0
Plaquelast in %	36.74 ± 10	37.05 ± 9.3
maximale Plaquefläche in mm^2	11.05 ± 4.6	11.59 ± 4.2
minimale Lumenfläche in mm^2	8.87 ± 3.2	7.44 ± 3.0
Fibrotischer Anteil in %	56.08 ± 11.3	56.58 ± 10.6
Fibrotisch- lipidhaltiger Anteil in %	16.3 ± 13.1	16.26 ± 12.3
Kalkhaltiger Anteil in %	10.35 ± 11.6	10.47 ± 11.1
Nekrotischer Anteil in %	17.48 ± 9.6	16.58 ± 9.1

Tabelle X: IVUS und IVUS-VH Analyse der Koronargefäße in den proximalen Gefäßabschnitten (20mm bzw. 30mm).

3.7 Korrelation der IVUS bzw. IVUS-VH Parameter mit der Koronarangiographie

Die Korrelation der angiographischen Beurteilung über das Vorliegen einer TVP mit den IVUS Daten ist in Tabelle XI dargestellt. Für die weitere Analyse der IVUS Auswertung wurden nur die Daten des proximalen 20mm-Gefäßsegmentes verwertet. Der angiographische Nachweis einer TVP (55%, N=22) korrelierte sehr gut mit der maximalen Plaquefläche ($p=0.026$), der Plaquelast ($p=0.007$), der geringsten Lumenfläche ($p=0.027$) und mit dem Plaquevolumen ($p=0.047$).

Hingegen war keine Korrelation der histologischen Parameter der IVUS-VH Plaqueanalyse mit der angiographisch beurteilten TVP zu finden (Tabelle XI).

	Keine TVP (N=18)	TVP (N=22)	p-Wert
IVUS			
Plaquevolumen in mm ³	121.38 \pm 41.6	157.85 \pm 63	0.047
Plaquelast in %	30.93 \pm 8.1	39.67 \pm 9.7	0.007
maximale Plaquefläche in mm ²	9.45 \pm 3.7	12.64 \pm 4.8	0.026
minimale Lumenfläche in mm ²	9.73 \pm 2.9	8.16 \pm 3.3	0.027
IVUS VH			
Fibrotischer Anteil in %	59.22 \pm 9.8	53.50 \pm 12.0	0.118
Fibrotisch - lipidhaltiger Anteil in %	16.28 \pm 12.2	16.32 \pm 14.1	0.913
Kalkhaltiger Anteil in %	8.11 \pm 8.3	12.18 \pm 13.6	0.333
Nekrotischer Anteil in %	16.67 \pm 10.8	18.14 \pm 8.8	0.744

Tabelle XI: Vergleich der an einer TVP erkrankten Patienten mit den koronargesunden Patienten hinsichtlich IVUS und IVUS-VH Parametern (N=40).

3.8 Korrelation der IVUS Parameter mit klinischen Daten

3.8.1 Korrelation zwischen IVUS Parametern und den Patientencharakteristika

Die Parameter des IVUS zeigten ebenso wie die koronarangiographisch diagnostizierte TVP keinen geschlechtsspezifischen Unterschied. Im Gegensatz zur angiographisch diagnostizierten TVP ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Patientenalter und dem mittels IVUS festgestellten Erkrankungsstatus zeigen (Tabelle XII).

3.8.2 Korrelation zwischen IVUS Parametern und den kardiovaskulären Risikofaktoren

Wie bereits die koronarangiographisch diagnostizierte TVP, zeigten auch die IVUS Parameter keine Korrelation mit dem Vorliegen eines Diabetes mellitus, einer Hyperlipidämie oder einer arteriellen Hypertonie. Darüber hinaus wurde mit den IVUS Daten kein Zusammenhang zwischen dem BMI und dem Vorliegen einer TVP gefunden (Tabelle XII).

3.8.3 Korrelation zwischen IVUS Parametern und HTX assoziierten Risikofaktoren

Die Transplantationsjahre korrelierten mit der maximalen Plaquefläche ($p=0.023$) und dem Plaquevolumen ($p=0.011$). Darüber hinaus zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Spenderalter und der minimalen Lumenfläche: je älter der Spender, desto geringer die minimale Lumenfläche ($p=0.032$). Die Grunderkrankung vor der Transplantation, die Ischämiezeit und die Anzahl der stattgefundenen Abstoßungsreaktionen zeigten keine Korrelation mit den IVUS-Parametern (Tabelle XII).

3.8.4 Korrelation zwischen IVUS Parametern und der immunsuppressiven Therapie

Eine Therapie mit Sirolimus zeigte einen Zusammenhang mit der Plaquelast ($p=0.02$) und dem minimalen Lumen ($p=0.021$). Es zeigte sich die Tendenz, dass unter dieser Therapie die Plaquelast geringer und die minimale Lumenfläche größer war als ohne Sirolimustherapie. Auch die Immunsuppression mit Tacrolimus beeinflusste das Plaquevolumen negativ ($p=0.044$). Im Gegensatz dazu korrelierte eine Therapie mit Ciclosporin gleichsinnig mit dem Plaquevolumen ($p=0.02$) und der maximalen Plaquefläche ($p=0.043$) (Tabelle XII).

3.8.5 Korrelation zwischen IVUS Parametern und Laborparametern

Das Vorliegen einer Niereninsuffizienz korrelierte mit dem Plaquevolumen ($p=<0.001$), der Plaquelast ($p=0.036$) und der maximalen Plaquefläche ($p=0.042$). Zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und der Plaquefläche ($p=0.048$) (Tabelle XII).

3.8.6 Korrelation zwischen IVUS Parametern und der Begleitmedikation

Die Begleitmedikation hatte in unserem Kollektiv auf keinen der erhobenen IVUS-Parameter Einfluss (Tabelle XII).

	Plaquevolumen	Plaquelast	Max. Plaquefläche	Min. Lumenfläche
Alter	0.17	0.39	0.7	0.27
Geschlecht %	0.95	0.82	0.98	0.91
männlich	87.2			
weiblich	12.8			
Kardiovaskuläre Risikofaktoren				
Diabetes mellitus	0.60	0.28	0.42	0.27
Hyperlipidämie	0.84	0.97	0.75	0.52
Arterielle Hypertonie	0.66	0.66	0.72	0.64
BMI	0.30	0.62	0.22	0.51
Transplantatassoziierte Daten				
Zeit nach HTX (Jahre)	0.011	0.14	0.023	0.79
Spenderalter (Jahre)	0.96	0.14	0.98	0.032
Ischämiezeit	0.2	0.45	0.25	0.89
Abstoßungen	0.28	0.52	0.35	0.62
Indikation zur HTX (ICM/DCM/andere)	0.51	0.62	0.54	0.92
Immunsuppression				
Tacrolimus	0.044	0.76	0.1	0.51
Sirolimus	0.2	0.02	0.23	0.021
Mycophenolat	0.49	0.70	0.62	0.17
Ciclosporin A	0.02	0.65	0.043	0.5
Laborparameter				
Leukozytenwert (G/l)	0.048	0.1	0.16	0.57
Kreatinin (mg/dl)	<0.001	0.036	0.042	0.84
Pro BNP (pg/ml)	0.06	0.07	0.16	0.43
CRP (mg/dl)	0.69	0.8	0.75	0.37
Begleitmedikation				
Statin	0.29	0.33	0.3	0.99
ACE-Hemmer	0.55	0.28	0.84	0.3
ß-Blocker	0.68	0.26	0.46	0.1
Kalziumkanal-Blocker	0.32	0.54	0.26	0.5
Diuretika	0.06	0.67	0.16	0.29

Tabelle XII: Korrelation der IVUS Parameter mit untersuchten klinischen Einflussfaktoren, die möglicherweise für die Entwicklung einer TVP eine Rolle spielen. Dargestellt sind die P-Werte; N=40.

3.9 Korrelation der IVUS-VH Parameter mit klinischen Daten

3.9.1 Korrelation zwischen IVUS-VH Parametern und den Patientencharakteristika

Bei der IVUS-VH Analyse zeigte sich eine gleichsinnige Beziehung zwischen dem Patientenalter und kalkhaltigen Arealen der Plaques ($p=0.047$) (Tabelle XIII).

3.9.2 Korrelation zwischen IVUS-VH Parametern und den kardiovaskulären Risikofaktoren

Zwischen dem fibrotischen Plaqueanteil und dem Vorliegen einer arteriellen Hypertonie zeigte sich ein gegenläufiger Zusammenhang: Der fibrotische Anteil am Plaque war bei Vorliegen einer Hypertonie tendenziell geringer ausgeprägt ($p=0.027$) (Tabelle XIII).

3.9.3 Korrelation zwischen IVUS-VH Parametern und HTX assoziierten Risikofaktoren

Die Transplantationsjahre korrelierten zum einen mit dem kalkhaltigen Plaqueanteil ($p=0.028$), zeigten jedoch auch einen gegenläufigen Zusammenhang mit dem fibrotischen Plaqueanteil ($p=<0.001$). Das heißt: Je länger die Transplantation zurücklag, desto größer war der kalkhaltige Plaqueanteil und desto geringer der fibrotische (Tabelle XIII).

3.9.4 Korrelation zwischen IVUS-VH Parametern und der immunsuppressiven Therapie

Die Einnahme von Ciclosporin korrelierte gegensinnig mit dem Fibroseanteil in der Plaque. Es zeigte sich also, dass unter der Ciclosporintherapie eher weniger fibrotisches Material in der Plaque war.

Eine Therapie mit Mycophenolat dagegen korrelierte gleichsinnig mit dem Fibroseanteil ($p=0.011$) und gegensinnig mit dem Kalkanteil ($p=0.007$) in der Plaque.

Die Therapie mit Tacrolimus zeigte einen Zusammenhang mit dem Anteil an Nekrose in der Plaque ($p=0.04$) (Tabelle XIII).

3.9.5 Korrelation zwischen IVUS-VH Parametern und Laborparametern

Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Leukozytenzahl und dem fibrotisch-lipidhaltigen Anteil der Plaque ($p=0.029$) (Tabelle XIII).

3.9.6 Korrelation zwischen IVUS-VH Parametern und der Begleitmedikation

Die Begleitmedikation hatte in unserem Kollektiv auf keinen der erhobenen IVUS-VH-Parameter Einfluss (Tabelle XIII).

	Fibrotischer Anteil	Fibrotisch-lipider Anteil	Kalkhaltiger Anteil	Nekrotischer Anteil
Alter	0.9	0.14	0.047	0.2
Geschlecht %	0.63	0.61	0.25	0.52
männlich	87.2			
weiblich	12.8			
Kardiovaskuläre Risikofaktoren				
Diabetes mellitus	0.88	0.24	0.5	0.27
Hyperlipidämie	0.38	0.94	0.92	0.96
Arterielle Hypertonie	0.027	0.75	0.36	0.81
BMI	0.94	0.35	0.6	0.44
Transplantatassoziierte Daten				
Zeit nach HTX (Jahre)	<0.001	0.71	0.028	0.78
Spenderalter (Jahre)	0.41	0.62	0.78	0.93
Ischämiezeit	0.6	0.08	0.23	0.34
Abstoßungen	0.52	0.28	0.34	0.72
Indikation zur HTX (ICM/DCM/andere)	0.38	0.31	0.18	0.3
Immunsuppression				
Tacrolimus	0.11	0.08	0.60	0.04
Sirolimus	0.88	0.91	0.91	0.98
Mycophenolat	0.011	0.18	0.007	0.13
Ciclosporin A	0.045	0.12	0.7	0.08
Laborparameter				
Leukozytenwert (G/l)	0.58	0.029	0.45	0.11
Kreatinin (mg/dl)	0.31	0.94	0.89	0.7
Pro BNP (pg/ml)	0.11	0.21	0.38	0.43
CRP (mg/dl)	0.4	0.66	0.81	0.42
Begleitmedikation				
Statin	0.81	0.7	0.23	0.97
ACE-Hemmer	0.82	0.43	0.61	0.7
ß-Blocker	0.31	0.44	0.44	0.44
Kalziumkanal-Blocker	0.98	0.11	0.52	0.25
Diuretika	0.42	0.11	0.32	0.15

Tabelle XIII: Korrelation der IVUS-VH Parameter mit klinischen Einflussfaktoren, die möglicherweise bei der Pathogenese einer TVP beteiligt sind. Dargestellt sind die P-Werte; N=40.

3.10 Korrelation zwischen zirkulierenden vaskulären Progenitoren und IVUS- sowie IVUS-VH-Parametern

Von insgesamt 40 Patienten mit IVUS-VH Daten gelang bei 26 Patienten (65%) der Nachweis von CD34+/CD140b+ glattmuskulären Progenitoren, während der Nachweis endothelialer Vorläuferzellen (CD34+/KDR+) bei 25 (62.5%) Patienten gezeigt werden konnte (Tabelle XIV).

	Patientenzahl (N=40)
Anzahl der Patienten mit CD34 ⁺ CD140b ⁺ SPCs	26 (65%)
Anzahl der Patienten mit CD34 ⁺ KDR ⁺ EPCs	25 (62.5%)

Tabelle XIV: Anzahl der Patienten mit positivem Nachweis zirkulierender vaskulärer Progenitoren in der Gruppe der Patienten mit IVUS Untersuchung (N=40).

Eine Assoziation mit glattmuskulären oder endothelialen Progenitoren konnte für keinen der IVUS- bzw. IVUS-VH Parameter gefunden werden (Tabellen XV und XVI).

	Plaquevolumen	Plaquelast	Max. Plaquefläche	Min. Lumenfläche
Nachweis von CD34 ⁺ CD140b ⁺ SPCs	0.68	0.34	0.94	0.48
Nachweis von CD34 ⁺ KDR ⁺ EPCs	0.36	0.56	0.41	0.31

Tabelle XV: Korrelation der IVUS-Parameter mit den Progenitoren (P-Werte).

	Fibrotischer Anteil	Fibrotisch- lipidhaltiger Anteil	Kalkhaltiger Anteil	Nekrotischer Anteil
Nachweis von CD34 ⁺ CD140b ⁺ SPCs	0.65	0.32	0.14	0.97
Nachweis von CD34 ⁺ KDR ⁺ EPCs	0.62	0.51	0.88	0.51

Tabelle XVI: Korrelation der IVUS-VH-Parameter mit den Progenitoren (P-Werte).

3.11 Korrelation zwischen klinischen Faktoren und IVUS Parametern – Multivariate Analyse

Eine multivariate Analyse wurde durchgeführt, um zu überprüfen, welche Parameter in unserer Patientenpopulation unabhängig die IVUS-Parameter beeinflussen. Berücksichtigt wurden lediglich die klinischen Parameter, die zuvor in der bivariaten Analyse ein Signifikanzniveau von mindestens 0.05 aufwiesen.

Es zeigte sich als unabhängiger Risikofaktor der Zeitpunkt der Transplantation: Je länger die Patienten transplantiert waren, desto größer war die Plaquefläche ($p=0.004$) und die maximale Plaquefläche ($p=0.005$).

Ebenso korrelierte das erhöhte Kreatinin positiv mit der Plaquefläche ($p=0.012$) und der Plaquelast ($p=0.045$).

Als weitere unabhängige Einflussfaktoren auf die minimale Lumenfläche konnten das Spenderalter und die Therapie mit Sirolimus identifiziert werden, wobei ein niedriges Spenderalter und die Therapie mit Sirolimus jeweils mit größeren Lumenflächen einhergingen (Tabelle XVII).

	Plaquevolumen	Plaquelast	Max. Plaquefläche	Min. Lumenfläche
Transplantatassoziierte Daten				
Zeit nach HTX (Jahre)	0.004	ns	0.005	ns
Spenderalter (Jahre)	ns	ns	ns	0.002
Immunsuppression				
Sirolimus	ns	ns	ns	0.026
Laborparameter				
Kreatinin (mg/dl)	0.012	0.045	ns	ns

Tabelle XVII: Unabhängige Einflussfaktoren auf die IVUS Parameter nach multivariater Analyse (P-Werte).

3.12 Korrelation zwischen klinischen Faktoren und IVUS-VH-Parametern – Multivariate Analyse

Eine multivariate Analyse unter Berücksichtigung von IVUS-VH Parametern zeigte einen Zusammenhang zwischen dem Patientenalter und dem Kalkanteil im Plaque: Je älter die Patienten waren, desto größer war der Kalkanteil ($p=0.027$).

Zudem erschienen auch hier die Transplantationsjahre als Risikofaktor: Je länger die Transplantation vergangen war, desto geringer war der fibrotische Anteil im Plaque ($p<0.001$).

Auch die Immunsuppression fiel als unabhängiger Einflussfaktor auf: Während die Einnahme von Tacrolimus mit einem höheren nekrotischen Anteil assoziiert war ($p=0.048$), ergab sich ein Zusammenhang zwischen der Einnahme mit Mycophenolat und einem niedrigen Kalkanteil ($p<0.001$) (Tabelle XVIII).

	Fibrotischer Anteil	Fibrotisch-lipidhaltiger Anteil	Kalkhaltiger Anteil	Nekrotischer Anteil
Alter	ns	ns	0.027	ns
Transplantatassoziierte Daten				
Zeit nach HTX (Jahre)	<0.001	ns	ns	ns
Immunsuppression				
Tacrolimus	ns	ns	ns	0.048
Mycophenolat	ns	ns	<0.001	ns

Tabelle XVIII: Unabhängige Einflussfaktoren auf die IVUS-VH Parameter nach multivariater Analyse (P-Werte).

4 Diskussion

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Patientenpopulation

Der Vergleich mit den Daten des aktuellen Reports der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) aus dem Jahr 2009 zeigt, dass die Studienpopulation der vorgelegten Arbeit ein repräsentatives Kollektiv herztransplantiertener Patienten darstellt (Taylor et al. 2009).

So entsprechen sowohl das mittlere Empfängeralter (50.48 ± 12.42 , N=188) als auch das Alter der Spender (36.3 ± 13.3 , N=188) dem internationalen Durchschnitt (51.4 ± 12.4 und 33.6 ± 13).

In der Auswertung der Daten der ISHLT ergaben sich 10 Jahre nach Transplantation hohe Prävalenzen der kardiovaskulären Risikofaktoren, die sich in der hier untersuchten Gruppe nur zum Teil wiederspiegeln. Dem internationalen Durchschnitt von 39% entsprechend, litten 38.3% unter einem Diabetes mellitus. Allerdings liegt die Rate der Patienten mit einer arteriellen Hypertonie mit 76% deutlich unter der Vergleichsgruppe der ISHLT mit 97%. Noch deutlicher wird der Unterschied bei der Betrachtung der Hyperlipidämie. Hieran litten nur 36.7% unseres Patientenkollektivs im Gegensatz zu 93% der Transplantierten im Bericht der ISHLT. Dieser Unterschied könnte auf der Tatsache beruhen, dass unser Patientenkollektiv zwar im Schnitt seit 8.1 Jahren transplantiert ist, aber auch einige Patienten enthält, die vor deutlich kürzerer Zeit ihr neues Organ erhielten, während sich die Angaben der ISHLT ausschließlich auf Patienten beziehen, die seit 10 Jahren transplantiert sind. So zeigten 49% der von der ISHLT untersuchten Patienten 1 Jahr nach der Transplantation noch keine relevante Hyperlipidämie.

Während die ISHLT in einer Gesamtgruppe von 6175 Patienten in 27.7% mindestens eine therapiebedürftige Abstoßungsreaktion gemeldet wurde, fiel dies in unserer Population nur bei 19.2% auf. Im Gegensatz dazu war die durchschnittliche Ischämiezeit im internationalen Kollektiv in den Jahren 2002 bis 2008 mit 2.8 ± 1.5 Stunden geringer als in unserer Gruppe (3.5 ± 1 bzw. 3.6 ± 0.87 Stunden), in der die Transplantationen zwischen 1983 und 2008 stattfanden.

Die Feststellung, dass die Anzahl der Patienten, die aufgrund einer nicht-ischämischen Ursache transplantiert werden, zunimmt und inzwischen mehr als die Hälfte aller Transplantationen ausmacht, konnte in der untersuchten Population bestätigt werden. Lediglich 23.4% wurden aufgrund einer ischämischen Kardiomyopathie transplantiert.

Die immunsuppressive Therapie in den beiden behandelnden Zentren entspricht den aktuellen Empfehlungen. Mycophenolat (71.8%) und Tacrolimus (63.3%) wurden als häufigste Immunsuppressiva eingesetzt, wie es im Bericht aus 2009 für das erste postoperative Jahr beschrieben ist (77% und 65%). Im Gegensatz dazu wurde Ciclosporin wesentlich seltener eingesetzt (24.5%), was der aktuellen Therapiestrategie entspricht (30% Einsatz von Ciclosporin im Bericht des ISHLT). Sirolimus wurde mit 20.2% in unserem Kollektiv öfter eingesetzt als im letzten Bericht der ISHLT von 2009, nach dessen Angabe lediglich 7% der Patienten Sirolimus bekamen.

4.1.2 Methodik der Bestimmung von zirkulierenden vaskulären Progenitorzellen

Wir untersuchten die Progenitorzellen im peripheren Blut mit der Methode der Durchflusszytometrie. Es handelt sich um eine sensitive und spezifische Methode der Zelldifferenzierung (Fadini et al. 2008). Zur Detektion der endothelialen Progenitoren wurde eine Doppelmarkierung mit CD34- und KDR-Antikörpern verwendet, während glattmuskuläre Progenitoren als CD34+ und CD140b+ identifiziert wurden.

CD34 findet sich vor allem auf hämatopoetischen Stammzellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass zirkulierende CD34+ Zellen die Fähigkeit haben, in endotheliale (Peichev et al. 2000) bzw. glattmuskuläre („smooth muscle cells“; SMCs) Zellen zu differenzieren (Simper et al. 2002, Inoue et al. 2007).

Die Doppelmarkierung der EPC mit CD34 und KDR wurde bereits in zahlreichen Studien angewandt und ist eine etablierte Methode, um zirkulierende EPC zu identifizieren (Fadini et al. 2008, Hristov et al. 2008, Schmidt-Lucke et al. 2005).

Die Identifizierung der zirkulierenden glattmuskulären Progenitoren ist hingegen nur wenig etabliert. Wir wählten CD140b als Marker für die SMCs, da gezeigt werden konnte, dass CD140b von SMCs, nicht jedoch von endothelialen Zellen exprimiert wird (Raines 2004). In vitro konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Zugabe des Wachstumsfaktors PDGF-BB, der an den PDGF-Rezeptor bindet (CD140b), eine Differenzierung von CD34+ Zellen zu SMCs induzieren kann (Colvin-Adams et al. 2011, Inoue et al. 2007, Schober et al. 2011, Simper et al. 2002).

4.1.3 Koronarangiographische Evaluation der Schwere der Transplantatvaskulopathie

Die Koronarangiographie stellt eine etablierte Routineuntersuchung zur Diagnostik der koronaren Herzkrankheit sowie der TVP dar. Aufgrund der vielfältigen Ausprägung der TVP gibt es bisher jedoch noch keine etablierte Empfehlung, inwieweit die TVP angiographisch einheitlich dargestellt werden könnte (Wellnhofer E. et al. 2010). Der Score, der in der vorgelegten Arbeit verwandt wurde, um den Schweregrad der TVP einzuschätzen, ist für wissenschaftliche Fragestellungen jedoch etabliert und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen mit vergleichbaren Fragestellungen verwendet (Kaczmarek et al. 2006, Aziz et al. 2000).

4.1.4 Intravaskulärer Ultraschall und IVUS-VH

Da die Koronarangiographie als ein „Luminogramm“ mit zahlreichen Fehlermöglichkeiten behaftet ist, führten wir ergänzend zu den koronarangiographischen Untersuchungen bei einem Teil der Patienten auch IVUS-Untersuchungen durch. Insbesondere das Ausmaß und die Ausdehnung der koronaren Atherosklerose wird in der angiographischen Beurteilung nicht ausreichend dargestellt und vielfach unterschätzt (Nissen et al. 2001). Es wird allgemein akzeptiert, dass sowohl die Einschätzung der Atherosklerose als auch die der TVP nach HTx durch den IVUS deutlich sensitiver ist als durch die alleinige Angiographie (Botas et al. 1995, Goar et al. 1992). Die Methode des IVUS wird seit den 90er Jahren genutzt und ist inzwischen der Goldstandard im klinischen Alltag sowie unter Studienbedingungen, um das Verteilungsmuster und die Plaquemorphologie zu beurteilen (König et al. 2007a). Trotz der Möglichkeit zur Beurteilung der Plaquemorphologie mit dem IVUS sind mit der sogenannten Grauskalen-IVUS bezüglich der einzelnen Plaquekomponenten innerhalb einer

komplexen Plaquekomposition nur unzureichende Aussagen anhand der Echogenität einer Läsion möglich. So können zum Beispiel echoreiche Areale sowohl kalzifizierten aber auch dicht fibrotischen Arealen entsprechen. Man muss deshalb davon ausgehen, dass im Grauskalen IVUS das Vorliegen von kalkhaltigen Arealen vermutlich eher überschätzt wird (König et al. 2007a und 2008c).

Mit einer Weiterentwicklung einer neuartigen IVUS-Radiofrequenzanalyse wird zusätzlich zur IVUS-Information eine differenzierte Analyse der Amplitude und des Frequenzspektrums des reflektierten Schallsignals zur Gewebecharakterisierung genutzt. Diese Methode wurde anhand histopathologischer Studien validiert und kann mit hoher Genauigkeit Plaquekomponenten detektieren. Sie findet nun auch zunehmend klinische Anwendung und wird als „virtual histology“ oder „IVUS-VH“ bezeichnet (Nair et al. 2002). Die IVUS-VH liefert somit eine Gewebecharakterisierung *in vivo* in die vier histologische Plaquekomponenten: „Fibrotisch“, „fibrotisch-lipidhaltig“, „nekrotisch“ und „kalzifiziert“. Diese Mehrinformation durch die IVUS-VH-Daten hat jedoch bisher eher einen deskriptiven Wert, obgleich kürzlich in der sogenannten PROSPECT Studie gezeigt werden konnte, dass ein vermehrtes Vorliegen von nekrotischer Plaqueformation im Sinne von „thin cap fibroatheromas“ häufiger mit klinischen Ereignissen assoziiert war (Stone et al. 2011).

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Koronarangiographische Einschätzung der TVP

Die Auswertung der ISHLT-Daten von 1994-2000 zeigte, dass 7 Jahre nach Herztransplantation 43% der Patienten unter einer TVP litten. Bei Patienten, die zwischen 2001 und 2007 transplantiert wurden, liegt die Rate 7 Jahre nach Transplantation vergleichbar hoch bei 41%. (Taylor et al. 2009). In unserer Studienpopulation waren die Patienten durchschnittlich seit 8.1 Jahren transplantiert und zu 45.2% betroffen. Die Untergruppe, die in unserer Untersuchung IVUS erhielt, zeigte zu 55% eine TVP. Die letztere Patientengruppe war jedoch älter und länger transplantiert (im Mittel vor 8.9 Jahren; 2 bis 25 Jahre post HTX).

4.2.2 Einschätzung der TVP mittels IVUS und IVUS-VH

Bei Patienten, die zusätzlich eine IVUS-Untersuchung erhielten, wurde jeweils eine der Koronararterien, im überwiegenden Teil der Fälle die LAD, evaluiert. Kapadia et al. zeigten, dass durch die Untersuchung an einer ausgewählten Koronararterie die Ausdehnung der TVP eher unterschätzt wird, da nicht alle Koronararterien von der TVP betroffen sein müssen (Kapadia et al. 1999). Diese Beobachtung wurde bereits vorbeschrieben, wobei jedoch auffiel, dass die LAD häufiger betroffen war als die anderen Gefäße (Klauss et al. 1995). Nachdem in dieser Studie alle relevanten IVUS-Parameter (Plaquevolumen, Plaquelast, max. Plaquefläche und minimale Lumenfläche) mit den angiographischen Daten korrelierten, kann davon ausgegangen werden, dass die TVP in der vorgelegten Studie mit beiden Methoden in ausreichendem und vergleichbarem Ausmaß diagnostiziert wurde.

4.2.3 Korrelation der klinischen Patientendaten mit TVP, IVUS und IVUS-VH

4.2.3.1 Alter und Geschlecht

Bisherige Untersuchungen über die Rolle von klinischen Risikofaktoren bei der Pathogenese der TVP haben keine einheitlichen Ergebnisse erbracht (Aranda et al. 2000, Vasalli et al. 2003). So zeigten Taylor et al. 2009, dass das Risiko einer Erkrankung mit einem besonders niedrigen aber auch besonders hohen Empfängeralter assoziiert ist. Unterschiede bezüglich des Geschlechts konnte letztere Arbeitsgruppe nicht aufzeigen. Costanzo et al. fanden jedoch bereits 1998 in einer Multicenter-Studie, dass höheres Alter sowie männliches Geschlecht des Empfängers Risikofaktoren für die Entstehung einer TVP seien.

In unserem Kollektiv hatte das Geschlecht des Empfängers keinen Einfluss auf die Prävalenz der Erkrankung. Tendenziell litten ältere Empfänger eher an der TVP ($p=0.057$). In der IVUS Gruppe konnte nachgewiesen werden, dass bei älteren Empfängern mehr kalkhaltige Areale in den Plaques zu finden sind ($p=0.047$).

4.2.3.2 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Auch bezüglich der klassischen Risikofaktoren differieren die bisher publizierten Studien erheblich. Der größte Konsens besteht in der Ansicht, dass das Vorliegen eines Diabetes sowie einer Hyperlipidämie Risikofaktoren für das Entstehen der TVP darstellen (Aranda et al. 2000). Auch in unserem Gesamtkollektiv war bei den an einer TVP erkrankten Patienten häufiger eine Hypercholesterinämie anzutreffen ($p=0.054$). Das Vorliegen eines Diabetes mellitus konnte in unserer Gruppe andererseits nicht als isolierter Risikofaktor identifiziert werden.

Ein erhöhter BMI war in unserer Studie signifikant mit dem Vorliegen der TVP korreliert ($p=0.01$). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kobashigawa et al. 2006, die nachweisen konnten, dass ein erhöhter BMI mit Transplantatversagen einhergeht. Auch Costanzo et al. zeigten 1998, dass ein erhöhter BMI mit einer erhöhten Intimaproliferation der Koronarien in transplantierten Herzen assoziiert ist.

4.2.3.3 Transplantatassoziierte Daten

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein hohes Spenderalter mit dem Vorliegen einer TVP korreliert ($p=0.031$). So konnte auch im IVUS gezeigt werden, dass bei hohem Spenderalter die minimale Lumenfläche geringer war ($p=0.023$). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen früherer Studien (Costanzo et al. 1998, Hauptman et al. 1995). Taylor et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass der Einfluss eines hohen Spenderalters offenbar bei männlichen Spenderherzen deutlich größer zu sein scheint als bei weiblichen Herzen (Taylor et al. 2009).

Der zeitliche Abstand zur Transplantation zeigte einen Zusammenhang mit dem Vorliegen der TVP ($p=0.011$) und korrelierte dementsprechend auch mit der maximalen Plaquefläche und dem Plaquevolumen ($p=0.023$ und $p=0.011$). Zudem fanden sich bei vor längerer Zeit transplantierten Organen weniger fibrotische Anteile in der Plaque ($p<0.001$) bei vermehrtem Nachweis von koronarem Kalk ($p=0.028$). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch von Hernandez et al. 2009 beschrieben. Sie zeigten 24 Monate nach Transplantation, dass sowohl der Kalk- als auch der Nekroseanteil in der Plaque mit der Zeit kontinuierlich zunimmt.

Eine Korrelation mit der Anzahl der stattgefundenen Abstoßungen und der Ischämiezeit konnte in unserem Kollektiv nicht gefunden werden, während

andere Studien einen Zusammenhang herstellen konnten (Aranda et al. 2000, Colvin-Adams et al. 2011, Vasalli et al. 2003).

Interessanterweise zeigte sich, dass Patienten mit Indikation zur HTX aufgrund einer dilatativen CMP eher unter einer TVP litten als Patienten, die aufgrund einer ischämischen CMP transplantiert wurden ($p=0.09$). Auch wenn wir dazu keine Analyse durchgeführt haben, waren Patienten mit einer dilatativen CMP im Schnitt länger transplantiert und haben möglicherweise dadurch eine höhere Prävalenz einer TVP.

4.2.3.4 Immunsuppression

Unsere Ergebnisse erlauben die Interpretation, dass die Immunsuppression mit Tacrolimus oder Sirolimus einen Vorteil gegenüber der Therapie mit Ciclosporin zu haben scheint. Unter der Einnahme von Ciclosporin fiel bei der untersuchten Population häufiger eine TVP auf, die sich auch in der multivariaten Analyse bestätigte ($p<0.01$). Eine Behandlung mit Ciclosporin korrelierte ebenfalls mit dem Plaquevolumen ($p=0.02$) und der maximalen Plaquefläche ($p=0.043$). In der VH Analyse zeigte sich, dass entsprechend der fibrotische Anteil an der Plaque geringer ausgeprägt war, wenn die Patienten Ciclosporin erhielten.

Patienten, die Tacrolimus erhielten, waren eher nicht von der TVP betroffen ($p=0.058$) und zeigten ein niedrigeres Plaquevolumen ($p=0.044$). Allerdings fiel in der IVUS-VH-Analyse auf, dass die Plaques einen hohen Nekroseanteil aufwiesen ($p=0.04$). Vorteile der Therapie mit Tacrolimus wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen aufgezeigt. So wurden unter der Therapie mit Tacrolimus sowohl in Kombination mit Azathioprin als auch in Kombination mit Mycophenolat weniger Abstoßungsreaktionen nachgewiesen als unter der Kombinationstherapie mit Ciclosporin und

Azathioprin oder Mycophenolat (Grimm et al. 2006, Meiser et al. 2004). Kobashigawa et al. konnten zudem zeigen, dass die Kombination von Tacrolimus mit Sirolimus bezüglich therapiebedürftiger Abstoßungen vorteilhafter ist, als die Kombination mit Mycophenolat (Kobashigawa et al. 2006a). Auch bezüglich der Freiheit von der TVP konnte für Tacrolimus gegenüber Cyclosporin ein Vorteil gezeigt werden (Kaczmarek et al. 2006b). Obwohl die Daten insgesamt für eine protektive Rolle von Tacrolimus sprechen, kann in unserer Patientenpopulation nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der Einfluss der Transplantationsdauer – in der Gruppe mit Tacrolimus deutlich kürzer – eine maßgebliche Rolle spielt.

Auch Patienten, die mit Sirolimus behandelt wurden, litten in unserer Untersuchung signifikant weniger unter einer TVP ($p=0.01$) und wiesen eine niedrigere Plaquelast ($p=0.01$) bei größerem Lumen ($p=0.021$) auf. In der Literatur finden sich deutliche Hinweise, dass Sirolimus in der Tat die Entwicklung einer TVP verzögern kann. Manicini et al. konnten 2003 nachweisen, dass schwer an TVP erkrankte Patienten einen Vorteil hinsichtlich weiterer Lumenreduktion, Notwendigkeit einer Rekanalisation, Myokardinfarkt oder Tod hatten, wenn sie Sirolimus statt eines Regimes mit Mycophenolat oder Azathioprin erhielten (Manicini et al. 2003). Eine IVUS-Studie berichtete bei neu transplantierten Patienten im Beobachtungszeitraum von ca. 2 Jahren eine verringerte Progression der TVP unter einer Sirolimustherapie (Keogh et al. 2004).

Die Therapie mit Mycophenolatmofetil hatte in unserem Kollektiv weder einen protektiven noch einen fördernden Einfluss auf die Entstehung der Transplantatvaskulopathie. Allerdings wiesen diese Patienten erniedrigte Kalkanteile im IVUS-VH Analyse auf ($p=0.007$). Andere Arbeitsgruppen konnten einen Vorteil der Medikation mit MMF gegenüber Azathioprin hinsichtlich der Entwicklung einer TVP in Form von Intimaverdickung und

Lumenreduktion, als auch bezüglich der Notwendigkeit einer Retransplantation darstellen (Eisen et al. 2005, Kobashigawa et al. 2006b).

4.2.3.5 Laborparameter

Ein erhöhter Kreatininwert hing in unserer Untersuchung mit dem Nachweis der TVP auch in Form des Plaquevolumens, der Plaquelast und der maximalen Plaquefläche zusammen ($p<0.001$, $p=0.036$, $p=0.042$). Bei den betroffenen Patienten zeigte sich weiterhin ein erhöhtes pro-BNP ($p=0.023$). Da eine fortgeschrittene Niereninsuffizienz den pro-BNP Wert deutlich erhöht, ist davon auszugehen, dass die Niereninsuffizienz die bedeutendere Rolle spielt. Bisher konnte eine klare prognostische Bedeutung von pro-BNP als Nachsorgeinstrument nach HTX allerdings nicht nachgewiesen werden (Schmauss et al. 2008).

4.2.3.6 Begleitmedikation

In unserem Kollektiv konnte insgesamt keine Assoziation zwischen der Begleittherapie und Vorhandensein einer TVP nachgewiesen werden. Eine Medikation mit ACE-Hemmern, Calciumantagonisten, β -Blockern, Diuretika oder Statinen hatte keinen Einfluss auf das Vorhandensein einer TVP oder einen der IVUS-Parameter.

In der Literatur wird diskutiert, dass die Therapie mit Diltiazem möglicherweise die Progression einer TVP vermindern kann (Schroeder et al. 1993).

Für die Therapie mit ACE-Hemmern konnte in einer IVUS-Untersuchung dargestellt werden, dass bei den betroffenen Patienten durch die Gabe

dieser Wirkstoffgruppe eine Plaque-Regression erreicht werden kann (Bae et al. 2006).

Erinc et al. konnten 2005 in einer IVUS-Untersuchung zeigen, dass die gemeinsame Gabe eines Calciumantagonisten und eines ACE-Hemmers zu einer geringeren Zunahme der Plaquelast und Plaquefläche führte als die jeweilige Monotherapie, obwohl die Blutdruckwerte der Patienten unabhängig des Therapieschemas nach 1 Jahr ähnlich waren. Die Gruppe geht davon aus, dass die Substanzen möglicherweise antiproliferative Effekte ausüben. Ebenfalls konnte für Statine gezeigt werden, dass eine verringerte Zunahme der Intimadicke stattfindet und insgesamt weniger Patienten eine TVP entwickeln (Kobashigawa et al. 1995, Wenke et al. 2003).

4.2.4 Korrelation des Vorliegens zirkulierender vaskulärer Progenitorzellen im Blut mit dem Vorliegen einer TVP und den IVUS- und IVUS-VH-Parametern

Die Rolle zirkulierender endothelialer Progenitoren bei der Entstehung einer klassischen koronaren Herzkrankheit wurde bereits in vielen Studien untersucht. So weisen mehrere Arbeiten darauf hin, dass CD34+/KDR+ Zellen bei Patienten mit manifester KHK (stabile Angina pectoris oder akutes Koronarsyndrom) in geringerer Zahl nachzuweisen sind als bei gesunden Probanden (Vasa et al. 2001, Schmidt-Lucke et al. 2005). Werner et al. konnten 2005 in einer prospektiv angelegten Studie bei über 500 Patienten mit bekannter KHK zeigen, dass Patienten mit einer höheren Anzahl CD34+/KDR+ Zellen seltener hospitalisiert wurden, seltener einer Revaskularisation bedurften und eine niedrigere Sterblichkeitsrate aufwiesen.

Neben der durchflusszyometrischen Bestimmung der endothelialen Progenitoren untersuchen einige Arbeitsgruppen die Anzahl von „colony forming units“, die durch das Züchten von Progenitoren unter gewissen

Voraussetzungen entstehen und die durch bestimmtes Anfärbeverhalten als endotheliale Zellen identifiziert werden können. Auch hier zeigten einige Untersuchungen, dass ein hohes kardiovaskuläres Risikoprofil mit einer niedrigeren Anzahl von endothelialen Progenitorzellen assoziiert ist (Vasa et al. 2001, Hill et al. 2003). Vasa et al. fanden, dass Raucher niedrigere Progenitorzahlen aufwiesen als Nichtraucher. Zudem konnte nach mechanischer Verletzung von Carotiden in Mäusen die protektive Wirkung endothelialer Progenitoren gezeigt werden. Werner et al. infundierte splenektomierten Mäusen nach mechanischer Verletzung der Carotiden endotheliale Progenitorzellen. Im Vergleich zur Placebogruppe war in der Gruppe, die die Progenitoren infundiert bekam, die Reendothelialisierung ausgeprägter. Zudem fand sich eine geringere Intimadicke. Auch Walter et al. zeigten bereits 2002 bei knochenmarktransplantierten Mäusen, dass nach mechanischer Verletzung der A. carotis endotheliale Zellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben, zur Reendothelialisierung beitragen.

Basierend auf diesen Daten untersuchten Assmus et al. 2002, ob eine intrakoronare Applikation von CD34+/CD45+/CD133+ Stammzellen aus dem Knochenmark bzw. eine Applikation von endothelialen Progenitoren, die nach Entnahme aus dem peripheren Blut in vitro kultiviert wurden, die Herzinfarktgröße günstig beeinflussen kann. Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurden nach Primärbehandlung mittels Stenting und Gabe von GPIIb IIIa Inhibitoren zusätzlich mit einer Infusion mit Progenitorzellen behandelt. Patienten in der Verumgruppe hatten 4 Monate nach der Koronarintervention eine größere Steigerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion zu verzeichnen. Zudem war die Behandlung mit Progenitorzellen mit niedrigeren endsystolischen Volumina und mit einer erhöhten Myokardvitalität vergesellschaftet. Dabei war die Infusion vor allem in den Randzonen des Infarkts effektiv. Ein Unterschied zwischen der

Infusion peripherer Progenitoren gegenüber den Zellen aus dem Knochenmark zeigte sich nicht.

Allerdings gibt es auch Studien, die zu gegenteiligen Ergebnissen gelangen. Güven et al. bestimmten 2006 bei 48 Patienten, die einer elektiven Koronarangiographie unterzogen wurden, die Anzahl der endothelialen Progenitoren durch Anzüchten von „colony forming units“. Hierbei konnten bei Patienten, bei denen eine KHK diagnostiziert wurde mehr CFUs nachgewiesen werden. Zudem korrelierte die Anzahl der CFUs mit der Schwere der KHK und der Notwendigkeit der Revaskularisation. George et al. beobachteten 2005 nach Infusion von endothelialen Progenitoren aus dem Blut und Stammzellen aus dem Knochenmark bei APO E defizienten Mäusen größere atheromatöse Plaques als nach Infusion von NaCl. In einer Arbeit von Zoll et al. 2008 zeigte sich bei APO E defizienten Mäusen nach Infusion von endothelialen Progenitoren in der Plaquegröße kein Unterschied zur Kontrollgruppe, allerdings eine Reduktion durch die Infusion von glattmuskulären Progenitoren.

Bezüglich der Rolle endothelialer Progenitoren bei der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie gibt es bisher nur einzelne Arbeiten. In primären Tierexperimenten war man zunächst interessiert, welcher Herkunft die Endothelzellen im Transplantat sind. Hu et al. konnten 2003 in Knochenmark- und Aortensegmenttransplantierten Mäusen in der Tat zeigen, dass nach 4 Wochen alle Endothelzellen im Transplantat vom Empfänger stammten, wobei für ein Drittel der Zellen das Knochenmark als Ursprungsort gezeigt werden konnte. Simper et al. untersuchten 2003 bei 15 herztransplantierten Patienten die Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitoren sowie die Anzahl an CFUs. Sie zeigten eine Reduktion der CFUs bei Vorliegen einer TVP, wobei sich kein Unterschied hinsichtlich der

zirkulierenden Progenitoren zwischen erkrankten und gesunden Patienten zeigen ließ.

In unserer Arbeit wurden erstmals bei über 200 herztransplantierten Patienten vaskuläre Progenitoren bestimmt. Hierbei wurden die endothelialen Vorläuferzellen (CD34+/KDR+) sowohl bei TVP-erkrankten als auch bei angiographisch gesunden Patienten in ähnlicher Häufigkeit festgestellt (48.2% vs. 54.4% p=0.4, Tabelle VIII, Abbildung XI). Auch ergab sich kein Zusammenhang zwischen den Progenitoren und IVUS- bzw. IVUS-VH-Daten. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchung von Simper et al. überein, die bei ihrem wesentlich kleineren Kollektiv bei gesunden und erkrankten Patienten auch ähnlich viele vaskuläre endotheliale Progenitoren fanden. Insgesamt weisen diese Ergebnisse, wenn auch mit zahlreichen Limitationen behaftet, darauf hin, dass endotheliale Progenitorzellen eher keine tragende Rolle bei der Pathogenese der TVP nach Herztransplantation spielen.

Für die Interpretation der Daten ist jedoch zu berücksichtigen, dass bisher kein einheitliches Protokoll zur Bestimmung der endothelialen Progenitoren existiert. Leor et al. beschrieben in ihrer Arbeit aus 2006 die Vielfalt der Möglichkeiten zur Zelltypisierung, die bisher angewandt wurden (Leor et al. 2006). Wir entschieden uns für die Doppelmarkierung CD34+/KDR+, die nicht nur die am weitesten verbreitete Methode darstellt, sondern darüber hinaus auch bisher die einzige Methode ist, mit der man die funktionelle Rolle von EPC für das kardiovaskuläre Systems nachweisen konnte (Fadini et al. 2008, Hristov et al. 2008, Schmidt-Lucke et al. 2005).

Die Rolle glattmuskulärer Progenitoren (SMC) bei der Entwicklung der Atherosklerose wurde bisher kaum erforscht. 2003 untersuchten Caplice et al. Patienten, die eine Knochenmarktransplantation des anderen Geschlechts

erhalten hatten, und fanden heraus, dass in allen Gefäßwandschichten mit atheromatösen Plaques glattmuskuläre Zellen aus dem Knochenmark des Spenders nachzuweisen waren. Dass Progenitorzellen aus dem Knochenmark die Fähigkeit besitzen, sich zu glattmuskulären Zellen der Neointima zu entwickeln, wurde auch im Mausmodell gezeigt. Zerneck et al. wiesen 2005 in knochenmarktransplantierten, APO-E defizienten Mäusen nach Gefäßverletzung SMCs in der Neointima nach, welche ihren Ursprung im Knochenmark hatten. Vergleichbare Ergebnisse waren schon 2002 von Sata et al. publiziert worden. Der letzteren Arbeitsgruppe gelang ebenfalls ein Nachweis von SMC in der nativen Atherosklerose bei APO-E defizienten Mäusen (Sata et al. 2002).

Bezüglich der Rolle glattmuskulärer Progenitoren bei der Entwicklung der TVP gibt es bisher nur einzelne Studien. Im Mausmodell transplantierten Hu et al. 2002 Aortensegmente zwischen APO-E defizienten und Wildtyp-Mäusen. Sie fanden in den transplantierten Gefäßen ausschließlich glattmuskuläre Zellen der Transplantatempfänger. In einem weiteren Schritt wurden die Tiere zunächst knochenmarktransplantiert und bekamen dann ein fremdes Aortensegment. Somit zeigten Hu et al., dass die glattmuskulären Zellen in den Plaques zwar vom Empfänger stammen, aber nicht aus dessen Knochenmark. Allerdings wurde *in vitro* gezeigt, dass die Stammzellen aus dem Knochenmark prinzipiell die Möglichkeit zur Differenzierung in SPCs haben. Eine andere Arbeitsgruppe konnte transplantierte Herzen von post mortem Patienten untersuchen, die zuvor andersgeschlechtlich transplantiert worden waren. Hier zeigte sich, dass zumindest ein Teil der glattmuskulären Zellen vom Empfänger stammten (Glaser et al. 2002). Aufgrund der Datenlage geht man heutzutage insgesamt davon aus, dass Progenitorzellen aus dem Knochenmark prinzipiell die Fähigkeit haben, sich zu glattmuskulären Zellen zu entwickeln. Ob man glattmuskuläre Progenitoren bei Vorliegen einer nativen Atherosklerose bzw. einer

Transplantatvaskulopathie vermehrt in der Blutbahn nachweisen kann, wurde bisher nicht untersucht. In unserem Kollektiv waren die CD34+/CD140b+ Zellen bei Patienten mit einer TVP signifikant häufiger nachzuweisen als bei nicht an TVP erkrankten Patienten. Es bleibt unklar, ob dem erhöhten Nachweis von glattmuskulären Progenitoren eine vermehrte Freisetzung aus dem Knochenmark oder eine geringere Nutzung in der Peripherie zu Grunde liegt.

Die Beobachtung, dass glattmuskuläre Progenitorzellen mit der Schwere der TVP korrelieren, konnte an den IVUS oder IVUS-VH Daten nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist dieser Effekt durch die deutlich niedrigere Patientenzahl (N=42) der IVUS-Population bedingt und müsste in einer größeren Studie überprüft werden.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass zirkulierende glattmuskuläre Progenitorzellen das Risiko an einer Transplantatvaskulopathie zu erkranken erhöhen, während die endothelialen Vorläuferzellen keinen Einfluss auf diese Entwicklung zu haben scheinen. Ob und inwieweit diese Beobachtung an zirkulierenden Zellen in der Tat die Entwicklung der TVP mitbestimmt, oder ob sie nur ein Epiphänomen darstellt, kann die vorgelegte Studie nicht klären.

4.4 Schlussfolgerung mit Antwort auf die Fragestellung

1. Spielen zirkulierende vaskuläre Progenitoren eine Rolle bei der Transplantatvaskulopathie? Ist die Anzahl der glattmuskulären oder der endothelialen Progenitoren mit dem Vorliegen einer Transplantatvaskulopathie assoziiert?

Unseren Daten nach scheinen glattmuskuläre Progenitoren einen fördernden Einfluss auf die Entwicklung der TVP zu haben. Im Gegensatz dazu konnte in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen der Anzahl endothelialer Progenitorzellen und dem Vorliegen einer TVP gezeigt werden.

2. Korrelieren klassische IVUS bzw. die IVUS-VH Parameter mit der angiographischen Charakterisierung der Transplantatvaskulopathie?

Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen den mittels IVUS erhobenen Parametern (Plaquevolumen, maximale Plaquefläche, Plaquelast, minimale Lumenfläche) und der angiographischen Einschätzung der TVP.

3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen glattmuskulären oder endothelialen Progenitoren und IVUS bzw. IVUS-VH Parametern?

In der IVUS Analyse konnte bei unserem Kollektiv kein Zusammenhang zwischen IVUS Parametern und den Progenitoren gezeigt werden, wobei dies eventuell durch die deutlich geringe Fallzahl bedingt sein kann.

4.5 Ausblick

Aktuell wird das Ausmaß der TVP ausschließlich invasiv durch die Koronarangiographie bzw. durch den IVUS im Herzkatheterlabor diagnostiziert. Zusätzliche aussagekräftige, laborchemisch zu bestimmende Parameter könnten den technischen Aufwand für die Klinik und das Risiko einer invasiven Untersuchung für die Patienten erheblich reduzieren. Der Zusammenhang zwischen dem erhöhten Nachweis von glattmuskulären Progenitorzellen in der peripheren Zirkulation und der TVP könnte dabei einen hilfreichen Ansatz darstellen, um im klinischen Alltag die Entscheidungsfindung für eine invasive Diagnostik besser eingrenzen zu können. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit müssten selbstverständlich an einem deutlich größeren Kollektiv systematisch und auch multizentrisch bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Die Transplantatvaskulopathie (TVP) im transplantierten Herzen ist eine Sonderform der klassischen Atherosklerose, die sich bereits innerhalb weniger Wochen nach der Transplantation in den Spenderkoronarien manifestieren und rasch progradient verlaufen kann. Sie stellt aufgrund limitierter Therapieoptionen neben Malignomen eine Haupttodesursache bei herztransplantierten Patienten im Langzeitverlauf dar. Die Pathogenese der TVP ist nur lückenhaft aufgeklärt und die klinische Diagnostik einer fortschreitenden TVP ist bei Fehlen einer Angina pectoris-Symptomatik nach Herztransplantation deutlich erschwert.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorgelegten Arbeit untersucht, ob und inwiefern zirkulierende vaskuläre Vorläuferzellen (Progenitorzellen) bei der Pathogenese der TVP eine Rolle spielen könnten. Im Bereich der klassischen Atherosklerose scheinen die Progenitoren bei der Entwicklung der atherosklerotischen Plaque beteiligt zu sein. Obwohl sich die zahlreich vorliegenden Ergebnisse kontrovers darstellen, scheinen endotheliale Progenitorzellen eher protektive Eigenschaften gegenüber der Entwicklung von Koronarstenosen zu besitzen. Kaum bekannt ist jedoch die Rolle von endothelialen oder glattmuskulären Progenitorzellen bei der Entwicklung der TVP.

Die Hauptzielsetzung der vorgelegten prospektiven Studie war es zu untersuchen, ob das Vorhandensein von zirkulierenden endothelialen bzw. glattmuskulären Progenitorzellen mit der Schwere der TVP bei Patienten nach Herztransplantation assoziiert ist.

Für diese prospektive Arbeit wurden konsekutiv insgesamt 207 Patienten nach Herztransplantation eingeschlossen. Neben Erfassung von klinischen, koronarangiographischen und laborchemischen Daten wurde mittels

Durchflusszytometrie die Anzahl endothelialer und glattmuskulärer Progenitorzellen im peripheren Blut bestimmt und als Prozent der mononukleären Zellen dargestellt. Die endothelialen Progenitoren wurden dabei als CD34+/ KDR+ (VEGF-Rezeptor) und die glattmuskulären Progenitoren als CD34+/CD140b+ (PDGF-Rezeptor) definiert. Die angiographisch eingeschätzte Schwere der TVP wurde anhand eines geeigneten Scores bewertet, bei dem zum einen der Stenosegrad und zum anderen die Lokalisation der Läsionen berücksichtigt wurde. Bei 40 Patienten wurde zusätzlich eine intrakoronare Ultraschalluntersuchung (IVUS) durchgeführt, die neben den klassischen IVUS Parametern (Plaquevolumen, maximale Plaquefläche, Plaquelast und minimaler Lumendurchmesser) mit der neuen Technologie der sogenannten „virtuellen Histologie“ auch Daten zur Plaquezusammensetzung (fibrotisch, lipidhaltig, kalkhaltig, nekrotisch) analysierte.

Das untersuchte Kollektiv war bezüglich klinischer Daten sehr gut vergleichbar mit einem Patientenkollektiv der ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) für herztransplantierte Patienten. Die Prävalenz der TVP lag in unserem Kollektiv bei 45,2% (85 Patienten). Die angiographische Schwere der TVP sowie einige Parameter des IVUS korrelierten mit dem Spenderalter und der Zeit nach Transplantation. Zudem fiel eine Korrelation mit dem Kreatinin und dem pro-BNP auf. Bezuglich der Immunsuppression zeigte sich in unserem Kollektiv ein Vorteil bei der Gabe von Sirolimus oder Tacrolimus gegenüber der Einnahme von Ciclosporin.

In der Gesamtpopulation wurden insgesamt bei 119 Patienten (63.6%) glattmuskuläre und bei 97 Patienten (51.6%) endothiale Progenitoren nachgewiesen. Bei Patienten mit TVP waren deutlich häufiger glattmuskuläre Zellen (CD34+/CD140b+) nachweisbar als bei Patienten ohne TVP (80.0 vs. 49.5%, p<0.001). Im Gegensatz dazu wurden die endothelialen

Vorläuferzellen (CD34+/KDR+) sowohl bei erkrankten als auch bei gesunden Patienten in ähnlicher Häufigkeit festgestellt (48.2% vs. 54.4% p=0.4). Auch in der differenzierten multivariaten Analyse bestätigte sich, dass der Nachweis von glattmuskulären Progenitoren ($p<0.001$) als ein unabhängiger, die TVP beeinflussender Parameter zu werten ist. Als weitere signifikante Faktoren in der Analyse wurden die Therapie mit Ciclosporin ($p=0.002$), das Spenderalter ($p=0.003$) und ein erhöhter Kreatininwert ($p=0.015$) identifiziert.

Die Plaquecharakterisierung mittels IVUS korrelierte gut mit der Schwere der TVP über angiographische Parameter: Der angiographische Nachweis einer TVP korrelierte signifikant mit der maximalen Plaquefläche ($p=0.026$), der Plaquelast ($p=0.007$), der geringsten Lumenfläche ($p=0.027$) und mit dem Plaquevolumen ($p=0.047$). Die Analyse der Plaquekomposition über die IVUS-VH Darstellung zeigte, dass sich die Zusammensetzung der Plaquekomponenten im zeitlichen Verlauf nach HTX von fibrotisch zugunsten von verkalkten Läsionen verändert. Allerdings konnte in der kleineren Subpopulation der Patienten mit der IVUS bzw. IVUS-VH Analyse (N=40) keine Korrelation zwischen einer der zirkulierenden Progenitorzell-Populationen und einer bestimmten Plaquekomposition hergestellt werden.

Die vorgelegte Studie weist erstmalig darauf hin, dass zirkulierende glattmuskuläre Progenitoren möglichweise bei der Entwicklung der TVP beteiligt sind. Endotheliale Vorläuferzellen scheinen keine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der TVP zu spielen. Diese Beobachtungen müssten in einer größeren Population von Patienten bestätigt werden. Ein klinisch interessanter Ansatz wäre dann, bei Patienten nach Herztransplantation die Bestimmung der glattmuskulären Progenitoren als einen Baustein zur Diagnostik der TVP nutzen zu können.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Aranda J.M. Jr., Hil J. Cardiac Transplant Vasculopathy. *Chest*. 2000; 118: 1792-1800.
2. Assmus B., Schächinger V., Teupe C. et al. Transplantation of Progenitor Cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002; 106:3009-3017.
3. Aziz T., Hasleton P., Hann AW. et al. Transforming growth factor beta in relation to cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2000; 119 (4 Pt 1):700-708.
4. Bae J.H., Rihal C.S., Edwards B.S. et al. Association of angiotensin-converting enzyme inhibitors and serum lipids with plaque regression in cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*. 2006; 82:1108-1111.
5. Botas J., Pinto F. J., Chenzbraun A. et al. Influence of preexistent Donor Coronary Artery Disease on the Progression of Transplant Vasculopathy. An Intravascular Ultrasound Study. *Circulation*. 1995; 92:1126-1132.
6. Cai Q., Rangasetty U. C., Barbagelata A. et al. Cardiac allograft vasculopathy Advances in Diagnosis. *Cardiology in Review*. 2001; 19:30-35.
7. Caplice N.M., Bunch T.J., Stalboerger P.G. et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *PNAS*. 2003; Vol. 100; No 8; 4754-4759.

8. Choi J., Enis D., Koh K. et al. T Lymphocyte-Endothelial Cell Interactions. *Ann. Rev. Immunol.* 2004; 22:683-709.
9. Colvin-Adams M., Agnihotri A. Cardiac allograft vasculopathy: Current knowledge and future direction. *Clin. Transplant.* 2011; 25: 175-184.
10. Costanzo M. R., Naftel D. C., Pritzker M. R. et al. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. *Cardiac transplant research database. J Heart Lung Transplant.* 1998; 17:744-53.
11. Eisen H.J., Kobashigawa J., Keogh A. et al. Three years result of an randomized, double-blind, controlled trial of mycophenolate mofetil versus azathioprin in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24: 517-525.
12. Erinc K., Yamani M.H., Starling R.C. et al. The effect of combined angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism on allograft coronary vasculopathy validated by intravascular ultrasound. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24:1033-1038.
13. Fadini G.P., Baesso I., Albiero M. et al. Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis.* 2008; 197:496-503.
14. George J, Afek A., Abashidze A., Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in Apolipoprotein E knock out mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and vascular biology.* 2005; 25:2636-2641.
15. Glaser R., Lu M.M., Narula N. et al. Smooth Muscle Cells, but not Myocytes of host origin in transplanted human hearts. *Circulation.* 2002; 106:17-19.

16. Goar F.G., Pinto F.J., Alderman E.L. et al. Intracoronary Ultrasound in Heart Transplant Recipients In vivo Evidence of “Angiographically silent” Intimal Thickening. *Circulation*. 1992; 85:979-987.
17. Grimm M, Rinaldi M., Yonan N.A. et al. Superior prevention of acute rejection by Tacrolimus vs. cyclosporin in heart transplant recipients: a large European trial. *Am J. Transplantation*. 2006; 6:1387-1397.
18. Güven H., Sheperd R., Bach R.G. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *Journal of A. College of Cardiology*. 2006; 48 (8):1579-1587.
19. Hauptman D.J., Davis S.F., Miller L. et al. The role of nonimmune risk factors in the development and progression of graft atherosclerosis: preliminary insights from a multicenter intravascular ultrasound study. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14:238-242.
20. Hernandez J.M., de Prada J.A., Burgos V. et al. Virtual histology intravascular ultrasound assessment of cardiac allograft vasculopathy from 1 to 20 years after heart transplantation. *J Heart and Lung Transplant*. 2009; 28:156-162.
21. Hill J.M., Zalos G., Halcox J. et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *New Engl. Journal of Med.* 2003; 348:593-600.
22. Hosenpud J.D., Edwards E.B., Lin H.-M. et al. Influence of HLA matching on thoracic transplant outcome: an analysis from UNOS/ISHLT thoracic registry. *Circulation*. 1996; 94:170-174.
23. Hristov M., Weber C. Endothelial progenitor cells: Cellular biomarkers in vascular disease. *Cardiology*. 2008. Vol. 5, No. 3-4, 267-271.

24. Hristov M., Zernecke A., Schober A. et al. Adult progenitor cells in vascular remodeling during Atherosclerosis. *Biol. Chem.* 2008b Jul. 389 (7): 837-44. Review
25. Hu Y., Davison F., Ludewig B. et al. Smooth Muscle Cells in Atherosclerotic lesions are originated from recipients but not bone marrow progenitor cells. *Circulation.* 2002; 6:1834-1839.
26. Hu Y., Davison F., Zhang Z. et al. Endothelial Replacement and Angiogenesis in atherosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation.* 2003; 108:3122-3127.
27. Ingulli. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25:61–74.
28. Inoue T., Sata M., Hikichi Y. et al. Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation.* 2007; 115:553–561.
29. Kaczmarek I., Ertl B., Schmauss D. et al. Preventing cardiac allograft vasculopathy: long-term beneficial effects of mycophenolate mofetil. *J Heart Lung Transplant.* 2006; 25(5):550-556.
30. Kazcmarek I., Deutsch M.A., Rohrer M.E. et al. HLA-DR matching improves survival after heart transplantation: is it time to change allocation policies? *J. Heart Lung Transplantation.* 2006b; 25:1057-1062.
31. Kapadia S.R., Nissen S.E., Tuzcu E.M. et al. Impact of intravascular ultrasound in understanding transplant coronary artery disease. *Curr. Opin. Cardiol.* 1999; 14:140-150.
32. Keogh A., Richardson M., Ruygrok P. et al. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary

- artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation*. 2004; 110:2694-2700.
33. Klauss V., Mudra H., Überfuhr P. et al. Intraindividual Variability of Cardiac allograft Vasculopathy as Assessed by Intravascular Ultrasound. *AM J Cardiol*. 1995; 76:463-466.
34. Kobashigawa J.A., Katznelson S., Laks H. et al. Effects of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med*. 1995; 333:621-627.
35. Kobashigawa J.A., Starling R. C., Mehra M. R. et al. Muticenter retrospective analysis of cardiovascular risk factors affecting long-term outcome of de novo cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2006; 25:1063-1069.
36. Kobashigawa J.A., Miller L.W., Russell S.D. et al. Tacrolimus with mycophenolat mofetil (MMF) or sirolimus vs. cyclosporin with MMF in cardiac transplant recipients: 1 year report. *Am J Transplant*. 2006a; 6: 1377-1386.
37. Kobashigawa J.A., Tobis J.M., Mentzer R.M. et al. Mycophenolat mofetil reduces intimal thickness by intravascular ultrasound after heart transplant: reanalysis of the multicenter study. 2006b; 6:993-997.
38. König A., Klauss V. Virtual histology. *Heart*. 2007a; 93:977-982.
39. König A., Kilian E., Rieber J. et al. Assessment of early Atherosclerosis in de novo Heart Transplant Recipients: analysis with Intravascular Ultrasound-derived Radiofrequency Analysis. *J Heart Lung Transplantat*. 2008a; 27:26-30.
40. König A., Kilian E., Sohn H.Y. et al. Assessment and Characterization of Time-Related differences in Plaque Composition by Intravascular

- Ultrasound-derived Radiofrequency Analysis in Heart Transplant Recipients. *J. Heart Lung Transplantat.* 2008b; 27:302-309.
41. König A., Margolis M.P., Virmani R. et al. Technology insight. In vivo coronary plaque classification by intravascular ultrasonography radiofrequency analysis. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine.* 2008c. Vol.5, No. 4, 219-229.
42. Leor J., Marber M. Endothelial Progenitors A new tower of Babel? *Journal of the American College of Cardiology.* 2006; Vol. 48, No. 8, 1588-1590.
43. Loosgret van J., Oosterhout van M., Bruggink A. et al. The Chemokine and Chemokine Receptor Profile of Infiltrating Cells in the Wall of arteries With Cardiac Allograft Vasculopathy Is Indicative of a Memory T-Helper 1 Response. *Circulation.* 2006; 114:1599-1607.
44. Mancini D., Pinney S., Burkhoff D. et al. Use of rapamycin slows progression of cardiac transplant vasculopathy. *Circulation.* 2003; 108:48-53.
45. Meiser B.M., Groetzner J., Kaczmarek I. et al. Tacrolimus or cyclosporin: which is the better partner for mycophenolate mofetil in heart transplant recipients? *Transplantation.* 2004; 78:591-598.
46. Methe H., Zimmer E., Grimm C. et al. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation.* 2004; 78:1324–1331.
47. Nair A., Kuban B.D., Tuzcu M. et al. Coronary Plaque Classification with Intravascular Ultrasound Radiofrequency Data Analysis. *Circulation.* 2002; 106: 2200-2206.

48. Nissen S.E., Yock P. Intravascular Ultrasound Novel Pathophysiological Insights and Current Clinical Applications. *Circulation*. 2001; 103:604-616.
49. Nissen S.E. Coronary angiography and intravascular ultrasound. *Am J Cardiol*. 2001b; 87: 15A.
50. Obhrai J., Goldstein D.R. The role of toll-like receptors in solid Organtransplantation. *Transplantation*. 2006; 81: 497–502.
51. Peichev M., Naiyer A. J., Pereira. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000; 95: 952-958.
52. Rahmani M., Cruz R.P., Granville D.J. Allograft Vasculopathy Versus Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2006; 99: 801-815.
53. Raines E. W., PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine & Growth Factors Reviews* 15. 2004; 237-254
54. Sarno G., Lerman A., Bae J.-H., Multicenter assessment of coronary allograft vasculopathy by ultravascular ultrasound-derived analysis of plaque composition. *Nature Clinical Practice Cardiovasc. Med.* 2009 Jan; 6(1): 61-9
55. Sata M., Saiura A., Kunisato A. et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nature Medicine* 2002a; Vol 8; No 4: 403-309.
56. Schmauss D., Weis M. Cardiac Allograft Vasculopathy: Recent developments. *Circulation* 2008; 117:2131-2141.
57. Schmidt-Lucke C., Rossig L., Fichtlscherer S. et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular

- events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005; 111: 2981-2987.
58. Schober A., Hristov M., Kofler S. et al. CD34+CD140b+ cells and circulating CXCL12 correlate with the angiographically assessed severity of cardiac allograft vasculopathy. *European Heart Journal*. 2011; 32: 476-484.
59. Schroeder J.S., Gao S.Z., Alderman E.L. et al. A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1993; 328:164-170.
60. Simper D., Stalboerger P.G., Panetta C.J. et al. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*. 2002; 106: 1199-1204.
61. Simper D., Wang S., Deb A. et al. Endothelial Progenitor Cells are Decreased in Blood of Cardiac Allograft Patients with Vasculopathy and Endothelial Cells of Non-Cardiac Origin Are Enriched in Transplant Atherosclerosis. *Circulation*. 2003; 108:143-149.
62. Stone G. W., Maehara A., Lansky A. J. et al. A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2011 Jan 20; 364(3):226-35.
63. Taylor D., Stehlik J., Edwards L. et al. Scientific Registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: Twenty Sixth official adult heart transplant Report – 2009. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28:1007–22.
64. Valantine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant “atheroma.” *Transplantation*. 2003; 76: 891–899.
65. Vasa M., Fichtlscherer S., Zeiher A. M. et al. Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells inversely correlate

- with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* 2001; 89:e1-e7.
66. Vassalli G., Gallino A., Weis M., Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *European Heart Journal* 2003; 24, 1180–1188.
67. Walter D.H., Rittig K., Bahlmann F.H. Statin Therapy accelerates Reendothelialization: A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002; 105:3017-3024.
68. Weis M., von Scheidt W. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* 1997; 96: 2069.
69. Wellnhofer E., Stypmann J., Bara CL. T al. Angiographic assessment of cardiac allograft vasculopathy: results of a Consensus Conference of the Task Force for Thoracic Organ Transplantation of the German Cardiac Society. *Transpl. Int.* 2010 Nov; 23 (11): 1094-104.
70. Wenke K., Meiser B., Thiery J. et al. Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation.* 2003; 107:93-97.
71. Werner N., Junk S., Laufs U. et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ. Res.* 2003; 93:e17-e24.
72. Werner N., Kosiol S., Schiegl T. et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *New Engl. Journal of Medicine.* 2005; 353:999-1007.
73. Zernecke A., Schober A., Bot I. et al. SDF1a/CXCR4 Axis is Instrumental in Neointimal Hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circulation Research.* 2005; 96:784-791.

74. Zoll J., Fontaine V., Gourdy P. et al. role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition. *Cardiovasc. Research.* 2008; 77:471-480.

6.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abbildung I Darstellung der Zellpopulationen nach Detektion im Durchflusszytometer.
- Abbildung II Selektion der Lymphozyten durch „Gating“.
- Abbildung III Differenzierte Darstellung der Lymphozyten als Subpopulationen abhängig von der Antikörperbindung.
- Abbildung IV Schematische Darstellung der Koronararterien und deren Hauptäste.
- Abbildung V Darstellung eines Gefäßes in Längs- und Querschnitt mit eingeblendeten Gefäß- und Lumengrenzen im Grauskalen IVUS.
- Abbildung VI Darstellung der Gewebekomponenten anhand der IVUS-VH-Analyse von zwei Gefäßabschnitten mit erheblicher Plaquebildung.
- Abbildung VII Darstellung der Extremwerte.
- Abbildung VIII Häufigkeit des Vorliegens einer TVP anhand koronarangiographischer Diagnostik (N=188).
- Abbildung IX Verteilung der Schweregrade der TVP innerhalb der Gesamtgruppe analysiert anhand des TVP-Score Systems (N=188).
- Tabelle I Bewertung koronarer Stenosen anhand Lokalisation und Schweregrad als Grundlage des TVP-Score Systems

(Kaczmarek et al. 2006, Aziz et al. 2000).

- Tabelle II Bestimmung des Schweregrades der TVP anhand des TVP-Score Systems (Kaczmarek et al. 2006, Aziz et al. 2000).
- Tabelle III Beschreibung des gesamten Patientenkollektivs (N=188).
- Tabelle IV Indikationen zur Transplantation (N=188).
- Tabelle V Beschreibung der Patientengruppe mit IVUS-Untersuchung (N=40).
- Tabelle VI Vergleich der an einer TVP erkrankten Patienten mit den koronargesunden Patienten hinsichtlich Einflussfaktoren, die für das Entstehen einer TVP eine Rolle spielen (N=181).
- Tabelle VII Anzahl der Patienten mit positivem Nachweis zirkulierender vaskulärer Progenitoren (N=188).
- Tabelle VIII Korrelation zwischen dem angiographischen Vorliegen einer TVP und dem positiven Nachweis zirkulierender vaskulärer Progenitorzellen im Blut (N=181).
- Tabelle IX Unabhängige Einflussfaktoren auf die TVP nach multivariater Analyse.
- Tabelle X IVUS und IVUS-VH Analyse der Koronargefäße in den proximalen Gefäßabschnitten (20mm bzw. 30mm).

Tabelle XI	Vergleich der an einer TVP erkrankten Patienten mit den koronargesunden Patienten hinsichtlich IVUS und IVUS-VH Parametern (N=40).
Tabelle XII	Korrelation der IVUS Parameter mit untersuchten klinischen Einflussfaktoren, die möglicherweise für die Entwicklung einer TVP eine Rolle spielen. Dargestellt sind die P-Werte; N=40.
Tabelle XIII	Korrelation der IVUS-VH Parameter mit klinischen Einflussfaktoren, die möglicherweise bei der Pathogenese einer TVP beteiligt sind. Dargestellt sind die P-Werte; N=40.
Tabelle XIV	Anzahl der Patienten mit positivem Nachweis zirkulierender vaskulärer Progenitoren in der Gruppe der Patienten mit IVUS Untersuchung (N=40).
Tabelle XV	Korrelation der IVUS Parameter mit den Progenitoren (P-Werte).
Tabelle XVI	Korrelation der IVUS-VH Parameter mit den Progenitoren (P-Werte).
Tabelle XVII	Unabhängige Einflussfaktoren auf die IVUS Parameter nach multivariater Analyse (P-Werte).
Tabelle XVIII	Unabhängige Einflussfaktoren auf die IVUS-VH Parameter nach multivariater Analyse (P-Werte).

6.3 Abkürzungsverzeichnis

APO E	Apolipoprotein E
BMI	Body Mass Index
CFU	Colony forming units
CMP	Cardiomyopathie
EF	Ejektionsfraktion
EPC	Endothelial progenitor cell
F	French
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
HTX	Herztransplantation
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
IVUS-VH	Virtuelle Histologie des intravaskulären Ultraschalls
KHK	Koronare Herzerkrankung
LAD	Left anterior descending
MLA	Minimale Lumenfläche
MMF	Mycophenolat Mofetil
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
SPC	Smooth muscle progenitor cell
TVP	Transplantatvaskulopathie

6.4 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. G. Steinbeck und Herrn Prof. M. Reincke, die es ermöglicht haben, an den Medizinischen Kliniken in Großhadern und in der Innenstadt diese Arbeit durchzuführen.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Hae-Young Sohn bedanken, von dessen Erfahrungen in der Grundlagenforschung ich sehr viel lernen konnte. Ich möchte mich bedanken für die Bereitstellung des Themas, seine jederzeit wohlwollende Unterstützung und die Möglichkeit, unsere Ergebnisse auf Kongressen vorzustellen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. S. Kofler und Herrn PD Dr. I. Kaczmarek für ihre tatkräftige und kompetente Unterstützung des Projektes an der HTX Ambulanz in Großhadern.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der HTX-Ambulanzen in Großhadern und der Ziemssenstrasse und den Schwestern des Herzkatheterlabors in der Ziemssenstrasse bedanken. Sie alle haben mich stets geduldig und tatkräftig unterstützt.

Der Arbeitsgruppe „Experimentelle Kardiologie“ der Medizinischen Poliklinik Innenstadt in München danke ich sehr herzlich für die geduldige Einführung in die Laborarbeit und die Bereitstellung des FACS-Gerätes.

Ein großer Dank gilt auch dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der LMU München, hierbei insbesondere Herrn Pfirrmann, der mir bezüglich der statistischen Auswertung unserer Daten beratend zur Seite stand.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, die mich auf dem Weg zur Promotion jederzeit sowohl mental als auch finanziell unterstützt hat und ohne die mein Medizinstudium nicht möglich gewesen wäre.