Aus der Medizinischen Klinik III, Universität Heidelberg
Abteilung für Kardiologie, Angiologie und Pulmologie
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. W. Kübler)

Perivaskuläre Vitronektinexpression als Marker der Progression der Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Heidelberg
der
Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von
Michaela Steinbach

aus
Craiova
1997

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H.-G. Sonntag
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Zimmermann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

Die Transplantatvaskulopathie (TVP) stellt im Langzeitverlauf die Hauptursache für die Morbidität und Letalität herztransplantierter Patienten dar (Bieber et al. 1981, Gao et al. 1988). Bei einer durchschnittlichen jährlichen Prävalenz von 10 % entwickelt nahezu die Hälfte der Patienten in den ersten fünf postoperativen Jahren angiographisch erkennbare Koronarstenosen (Uretsky et al. 1987, Billingham 1987, Olivari et al. 1989).

Das histologische Hauptmerkmal der vaskulären Veränderungen ist eine konzentrische Intimaproliferation (Billingham 1992). Diese betrifft gleichermaßen Arterien und Venen des Spenderorgans (Oni et al. 1992). Im Vergleich zu epikardialen Gefäßen neigen die distalen intramyokardialen oder mikrovaskulären Gefäße früher zum Verschluß (Russell et al. 1993, Billingham 1989). Eine Intimaproliferation wurde auch im aortalen Spendersegment beschrieben (Russell et al. 1993). Darüberhinaus kommt es zu einer Infiltration des perivaskulären Bindegewebes mit mononukleären Zellen (Billingham 1987). Die beschriebenen Gefäßveränderungen betreffen selektiv das Gefäßsystem des Spenderorgans (Russell et al. 1993). Ähnliche Befunde werden nach Nieren- oder Lebertransplantation erhoben (Porter et al. 1963, Mihatsch et al. 1983, Starzl et al. 1969). Es wird daher vermutet, daß die Gefäßveränderungen im Transplantat immunologisch vermittelt werden: der Transplantatvaskulopathie liegen wahrscheinlich T-Zell-vermittelte Reaktionen gegen spendereigene MHC-Moleküle zugrunde. So konnte experimentell gezeigt werden, daß eine Vaskulitis als Vorstufe der Allograftvaskulopathie nur in Transplantaten mit induzierten MHC-Antigenen der Klasse II vorkommt (Forbes et al. 1991). Die gegen MHC-II-Antigene gerichteten T-Lymphozyten können hierbei unter Vermittlung von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM/VCAM-1) vermehrt in die Intima vordringen und dort eine Entzündungsreaktion bewirken (Pober u. Contran 1990).

Aufgrund des diffusen und konzentrischen Befallsmusters werden die Gefäßveränderungen erst im fortgeschrittenen Stadium angiographisch erkannt (Hosenpud et al. 1992, Schroeder et al. 1992). Ein frühzeitiger Nachweis der Transplantatvaskulopathie gelingt durch den intravaskulären Ultraschall

(St Goar et al. 1992). Dieses Verfahren wird aber wegen hoher Kosten nicht routinemäßig eingesetzt. Alternativ bietet sich zur Diagnostik der Transplantatvaskulopathie eine quantitative Auswertung der Koronarangiogramme mit Bestimmung des mittleren Gefäßdurchmessers an, um so ohne zusätzlichen apparativen Aufwand das Fortschreiten der Intimahyperplasie zu objektivieren (Gao et al. 1990, Schroeder et al. 1992).

Bei der klassischen Atherosklerose peripherer Gefäße und in atherosklerotischen Plaques aus Koronarien ist eine veränderte Zusammensetzung der vaskulären extrazellulären Matrix mit lokaler Anreicherung von Vitronektin bekannt (Niculescu et al. 1989, Guettier et al. 1989). Vitronektin ist ein Polypeptid mit RGD-Adhäsionssequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) (Suzuki et al. 1984). In Serum ist Vitronektin in einer Konzentration von 0,25–0,45 mg/ml vorhanden (Preissner 1991). Hauptproduzent ist die Leber (Barnes u. Reing, 1985); außerdem können Monocyten/Makrophagen Vitronektin in vitro sezernieren (Hetland et al. 1989). Diesem Polypeptid werden verschiedene immunologische Funktionen bei der Zelladhäsion, Thrombogenese und Fibrinolyse zugeschrieben (Tomasini u. Mosher 1990). Als Bestandteil der extrazellulären Matrix kann Vitronektin über membranständige Integrine von einer Reihe von Zellen, einschließlich humaner glatter Muskelzellen und Endothelzellen (Athanasou et al. 1990) erkannt werden und dadurch Signale ins Zellinnere weiterleiten. Spezifische Rezeptoren für Vitronektin sind die Integrine $\alpha_{\mathrm{v}}\beta_1$, $\alpha_{\mathrm{v}}\beta_3$, $\alpha_{\mathrm{v}}\beta_5$ und $\alpha_{\mathrm{IIb}}\beta_3$ (Preissner 1991).

Vitronektin scheint bei der Entstehung der Intimahyperplasie im Rahmen der Atherosklerose peripherer Gefäße beteiligt zu sein. Grundlage für diese Annahme sind Befunde, wonach die Migration humaner aortaler glatter Muskelzellen, die in den Intimahyperplasien vermehrt nachweisbar sind (Ross 1993), durch einen Antagonisten des Vitronektins (GpenGRGDSPCA) in vitro gehemmt werden konnte (Choi et al. 1994). Inhibitorische Antikörper gegen $\alpha_{\mathrm{v}}\beta_3$-Integrin hemmten ebenfalls die Vitronektin-induzierte Migration humaner aortaler glatter Muskelzellen in vitro (Brown et al. 1994). Im Tierexperiment konnte in Analogie zu diesen Befunden eine nach Ballonverletzung provozierte Intimahyperplasie der A. carotis durch Behandlung mit dem Vitronektin-Antagonisten (GpenGRGDSPCA) reduziert werden (Choi et al. 1994).

Zusammenfassend kann die pathogenetische Bedeutung des Vitronektin/ $\alpha_{\mathrm{v}}\beta_3$-Integrin-Systems für die klassische Atherosklerose als gesichert angesehen werden. Daten bezüglich der Expression von Vitronektin und der Vitronektinrezeptoren bei der Transplantatvaskulopathie liegen bislang jedoch nicht vor.

Da die histologischen Merkmale der Gefäßveränderungen nach Herztransplantation große Ähnlichkeiten mit denen der Atherosklerose aufweisen, ist auch bei der Transplantatvaskulopathie eine pathophysiologische Rolle dieses Rezeptor/Ligand-Systems denkbar.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Hypothese, daß der Intimaproliferation bei der Transplantatvaskulopathie eine ähnliche Pathogenese wie bei der Atherosklerose zugrunde liegt. In Analogie zur klassischen Atherosklerose peripherer Gefäße sollte also eine Veränderung der Zusammensetzung der perivaskulären extrazellulären Matrix (mit Anreicherung von Vitronektin) zu beobachten sein.

Die Untersuchung zielt daher zunächst auf die Charakterisierung der Expression des Ligand-Rezeptor Systems Vitronektin/$\alpha_v\beta_3$-Integrin in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien nach Herztransplantation. Hierbei soll insbesondere beantwortet werden, welche Gefäße betroffen sind (Arteriolen, Venolen oder Kapillaren), und ob ein topographischer und temporärer Zusammenhang zwischen der Expression des Vitronektins und der Expression der Vitronektinrezeptoren besteht. Ferner werden die koronarangiographischen Befunde mit den immunhistologischen Daten verglichen. Ziel dieser Analyse ist die Evaluation der diagnostischen Wertigkeit der Expression von Vitronektin und $\alpha_v\beta_3$-Integrin bezüglich der Transplantatvaskulopathie.

2 Material und Methodik

Die Expression des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien wurde mit immunhistologischen Färbemethoden an einem ausgewählten Patientenkollektiv untersucht. Parallel wurden die jährlichen Koronarangiogramme qualitativ und quantitativ beurteilt. Anschließend wurden die immunhistologischen Ergebnisse mit den angiographischen Daten verglichen.

2.1 Patienten

An der Medizinischen Klinik III (Kardiologie) befinden sich derzeit 113 herztransplantierte Patienten in der Nachsorge. Alle wesentlichen Informationen, die im Laufe der Nachsorge der herztransplantierten Patienten gewonnen werden, sind in der Datenbank der Transplantationsambulanz aufgeführt. Für die vorliegende Untersuchung wurden 16 Patienten ausgewählt, die zwischen August 1990 und April 1994 herztransplantiert wurden. Um über einen längeren Zeitraum die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie beurteilen zu können, wurden nur solche Patienten ausgewählt, deren postoperative Beobachtungszeit mindestens ein Jahr beträgt. Der Koronarstatus war zu Beginn der Untersuchungen nicht bekannt. Die benötigten klinischen und laborchemischen Daten wurden der Datenbank der Transplantationsambulanz entnommen. Hierzu wurden folgende Parameter in die Auswertung einbezogen: Empfängerdaten (Alter, Geschlecht, präoperative Diagnose), Spenderdaten (Alter, Geschlecht, Ischämiezeit vor der Herztransplantation), Anzahl und Grading akuter Abstoßungen, darüberhinaus der systemische Blutdruck sowie der Cholesterin- und der Triglycerid-Serumspiegel. Die einzelnen Patientendaten sind in Tab. 1 aufgeführt.

2.1.1 Immunsuppressive Nachbehandlung

Alle Patienten erhielten eine immunsuppressive Behandlung mit Ciclosporin A, Azathioprin und Kortison. Postoperativ erhielten alle Patienten zu-

Tab. 1: Patientendaten. m, männlich; w, weiblich; DCM, dilatative Kardiomyopathie; HV, Herzvitium; KHK, koronare Herzerkrankung; n.v., Spenderdaten nicht verfügbar.

Patient	Patienten-alter (Jahre)	Patienten-geschlecht	Präoperative Diagnose	Spender-alter (Jahre)	Spender geschlecht
1	51	m	DCM	41	m
2	58	m	DCM	n.v.	n.v.
3	60	w	DCM	59	w
4	58	m	DCM	42	w
5	50	m	DCM	59	m
6	42	m	DCM	24	m
7	56	m	DCM	29	m
8	55	m	DCM	46	m
9	63	m	DCM	50	w
10	57	m	DCM	34	m
11	62	m	DCM	32	m
12	33	m	HV	27	m
13	55	m	DCM	41	m
14	51	m	KHK	40	w
15	43	m	DCM	20	m
16	51	m	DCM	26	m

sätzlich Antithymocytenglobulin (ATG), bis die therapeutische Serumkonzentration von Ciclosporin A erreicht wurde (im Mittel für 6 Tage). Die Gabe von Azathioprin wurde unterbrochen, falls die Leukozytenzahl unter 4,0/nl absank. Durch Endomyokardbiopsien diagnostizierte akute Abstoßungsreaktionen wurden initial mit Methylprednisolon intravenös behandelt (1 g täglich für 3 Tage). Zwei Patienten erhielten auch monoklonale Antikörper gegen den T3-Lymphozytenrezeptor (OKT3) für 10 Tage, nachdem 2 Zyklen Methylprednisolon intravenös und ein Zyklus ATG erfolglos verabreicht worden waren.

2.1.2 Postoperatives Monitoring

Die routinemäßige Jahreskontrolluntersuchung umfaßt eine Koronarangiographie und eine Rechtsherzkatheteruntersuchung mit Entnahme von sechs bis sieben Endomyokardbiopsien. Zusätzlich werden engmaschige histologische Untersuchungen im ersten Jahr nach der Herztransplantation vorgenommen. Zur Entnahme der Endomyokardbiopsien wird eine Biopsie-Zange (Cordis, Nr. 502-302) mit einem Schneidbacken-Volumen von 1,84 mm^3 verwendet. Das Grading der akuten Abstoßungsreaktionen wird im Lichtmikroskop im Pathologischen Institut (Leiter: Prof. Dr. H. G. Otto) nach der Klassifikation der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) bewertet (Billingham et al. 1990). Zum quantitativen Vergleich wurde für jeden Patienten ein Abstoßungsindex berechnet, basierend auf der Klassifikation der ISHLT: Die ISHLT-Abstoßungsgrade 0, 1, 2, 3A, 3B, 4 wurden mit 0, 1, 1,5, 3, 4, 5 gewertet und über die Anzahl der durchgeführten Biopsien gemittelt. In der Frühphase nach Herztransplantation treten häufiger Abstoßungsepisoden auf. Daher wurde zusätzlich zum Gesamt-Abstoßungsindex für jeden Patienten ein Früh-Abstoßungsindex für die ersten 12 Monate postoperativ errechnet.

2.1.3 Archivierung der Endomyokardbiopsien

Seit August 1992 wird bei jeder Entnahme jeweils eine der sechs Biopsien für spezielle Untersuchungen tiefgefroren und im Institut für Immunpathologie bei −70°C aufbewahrt. Insgesamt wurden bisher über 1600 Biopsien mit unterschiedlichen Ausprägungen der Transplantatvaskulopathie sowie der akuten Abstoßung gesammelt.

2.1.3.1 Einfrieren der Endomyokardbiopsien

Um eine möglichst gute Antigenerhaltung zu gewährleisten, wird auf schnelles und schonendes Einfrieren geachtet. Spätestens 5 Minuten nach der Entnahme werden die Biopsien auf einen kleinen Streifen Filterpapier (5×20 mm) in einem wasserlöslichen Klebemittel (Tissue-Tek, O.C.T. Compound, Miles, Nr. 4583) eingebettet. Gleich danach werden die Gewebeproben mit Hilfe einer Pinzette in eine gekühlte Flüssigkeit eingetaucht und tiefgefroren. Als Kältevermittler wird in flüssigem Stickstoff vorgekühltes Propanol verwendet. Die schockgefrorenen Biopsien werden mit dem Datum der Entnahme und dem Namen des Patienten gekennzeichnet.

2.1.3.2 Einrichtung einer „Biopsiebank“

Um den gezielten Zugriff auf bestimmte Biopsien zu ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle 1600 Endomyokardbiopsien systematisch archiviert und eine „Biopsiebank“ unter dBase IIIb angelegt. Neben Datum und Name sind darin der Lagerort der Biopsie und das Grading der akuten Abstoßung aufgeführt. Ein eigens entwickeltes dBase-Programm erleichtert die Archivierung zukünftiger Biopsien sowie eine Verlaufsbeobachtung bei einzelnen Patienten.

2.2 Koronarangiographie

Zur Evaluation der Entwicklung der Transplantatvaskulopathie innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs wurden die jährlichen Koronarangiogramme qualitativ und quantitativ bewertet. Im Rahmen der Jahreskontrolluntersuchung wird routinemäßig sowohl die Linksherzkatheteruntersuchung mit der Koronarangiographie als auch die Entnahme von mehreren Endomyokardbiopsien durchgeführt. Zur Verminderung der lokalen Komplikationsrate werden 5F Katheter (Medtronic, Außendurchmesser 5 French oder 1,66 mm) benutzt. Die Koronarangiographie wird wie üblich in Judkins-Technik über die A. femoralis durchgeführt.

2.2.1 Visuelle Beurteilung der Koronarangiographien

Eine erste Beurteilung der Koronarangiographien wird routinemäßig nach der Untersuchung im Herzkatheterlabor vorgenommen. Die in den Koronarangiographie-Bögen eingetragenen Befunde wurden in dieser Arbeit zur Feststellung einer Transplantatvaskulopathie herangezogen. Als Kriterium für das Vorhandensein einer TVP wurde jede Verminderung des Gefäßdurchmessers von minimalen Wandkonturunregelmäßigkeiten ($< 10\,\%$ Lumeneinengung) bis zu „signifikanten“ Stenosen ($> 50\,\%$) definiert (Uretsky et al. 1987). Bereits im ersten Jahr postoperativ zeigten sich in zwei der 16 Koronarangiogramme beginnende Gefäßveränderungen. Für diese beiden Patienten wurde die Entwicklung einer TVP erst dann als nachgewiesen angesehen, wenn im zweiten Jahr neue Veränderungen in anderen Lokalisationen auftraten (Schroeder et al. 1993).

2.2.2 Quantitative Auswertung der Koronarangiogramme

Um die langsam verlaufende Progression der Vaskulopathie einzuschätzen, wurde eine quantitative Auswertung der Gefäßveränderungen durchgeführt. Mit Hilfe des Coronary Angiography Analysis System II (CAAS-II) wurden ausgewählte Koronarsegmente digitalisiert und vermessen (Reiber et al. 1985, Lesperance et al. 1989). Quantitative Auswertungen der Koronarangiogramme wurden bei 15 der 16 Patienten durchgeführt. Der Patient 1 verstarb 17 Monate postoperativ, bevor die zweite Jahresuntersuchung vorgenommen werden konnte. Eine aufgrund zunehmender Belastungsdyspnoe durchgeführte Koronarangiographie bestätigte 16 Monate postoperativ die Diagnose einer TVP. Dieses Koronarangiogramm stand leider nicht zur Verfügung, so daß auf eine quantitative Auswertung verzichtet werden mußte.

2.2.2.1 Beschreibung von CAAS-II

Das Coronary Angiography Analysis System II setzt sich zusammen aus einem Cine-Film-Projektor, einer Kamera, und einem Rechner zur Steuerung und Auswertung. Die 35 mm-Filmbilder werden auf 28×21 cm vergrößert und mit einer Auflösung von 50 Linien/mm auf dem Bildschirm des Projektors dargestellt. Die parallel eingeschaltete Kamera (Kodak Megaplus Camera, Eastman Kodak Company, U.S.A.) wandelt die Filmbilder digital um und leitet sie zum Rechner weiter (Auflösung der Kamera: 1317×1035 pixel). Die genaue Dokumentation der Auswertungen ist durch einen automatischen Bildzähler gewährleistet. Die Auswahl der Koronarsegmente wird am Bildschirm des Projektors getroffen, anschließend wird das aufgenommene Bild am Rechner mit Hilfe der CAAS-II Software ausgewertet.

2.2.2.2 Meßmethodik und Kriterien

Bevor das ausgewählte Koronarsegment vermessen wird, erfolgt zunächst eine Kalibrierung des Systems an der Katheterspitze. Hierzu wird ein Bild ausgewählt, in der das Katheter noch kein Kontrastmittel enthält. Die Ergebnisse der Kalibrierung werden in Absolutzahlen (pixel/mm) ermittelt; gleichzeitig wird die kissenförmige Verzerrung des Aufnahmesystems korrigiert.

Um vergleichbare Meßergebnisse zu erzielen, wurde dieser Vorgang für jede neue Projektion wiederholt. Für jeden Patienten wurden auf der (chronologisch) ersten Koronarangiographie zwischen 8 und 12 Koronarsegmente mit Längen von 3,05 bis 40,28 mm ausgewählt. Für die Auswertung der rechten

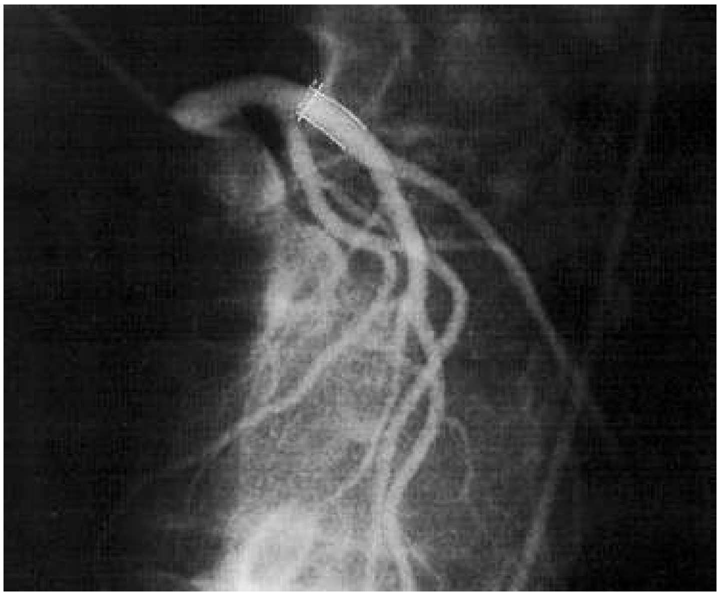

Abb. 1: Quantitative Auswertung der linken Koronararterie (Segment 6).

Koronararterie wurde die LAO-Projektion (left anterior oblique) bevorzugt, für die linke Koronararterie die RAO-Projektion (right anterior oblique). Zur Verbesserung der Meßgenauigkeit der Methode umfaßt die Auswahl nur gut darstellbare Koronarabschnitte. Segmente, die entweder zu kurz oder überlagert waren, oder solche mit einer projektionsbedingten Verkürzung, wurden nicht in Betracht gezogen (Gao et al. 1990). Nur die so ausgewählten Segmente wurden auch in den späteren Koronarangiographien vermessen. Um das Identifizieren der Segmente zu erleichtern, wurden Abzweigungen zur Festlegung der Segmentgrenzen herangezogen und die quantifizierten Segmente als Papierausdrucke dokumentiert (Pinto et al. 1993) (Abb. 1).

Das ausgewählte Koronarsegment wurde enddiastolisch eingestellt und ggf. am Rechner bis 4× vergrößert. Danach wurde die Gefäßmitte mit Hilfe der Maus markiert. Ein Computeralgorithmus identifizierte dann die Gefäßkonturen und ermittelte den Gefäßdurchmesser (in mm) über die gesamte Länge in Form eines Linien-Diagramms. Weiter wurde der Gefäßdurchmesser für jedes Segment über die Länge gemittelt (mittlerer Gefäßdurchmesser). Falls der Computeralgorithmus die Gefäßkonturen im Bereich einer Verzweigung nicht korrekt identifizieren konnte, wurden die Segmentkonturen manuell über maximal 20 % der Segmentlänge korrigiert (Pinto et al. 1993).

Für jede Untersuchung wurde zur Beurteilung der Ausprägung der Transplantatvaskulopathie der Mittelwert der mittleren Gefäßdurchmesser aller beurteilten Segmente als Koronar-Index definiert. Die Differenz der Koronar-Indizes zwischen zwei aufeinanderfolgenden Jahresuntersuchungen wurde entsprechend der tatsächlichen Zeit zwischen den Koronarangiographien korrigiert (Schroeder et al. 1993).

2.2.2.3 Genauigkeit der Messungen

Um unterschiedliche Ausprägungen der Transplantatvaskulopathie (bzw. die Abnahme des Koronar-Index) definieren zu können, wurde die Meßgenauigkeit der Methode ermittelt. Eine solche Bestimmung wurde für das System von Vanguard Instruments (Melville, New York) von Gao und Mitarb. durchgeführt (Gao et al. 1990). Nach diesem Muster wurde auch für das Coronary Angiography Analysis System II die Meßgenauigkeit bestimmt. Hierzu wurden 36 Koronarsegmente ausgewählt, jeweils 18 verschiedene Segmente von der ersten und von der zweiten postoperativen Koronarangiographie. Beim ersten Drittel der Segmente war der Durchmesser klein (Durchmesser $< 2{,}0$ mm), beim zweiten Drittel mittelgroß (zwischen 2,0 und 2,9 mm), und beim letzten Drittel groß (Durchmesser $> 2{,}9$ mm). Für jedes Segment wurden zwei enddiastolische Bilder aus zwei konsekutiven Herzzyklen ausgewählt. Für jedes Bilderpaar wurden der mittlere Gefäßdurchmesser und die Differenz errechnet (Tab. 2).

Als Schwellenwert für eine signifikante Änderung des Gefäßdurchmessers wurde das Dreifache der Standardabweichungen aller Differenzen zwischen den Wertepaaren definiert (Gao et al. 1990). Dies ergibt etwa 0,1 mm, entsprechend 4,1 % Änderung des mittleren Gefäßdurchmessers. Der gleiche Schwellenwert von 0,1 mm wurde für eine signifikante jährliche Änderung des Koronar-Index zugrunde gelegt.

2.3 Immunhistologie

Ziel der immunhistologischen Färbemethoden ist der Nachweis der Vitronektin- und α_v-Integrin-Antigene in den Endomyokardbiopsien. Hierzu wurde bereits zur optimalen Antigenerhaltung auf schonendes Einfrieren geachtet (s. 2.1.3.1.). Weiterhin wurden die Gewebeproben mit der Gefrierschnittechnik verarbeitet. Diese Methode verbindet die Vorteile guter Antigenerhaltung mit Einfachheit der Durchführung (Denk 1989). Damit werden histologische Schnittpräparate von sehr geringer Dicke (5 μm) hergestellt. Für diese Arbeit wurde ein Gefriermikrotom (Leica, Frigocut 2700) benutzt.

Tab. 2: Bestimmung der Genauigkeit der quantitativen Auswertung der Koronarangiogramme durch Vermessung des Koronararteriendurchmessers in zwei konsekutiven Herzzyklen für 36 Koronarsegmente. (n, Anzahl der Koronarsegmente; *, Mittelwert ± SD).

Koronargefäß	n	Koronar-durchmesser (end-diastolisch) D_1^* in mm	Koronardurchmesser in einem konsekutiven end-diastolischen Bild D_2^* in mm	SD der Differenz zwischen D_1 und D_2 in mm
Durchmesser > 2,9 mm	12	3,39 ± 0,32	3,40 ± 0,32	0,033
Durchmesser 2,0–2,9 mm	12	2,29 ± 0,23	2,28 ± 0,22	0,027
Durchmesser < 2,0 mm	12	1,62 ± 0,20	1,64 ± 0,20	0,031
1. Jahr postoperativ	18	2,46 ± 0,86	2,46 ± 0,85	0,030
2. Jahr postoperativ	18	2,41 ± 0,72	2,41 ± 0,71	0,032
Gesamt	36	2,43 ± 0,78	2,44 ± 0,78	0,031

2.3.1 Das Gefriermikrotom (Kryotom)

Das verwendete Kryotom ist ein Rotationsmikrotom. Darin wird der Objekthalter durch Drehen eines Handrads an der feststehende Messerschneide auf und ab bewegt. Die Schnittfläche des Präparats ist dabei senkrecht gestellt. Das Mikrotom befindet sich in einer nach oben offenen Tiefkühltruhe, die eine konstante Temperatur von −30°C gewährleistet.

2.3.2 Gefrierschnittechnik

Die Endomyokardbiopsien wurden von der Tiefkühltruhe zum Gefriermikrotom in flüssigem Stickstoff transportiert und im Inneren des Kryotoms bei −30°C mindestens 15 Minuten temperiert. Die Gewebeproben wurden mit einem wasserlöslichen Klebemittel (Tissue Tek, O.C.T. Compound, Miles, Nr. 4583) auf der Objekthalterung aufgeklebt und mit dem selben Klebemittel umrandet bzw. eingebettet. Dadurch wird eine bessere Schneidequalität erreicht. Zum Schneiden wird ein C-Messer (keilförmig geschliffen) benutzt; der Anstellwinkel wird auf Position 0 eingerichtet, die Schneidetemperatur liegt bei −12°C. Zunächst wird eine Schnittdicke von 10 μm gewählt, das Anti-Rollplättchen (Schnittstrecker) nach unten geklappt, und mehrmals der Gewebeblock angeschnitten. Sobald das Gewebe zum Vorschein kommt, wird der Block mit einem Rasiermesser rechtwinklig, mit einer geraden Kante zur Messerschneide, zugerichtet. Nach Einstellen einer Schnittdicke von 5 μm wird der Schnittstrecker nach oben auf das Mikrotommesser geklappt. So schiebt sich der Schnitt während des Schneidevorganges von der Messerkante weg unter das Plättchen und wird am Aufrollen gehindert. Sobald das Gewebe vollständig an der Messerschneide vorbeigeführt wurde, wird der Schnittstrecker nach unten geklappt und der Schnitt auf einem warmen, mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger (s. 2.3.2.1.) aufgenommen. Hierbei wird warmes Glas nahe genug über den gefrorenen Schnitt gebracht, so daß der Schnitt am Glas anschmilzt. Dieser erste Schnitt wird mit einer Hämalaun-Eosin Doppelfärbung (s. 2.3.2.2) gefärbt und im Lichtmikroskop beurteilt. Falls Arteriolen oder Venolen nachweisbar waren, wurden anschließend 20 aufeinanderfolgende Gefrierschnitte hergestellt und bei Raumtemperatur durch einen elektrischen Ventilator getrocknet. Falls der Schnitt nur Myozyten und einige Kapillaren enthielt, wurde der Gewebeblock weiter bis zu fünfmal angeschnitten, danach ein Schnitt auf einen Objektträger aufgenommen und mit Hämatoxylin-Eosin Doppelfärbung gefärbt. Dieses Verfahren wurde solange wiederholt, bis eine geeignete Schnittebene erreicht wurde. Waren nach mehrmaligem Anschneiden keine Arteriolen oder Venolen nachweisbar, wurde das Schneiden abgebrochen und der restliche Gewebeblock für weitere Untersuchungen (im Rahmen anderer Projekte) aufgehoben. Die getrockneten Gefrierschnitte wurden bis zur Durchführung der immunhistologischen Färbungen bei $-70°$C aufbewahrt.

2.3.2.1 Beschichtung der Objektträger

Eine Beschichtung der Objektträger ist erforderlich, um eine ausreichende Haftung der Gewebeschnitte während der mehrmaligen Waschvorgänge zu gewährleisten. 20 ml der Poly-L-Lysin Ursprungslösung (Sigma Diagnostics, Nr. P 8930) werden 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt und in einen $9 \times 7 \times 6{,}5\,\text{cm}^3$ großen Glaskasten gefüllt. Jeweils 19 Objektträger werden in einem Färbegestell nach einem quer-schräg-quer-Muster angeordnet und für 5 Minuten in die verdünnte Poly-L-Lysin Lösung eingetaucht. Anschließend werden die Objektträger über Nacht bei Zimmertemperatur luftgetrocknet.

2.3.2.2 Hämalaun-Eosin Doppelfärbung (H & E)

Die Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin wurde für Übersichtspräparate während des Gefrierschnittvorgehens eingesetzt, um eine für die nachfolgenden immunhistologischen Methoden geeignete Schnittebene zu finden. Die für die Transplantatvaskulopathie typische Intimaproliferation wurde an Arteriolen und Venolen beschrieben. Deshalb wurde eine Schnittebene gesucht, die neben Kapillaren auch Arteriolen oder Venolen enthielt. Die einzelnen Schritte der Färbemethodik sind die folgenden:

1. Trocknen der Schnitte und 10 Min. fixieren in Aceton.
2. Kernfärbung in Hämalaun (5 Min.).
3. Spülen in Aqua dest.
4. Bläuen in fließendem Leitungswasser (10 Min.).
5. Färben in Eosin, 0,1 % in Aqua dest. (1 Min.).
6. Auswaschen in Aqua dest.
7. Differenzieren in 80%igem Äthanol.
8. 96- und 100%iges Äthanol (je 2 Min.).
9. Xylol (3–5 Min.).
10. Eindecken.

2.3.3 Einfachimmunfluoreszenzfärbung mit der indirekten Biotin-Streptavidin-Methode

Zum Nachweis von Vitronektin, α_v-Integrin sowie Kollagen IV wurden Färbungen nach der indirekten Biotin-Streptavidin-Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Affinität von Streptavidin (ein Protein von Streptomyces Avidinii) zum Vitamin Biotin. Der an das Antigen gebundene spezifische (primäre) Antikörper wird mit einem biotinylierten sekundären, gegen den primären Antikörper gerichteten Antikörper gebunden. Der Nachweis der Sekundärantikörper geschieht durch das mit Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) markierte Streptavidin (Abb. 2). Die Fluorochrome werden im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Nachdem die Schnitte unter kaltem Fön mindestens 30 Min. getrocknet wurden, werden sie für weitere 10 Min. in Aceton fixiert. In den folgenden Färbeschritten werden die Präparate nacheinander mit Blockierlösungen (Avidin, Biotin), Normalserum, Primär-, Sekundärantikörper sowie Streptavidin in den Feuchtkammern bei Zimmertemperatur inkubiert. Eine Blockierung mit Avidin/Biotin ist erforderlich, um eine unspezifische Reaktion durch Anwesenheit von Biotin oder ähnlichen Substanzen im Gewebe zu unterdrücken. Die Vorbehandlung mit Normalserum (aus der gleichen Spezies wie der biotinylierte Antikörper) führt durch Bindung freier reaktiver Gruppen im Gewebe zu einer weiteren Steigerung der Spezifizität der Methode. Nach jedem Inkubationsschritt (Sequenz) werden die Schnitte gewaschen, um die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz möglichst gering zu halten. Anschließend an jeden Waschvorgang, bzw. vor jeder Applikation eines Antikörpers oder der Blockierlösung, werden die Objektträger vorsichtig um den

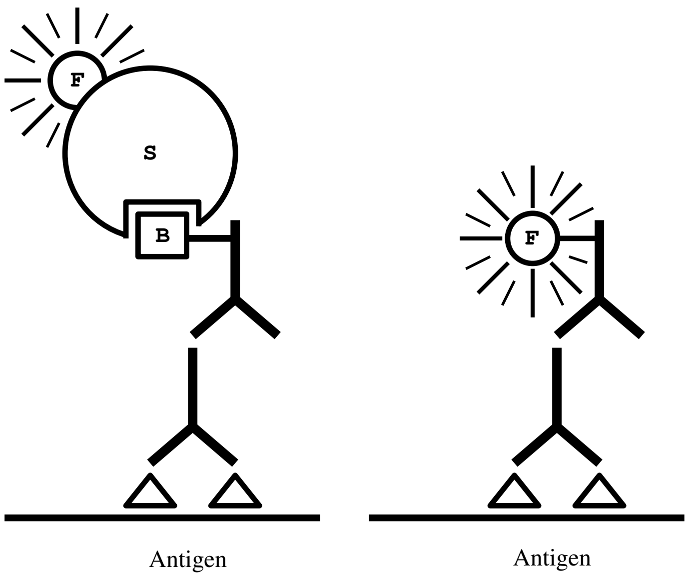

Abb. 2: Immunhistologische Färbemethoden; rechts, indirekte Immunfluoreszenz; links, Biotin-Streptavidin-Methode; B, Biotin; S, Streptavidin; F, Fluorochrom

Schnitt herum von der überflüssigen Waschlösung befreit, um eine unnötige Verdünnung der Antikörper zu vermeiden.

Die Inkubationszeiten wurden konstant gehalten (je nach Sequenz), außerdem wurden für jeden Schnitt stets 60 μl Lösung (Blockier-, Antikörper-, oder Streptavidinlösung) benutzt, um vergleichbare Ergebnisse zwischen den Serien zu erzielen.

Vor dem Durchführen der eigentlichen Färbeprozedur wurde zuerst die Waschlösung (phosphate balanced salt solution oder PBS-Lösung) angesetzt und die Antikörper, bzw. das Normalserum und das Streptavidin verdünnt. Die Feuchtkammer (bzw. der dazugehörige Zellstoff) wurden mit Aqua dest. benetzt, die Schnitte aus der Tiefkühltruhe geholt und mindestens 30 Min. unter kaltem Fön getrocknet.

2.3.3.1 Vorbereitung der PBS-Lösung

Zunächst wird eine 10 Liter PBS-Stammlösung bereitgestellt. Dazu werden folgende Reagenzien benutzt: 818,16 g NaCl, 29,80 g KCl, 32,12 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 166,82 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, sowie 10 Liter Aqua bidest. Für die fertige PBS-Lösung werden 500 ml Stammlösung auf 10 l mit Aqua bidest. aufgefüllt. Vor jeder immunhistologischen Färbeprozedur werden 0,5 % bovines standard Albumin (BSA, Serva, Nr. 11930) hinzugefügt. Die PBS/BSA-Lösung wird

Tab. 3: Herkunft und Verdünnung der Antikörper und Kontrollgammaglobuline. Ak., Antikörper; Kan., Kaninchen; *, die anti-Vitronektin-Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. K. T. Preissner, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim, zur Verfügung gestellt.

Antikörper/Gammaglobulin	Spezifität	Herkunft (Bestell-Nr.)	Species	Verdünnung
Maus-Gammaglobulin	–	Dianova (0571)	Maus	1:1000
Kaninchen-Gammaglobulin	–	Dianova (011-000-002)	Kan.	1:2000
Vitronektin (monoklonales Ak.)	Vitronektin	Dr. K. T. Preissner*	Maus	1:140
Vitronektin (polyklonales Ak.)	Vitronektin	Dr. K. T. Preissner*	Kan.	1:690
α_v-Integrin	α_v-Kette	Biomol (A049)	Maus	1:100
Kollagen IV	Kollagen IV	Dakopatts (M785)	Maus	1:50
Biotinyliertes Ziege-anti-Maus IgG	Maus IgG	Dianova (115-066-071)	Ziege	1:500
Biotinyl. Ziege-anti-Kaninchen IgG	Kan. IgG	Dianova (111-066-046)	Ziege	1:500
Cy3-markiertes Ziege-anti-Maus IgG	Maus IgG	Dianova (115-165-071)	Ziege	1:400
Cy3-markiertes Streptavidin	–	Dianova (016-160-084)	–	1:1000
AMCA-markiertes Streptavidin	–	Dianova (016-150-084)	–	1:50
Cy5-markiertes Streptavidin	–	Dianova (016-170-084)	–	1:50

täglich neu zubereitet, da sie bei Zimmertemperatur nicht haltbar ist. Sowohl für die Herstellung der PBS-Stammlösung als auch für die Auflösung der BSA wird ein Magnetrührer (Janke & Kunkel, KMO 2 electronic) benutzt. Für eine Färbeprozedur werden 2 Liter 0,5%ige PBS/BSA-Lösung hergestellt. Diese Lösung wird sowohl als Waschflüssigkeit als auch als Verdünnungsmittel für die Antikörper benutzt.

2.3.3.2 Vorbereitung der Antikörper

Die Merkmale, die Herkunft und die Verdünnung der benutzten Antikörper sind in Tab. 3 aufgelistet. Die optimale Verdünnung der Primärantikörper wurde in Vorversuchen mit Verdünnungsreihen (1, 5, 10 und 20 μg/ml) erarbeitet. Zur Verdünnung der Antikörper wurde die frisch vorbereitete PBS/BSA-Lösung benutzt. Nach der Verdünnung wurden die Antikörper zur Homogenisierung der Lösung mit einem Schüttelgerät (Janke & Kunkel, Vibrafix VF1 electronic) bei 2000 Rotationen/Min. gemixt. Die markierten Antikörper bzw. das Streptavidin wurden bis zum Gebrauch in einer Dunkelkammer aufgehoben.

2.3.3.3 Methodik

In einem Färbevorgang wurden 30 Gewebeschnitte (5 konsekutive Schnitte von 6 Endomyokardbiopsien) mit einem der folgenden Primärantikörper getestet: monoklonale Antikörper gegen Vitronektin, gegen α_v-Integrin, oder gegen Kollagen IV. Alle Antikörper stammen von der Maus. Für die Negativ-Kontrollen wurden (anstatt eines Primärantikörpers) 0,5%ige PBS/BSA-Lösung sowie Maus-Gammaglobulin benutzt.

Nach der Fixierung in Aceton werden die Gefrierschnitte mit Avidin/Biotin (Avidin/Biotin Blocking Kit, Camon, Nr. SP-2001) und Normalserum (Dianova, Nr. 005-000-121) blockiert. Nach Applikation des Primärantikörpers (30 Minuten bei Raumtemperatur), dreimaligem Waschen in PBS/BSA, Auftragen eines biotin-markierten anti-Maus-Zweitantikörpers (30 Minuten bei Raumtemperatur), erneutem dreimaligem Waschen in PBS/BSA, Auftragen eines Cy3-markierten Streptavidin (30 Minuten bei Raumtemperatur) und erneutem zweimaligem Waschen wird das Präparat in Histogel (Camon, Nr. E 6000) eingedeckt. Die einzelnen Schritte der Färbemethodik sind die folgenden:

1. Trocknen der Schnitte unter kaltem Fön (10 Min.).
2. Fixieren in Aceton (10 Min.).
3. Blockieren mit Avidinblockierlösung (15 Min.).
4. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (max. 10 Min.).
5. Blockieren mit Biotinblockierlösung (15 Min.).
6. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (max. 10 Min.).
7. Blockieren mit Maus-Normalserum 10%ig in PBS/BSA 0,2 % (20 Min.).
8. Waschen (kurz) in PBS/BSA 0,2 % oder nur Abklopfen der Schnitte.
9. Inkubieren mit Primär-Antikörper von der Maus (gegen Vitronektin, α_v-Integrin oder Kollagen IV) (30 Min.).
10. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (3×5 Min.).
11. Inkubieren mit biotinyliertem Ziege-anti-Maus-Antikörper (30 Min.).
12. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (3×5 Min.).
13. Inkubieren (abgedunkelt) mit Streptavidin-Cy3 (30 Min.).
14. Waschen in PBS/BSA (3×5 Min.).
15. Eindecken mit Histogel.

2.3.4 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Zur Charakterisierung der perivaskulären Expression von Vitronektin werden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen (mit anti-Kollagen IV-Antikörper als Marker der vaskulären Basalmembran) eingesetzt. Analog hierzu wird beim Nachweis der Koexpression des Vitronektins zusammen mit α_v-Integrin vorgegangen.

Für eine Doppelimmunfluoreszenz wurden zwei verschiedene Fluorochrome zum Nachweis zweier Antigene im selben Präparat eingesetzt. Dafür wurde die Biotin-Streptavidin-Färbung mit einer einfachen indirekten Immunfluoreszenz kombiniert (Abb. 2). Zunächst wurde eine Biotin-Streptavidin-Färbung mit einem Antikörper gegen Vitronektin durchgeführt. Als Fluorochrom wurde AMCA oder Cy5 benützt. Bei der darauffolgenden indirekten Immunfluoreszenz wird der an das Zweit-Antigen (hier Kollagen IV oder α_{v}-Integrin) gebundene spezifische (primäre) Antikörper über einen mit Cy3 fluorochromierten, gegen den primären Antikörper gerichteten Antikörper nachgewiesen. Zur Vermeidung von ungewünschten Kreuzreaktionen wurden Primärantikörper von zwei verschiedenen Spezies benutzt: Antikörper gegen Vitronektin vom Kaninchen und Antikörper gegen Kollagen IV bzw. gegen α_{v}-Integrin von der Maus.

In dieser Untersuchung wurden zwei Fluorochromkombinationen benutzt. Für die Mehrzahl der Doppelfluoreszenzfärbungen wurden Streptavidin und sekundäre Antikörper markiert mit AMCA bzw. Cy3 eingesetzt. Diese Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und die Ergebnisse getrennt für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff dokumentiert. Die Beurteilung der Antigenkollokalisation (das Auftreten von zwei Antigenen in der gleichen Lokalisation) war somit nur bedingt möglich. Infolgedessen wurden an einer geringen Zahl von Biopsien zusätzlich Doppelfluoreszenzfärbungen mit der Fluorochromkombination Cy5/Cy3 durchgeführt. Diese Schnitte wurden am Laser-Scan-Mikroskop untersucht (s. 2.3.5.2.).

Analog zur einfachen Biotin-Streptavidin-Färbung wurde vor der Durchführung der eigentlichen Färbeprozedur zunächst die Waschlösung angesetzt (s. 2.3.3.1.) und die Antikörper bzw. das Normalserum und das Streptavidin verdünnt (s. 2.3.3.2.). Die optimale Verdünnung der Primärantikörper wurde in Vorversuchen mit Verdünnungsreihen (1, 5, 10 und 20 μg/ml) erarbeitet.

2.3.4.1 Methodik

In einem Färbevorgang wurden 30 Gewebeschnitte (6 konsekutive Schnitte von 5 Endomyokardbiopsien) gleichzeitig mit zwei Primärantikörpern getestet: polyklonaler Antikörper gegen Vitronektin (vom Kaninchen) und monoklonaler Antikörper gegen α_{v}-Integrin bzw. gegen Kollagen IV (Tab. 3).

Für die Doppelimmunfluoreszenzfärbung wird zunächst eine Biotin-Streptavidin-Färbung (mit Anti-Vitronektin-Antikörper und AMCA- bzw. Cy5-markiertem Streptavidin) durchgeführt. Im Anschluß wird der Schnitt mit dem zweiten Primärantikörper (anti-Kollagen IV-Antikörper oder anti-α_{v}-Integrin-Antikörper) inkubiert, erneut dreimal gewaschen und danach mit einem Cy3-markierten anti-Maus-Immunglobulin überschichtet. Nach dem

Waschen erfolgt das Eindecken in Histogel. Die einzelnen Schritte der Färbemethodik sind die folgenden:

1. Trocknen der Schnitte unter kaltem Fön (10 Min.).
2. Fixieren in Aceton (10 Min.).
3. Blockieren mit Avidinblockierlösung (15 Min.).
4. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (max. 10 Min.).
5. Blockieren mit Biotinblockierlösung (15 Min.).
6. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (max. 10 Min.).
7. Blockieren mit Kaninchen-Normalserum 10%ig in PBS/BSA 0,2 % (20 Min.).
8. Waschen (kurz) in PBS/BSA 0,2 % oder nur Abklopfen der Schnitte.
9. Inkubieren mit Primärantikörper vom Kaninchen gegen Vitronektin (30 Min.).
10. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (3×5 Min.).
11. Inkubieren mit biotinyliertem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (30 Min.).
12. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (3×5 Min.).
13. Inkubieren (abgedunkelt) mit Streptavidin-AMCA (30 Min.).
14. Waschen in PBS/BSA (3×5 Min.).
15. Inkubieren (abgedunkelt) mit dem zweiten Primärantikörper (von der Maus, gegen Kollagen IV oder α_v-Integrin) (30 Min.).
16. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (3×5 Min.).
17. Inkubieren (abgedunkelt) mit Cy3-markiertem Ziege-anti-Maus-Antikörper (30 Min.).
18. Waschen in PBS/BSA 0,2 % (3×5 Min.).
19. Eindecken mit Histogel.

Zugleich wurden insgesamt 4 Negativ-Kontrollen (a–d) mitgeführt. Ab der Sequenz 9 wurde der Färbevorgang zu diesem Zweck teilweise geändert:

a) Statt des Vitronektin-Antikörpers wurde PBS/BSA-Lösung eingesetzt, danach wurden die Sequenzen 10 bis 13 ausgeführt und vorzeitig mit Histogel eingedeckt.

b) Nachdem die Sequenzen 9 bis 14 übersprungen wurden, folgte eine Inkubation mit PBS/BSA-Lösung anstatt des Kollagen IV- bzw. α_v-Integrin-Antikörpers; die übrigen Sequenzen blieben unverändert.

c) Statt der beiden Primärantikörper wurde PBS/BSA-Lösung eingesetzt; die übrigen Sequenzen blieben unverändert.

d) Statt des Vitronektin-Antikörpers wurde Kaninchen-Gammaglobulin, und statt des Kollagen IV- bzw. α_v-Integrin-Antikörpers wurde Maus-Gammaglobulin benutzt; die übrigen Sequenzen blieben unverändert.

Für die Doppelfluoreszenzfärbung mit Cy5 und Cy3 wurde das Streptavidin-AMCA in der Sequenz 13 durch Streptavidin-Cy5 ersetzt. Die Färbemethodik und die Kontrollen blieben ansonsten unverändert.

2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der immunhistologischen Präparate (in Einfach- und Doppelimmunfluoreszenz) erfolgt am Fluoreszenzmikroskop im Auflicht-Hellfeldverfahren.

2.3.5.1 Das Fluoreszenzmikroskop

Zur Ausrüstung eines Fluoreszenzmikroskops gehören eine spezielle Lichtquelle, Erregerfilter, Sperrfilter und dichromatische Teilerspiegel für das Auflicht-Hellfeldverfahren.

Das Präparat wird mit kurzwelligem Licht (Erregerlicht) beleuchtet, wahrgenommen wird hingegen nur das von Fluoreszenzfarbstoffen emittierte langwellige Licht (Fluoreszenzlicht). Durch das Erregerfilter werden aus dem Lichtquellenspektrum diejenigen Wellenlängen ausgewählt, die das zu untersuchende Fluorochrom zur Fluoreszenz bringen: das Erregerlicht soll dem Absorptionsmaximum der fluoreszierenden Substanz entsprechen. Das Sperrfilter im Strahlengang ist für das Erregerlicht undurchlässig. Infolgedessen kann nur das im Präparat erzeugte Fluoreszenzlicht das Sperrfilter passieren und in das Okular eintreten.

Beim Auflicht-Hellfeldverfahren fällt das Erregerlicht durch das Objektiv auf das Präparat (das Objektiv selbst wirkt als Kondensor). Um das Erregerlicht in den Strahlengang einzuspiegeln, werden dichromatische Teilerspiegel verwendet, die kurze Wellenlängen reflektieren, langwelliges Licht dagegen durchtreten lassen.

Die Auswertung der immunhistologischen Präparate (Einfach- und Doppelimmunfluoreszenz mit Cy3/AMCA) erfolgte mit einem Zeiss Mikroskop (Typ Standard 16) ausgerüstet mit einer Quecksilber-Höchstdrucklampe (Osram, HBO-100). Für die Darstellung der Cy3-Fluoreszenz wurde ein Filterkomplex eingesetzt, welcher von Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen größer als 590 nm passiert werden kann. Der Filterkomplex besteht aus einem

546 nm Erregerfilter, einem dichromatischen Teilerspiegel für 580 nm sowie einem Sperrfilter für 590 nm. Zusätzlich wurde für die Doppelfluoreszenz ein AMCA-Filterkomplex benutzt. Dieser ist ausgestattet mit einem 365 nm Erregerfilter, einem dichromatischen Teilerspiegel für 395 nm sowie einem Sperrfilter für 420 nm, und kann von Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen größer als 420 nm passiert werden. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Leitz Kamera auf 400 ASA Ektakrome Filmen (Kodak, Tageslicht).

Zur Veranschaulichung der Vitronektin-Lokalisation innerhalb der Gefäßwand wurden bei einer Einfachimmunfluoreszenzfärbung die Gefäßkonturen exemplarisch herausgearbeitet (Abb. 9). Dazu wurden das Programm *xv* von J. Bradley sowie die Bildverarbeitungsprogramme des *Image Format Library* (IFL) von Silicon Graphics benutzt (letztere auch bei Abb. 5, 6 und 10).

2.3.5.2 Das Laser-Scan-Mikroskop

Die Doppelfluoreszenzfärbungen mit der Fluorochromkombination Cy3/Cy5 wurden am Laser-Scan-Mikroskop ausgewertet und dokumentiert. Im Gegensatz zum einfachen Fluoreszenzmikroskop erlaubt das Laser-Scan-Mikroskop die gleichzeitige Anregung von zwei Fluorochromen. Die unter diesen Bedingungen emittierten Wellenlängen werden unterschiedlich farbkodiert (z. B. rot und grün) und auf einem Bild aufgezeichnet. Das Übereinanderliegen der zwei Farben (Nachweis für die Kollokalisation von zwei Antigenen) wird in einer dritten Farbe (z. B. gelb) dargestellt. Für das Erregerlicht wird im Laser-Scan-Mikroskop nur eine Wellenlänge verwendet, die dem Absorptionsmaximum der fluoreszierenden Substanz entspricht. Dies führt zu einer gesteigerten Spezifizität des erzielten Fluoreszenzlichtes bei Fluorochromen, deren Absorptionsmaxima in benachbarten Regionen des Spektrums liegen.

Das in dieser Arbeit benutzte Laser-Scan-Mikroskop (Deutsches Krebsforschungszentrum; Hersteller: Zeiss, Oberkochen) ist mit einem Helium-Neon-Laser ausgestattet. Für das Erregerlicht wurden Wellenlängen von 543 nm (für Cy3) oder 633 nm (für Cy5) benutzt. Die Dokumentation erfolgte mit einem Diabelichtungssystem (Focus Graphics, Farchant).

2.3.5.3 Quantifikation der immunhistologischen Ergebnisse

Die immunhistologischen Präparate wurden im Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filterkombinationen für Cy3 bzw. AMCA untersucht. Um die sichtbare Fluoreszenz histologischen Strukturen zuzuordnen, wurden die konsekutiven Einfachfluoreszenzpräparate mit Kollagen IV als Marker der vaskulären Basalmembran beurteilt und somit Arteriolen, Venolen oder Kapillaren identifiziert. Für die Doppelfluoreszenzpräparate wurde der Schnitt abwechselnd mit dem einen oder dem anderen Filter betrachtet, so daß zusätzlich eine Kollokalisation der untersuchten Antigene beurteilt werden konnte.

Die Expression eines Antigens (bzw. die Intensität der nachgewiesenen Fluoreszenz) wurde subjektiv auf einer Skala von 0 bis 6 eingestuft (0: keine nachweisbare Fluoreszenz; 1: fragliche, sehr diskrete Reaktion; 2: leichte Fluoreszenzintensität, weniger als 25 % des Gefäßumfangs; 3: leichte bis mittlere Fluoreszenzintensität; 4: mittlere Intensität der Fluoreszenz, mehr als 50 % des Gefäßumfangs; 5: mittlere bis starke Fluoreszenzintensität; 6: starke Fluoreszenzintensität, über den gesamten vaskulären Umfang reichend). Die in einem Präparat morphologisch darstellbaren Arteriolen und Venolen wurden zunächst getrennt ausgewertet. Da nicht in allen Präparaten sowohl Arteriolen als auch Venolen nachweisbar waren und somit die Expression der Antigene zwischen den Endomyokardbiopsien nicht verglichen werden konnte, wurde auf eine getrennte Auswertung nach Arteriolen und Venolen verzichtet und die vaskuläre Antigenexpression beurteilt. Falls ein Präparat Gefäße mit unterschiedlicher Ausprägung der Antigenexpression enthielt, wurde nur die höchste nachweisbare Ausprägung berücksichtigt.

Zum quantitativen Vergleich der Antigenexpression zwischen den Patienten wurde für jeden Patient die Antigenexpression über die Anzahl der Biopsien gemittelt, und zwar getrennt für die ersten zwei Monate postoperativ (Früh-Score) und für den späteren Verlauf (Folge-Score). Somit konnte die Antigenexpression auch im Verlauf für jeden einzelnen Patienten beurteilt werden. Für die beiden untersuchten Antigene (Vitronektin und α_v-Integrin) wurden jeweils die Früh- und die Folge-Scores errechnet.

2.4 Statistische Auswertung

In dieser Untersuchung wurden sowohl Methoden der deskriptiven als auch der analytischen Statistik eingesetzt. Zunächst wurden der Mittelwert und die empirische Standardabweichung (SD) der quantitativen klinischen und laborchemischen Daten errechnet (Spender- und Empfängeralter, Ischämiezeit vor der Herztransplantation, Blutdruck, Cholesterin- und Triglycerid-Serumspiegel). Die funktionale Abhängigkeit zwischen den klinischen sowie laborchemischen Daten und den immunhistologischen Ergebnissen (bzw. den Antigen-Scores) wurden für das Patientenkollektiv durch die Ermittlung des linearen Korrelationskoeffizienten r untersucht. Die gleiche Regressionsrechnung wurde für die Gesamtzahl der Endomyokardbiopsien zwischen der Vitronektin- und α_v-Integrin-Expression, sowie zwischen der Antigen-Expression und dem Grad der akuten Abstoßung durchgeführt.

Darüberhinaus wurden Tests der analytischen Statistik eingesetzt: die Prüfung der Signifikanz der erzielten linearen Korrelation erfolgte mit einem Ein-Stichproben-t-Test für den Korrelationskoeffizienten. Weiter wurde im Rahmen der quantitativen Auswertung der Koronarangiogramme geprüft, ob sich der Koronararteriendurchmesser im zeitlichen Verlauf ändert. Hierbei wurden die Koronarindizes zwischen dem ersten und dem zweiten Jahr postoperativ durch einen t-Test für paarige Stichproben verglichen und die Irrtumswahrscheinlichkeit P bestimmt. Ebenso wurde für die zeitliche Entwicklung der Antigen-Expression vorgegangen: verglichen wurden die Früh- und Folge-Scores jeweils für die Vitronektin-und die α_{v}-Integrin-Expression.

Weiterhin wurden die erhobenen klinischen und laborchemischen Daten sowie die immunhistologischen Ergebnisse zwischen zwei Untergruppen des Patientenkollektivs (s. 3.2.2.) verglichen. Geprüft werden sollte, ob die beiden Untergruppen bezüglich eines Parameters zu zwei Grundgesamtheiten mit unterschiedlichem Erwartungswert gehören. Hierzu wurden t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten P bestimmt.

Sowohl für die deskriptive (Mittelwert $\pm$ SD) als auch für die analytische Statistik (t-Tests) wurde das Statistik-Programm der EXCEL 5.0 Software benutzt. Im Vorfeld wurde die Normalverteilung der Daten nach Errechnung der empirischen Verteilungsfunktion geprüft. Für die durchgeführten Tests galt ein P-Wert unter 0,05 als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Das Alter der untersuchten Patienten betrug im Mittel 53 ± 8 Jahre (Bereich 33 bis 63 Jahre; 15 männlich). Die postoperative Beobachtungszeit bis zum Zeitpunkt der zuletzt durchgeführten Koronarangiographie belief sich im Mittel auf 39 ± 13 Monate (Bereich 17 bis 60 Monate). Die präoperative Diagnose war bei 14 Patienten die dilatative Kardiomyopathie und bei jeweils einem Patienten die koronare Herzerkrankung bzw. ein Herzvitium. Weitere klinische und laborchemische Parameter sowie Spenderdaten sind in Tab. 4 aufgeführt.

3.2 Koronarangiographie

Bei allen 16 Patienten wurde eine Koronarangiographie nach einem Jahr postoperativ durchgeführt, bei 15 Patienten außerdem nach zwei Jahren, bei 12 Patienten nach 3 Jahren, bei 6 Patienten nach 4 Jahren und bei einem Patienten nach 5 Jahren postoperativ. Insgesamt wurden 51 Koronarangiogramme (2 bis 5 je Patient) ausgewertet.

3.2.1 Visuelle Beurteilung

Die Auswertung der Koronarangiographie-Befunde zeigte, daß im Mittel 29 ± 8 Monate postoperativ bereits 8 von 16 Patienten eine Transplantatvaskulopathie entwickelt hatten (Abb. 3). Die relative Häufigkeit der TVP im Patientenkollektiv war 6 % nach einem Jahr, 25 % nach zwei Jahren und 50 % nach drei Jahren postoperativ. Nur der Patient 1 zeigte während der Beobachtungszeit signifikante Veränderungen der Koronarien (> 50 % Lumeneinengung). Dieser Patient hat im Verlauf eine schwere Transplantatvaskulopathie mit Befall aller epikardialen Herzkranzgefäße sowie mehrerer kleiner Äste entwickelt, die 17 Monate postoperativ zu seinem Tod führte.

Tab. 4: Klinische und laborchemische Daten der untersuchten Patienten.

	n	Mittelwert ± SD
Postop. Beobachtungszeit (Mon.)		$38{,}5 \pm 12{,}6$
Patienten-Alter (Jahre)		$52{,}8 \pm 8{,}1$
Patienten-Geschlecht (m/w)	15/1	
Präoperative Diagnose		
Dilatative Kardiomyopathie	14	
Koronare Herzerkrankung	1	
Vitium	1	
Präoperative Ischämiezeit (Min.)		$176{,}1 \pm 48{,}9$
Spender-Alter (Jahre)		$38{,}0 \pm 12{,}1$
Spender-Geschlecht (m/w)	11/4	
Abstoßungsscore		
im ersten Jahr postoperativ		$1{,}334 \pm 0{,}562$
Gesamt-Score		$1{,}165 \pm 0{,}459$
Koronar-Index (mm)		
im 1. Jahr		$2{,}15 \pm 0{,}32$
im 2. Jahr		$2{,}05 \pm 0{,}31$
Blutdruck (mm Hg)		
systolisch		$130{,}8 \pm 5{,}9$
diastolisch		$84{,}4 \pm 3{,}6$
Triglycerid-Serumspiegel (mg/dl)		$175{,}9 \pm 63{,}8$
Cholesterin-Serumspiegel (mg/dl)		$232{,}0 \pm 39{,}4$

3.2.2 Quantitative Auswertung

Um die Progression der Transplantatvaskulopathie genauer einschätzen zu können, wurde eine quantitative Auswertung der Gefäßveränderungen mit dem Coronary Angiography Analysis System II (CAAS-II) durchgeführt. Dadurch konnten auch Patienten mit scheinbar unauffälligen Koronararterien erfaßt werden (Abb. 4).

Insgesamt wurden 471 Koronarsegmente (zwischen 20 und 40 je Patient) digitalisiert und vermessen. Die Koronar-Indizes wurden berechnet und für 15 Patienten zwischen dem ersten und dem zweiten postoperativen Jahr verglichen (Tab. 5). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme des Koronar-Index vom ersten zum zweiten postoperativen Jahr von $2{,}15 \pm 0{,}31$ mm auf $2{,}05 \pm 0{,}31$ mm ($P = 0{,}008$).

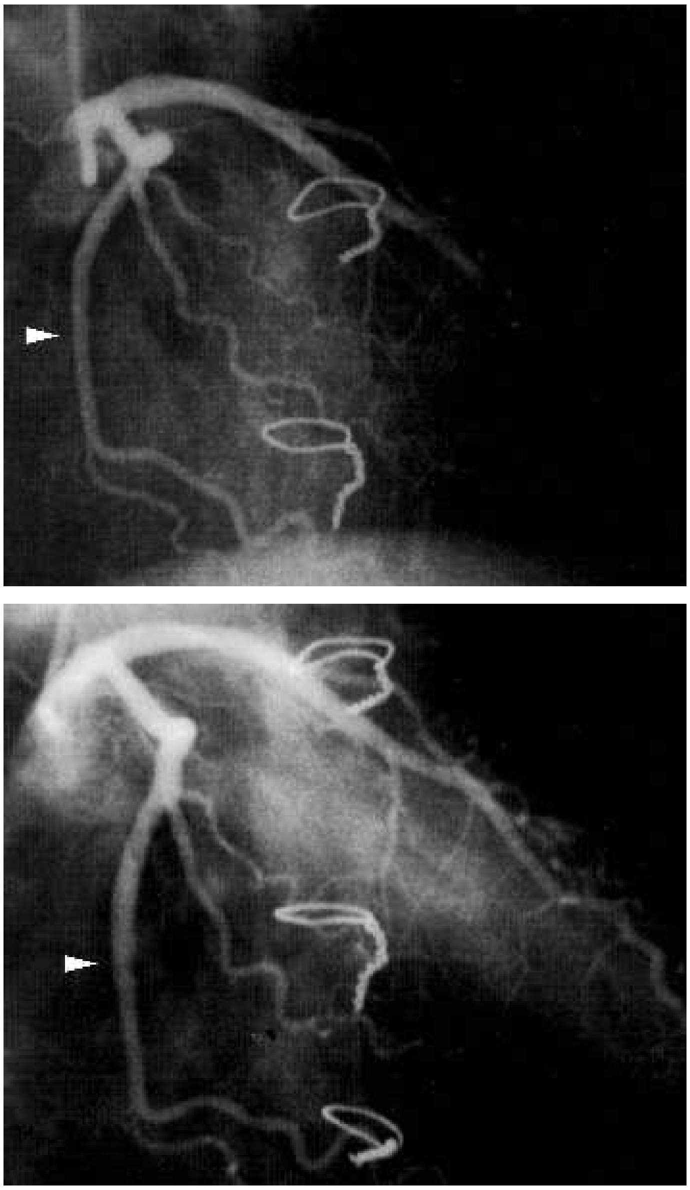

Abb. 3: Koronarangiographie-Bilder nach einem Jahr (oben) und nach drei Jahren (unten) postoperativ bei Patient 4. Neu aufgetretene Koronarveränderungen (25 % Stenose) im Bereich des Ramus circumflexus (Segment 12).

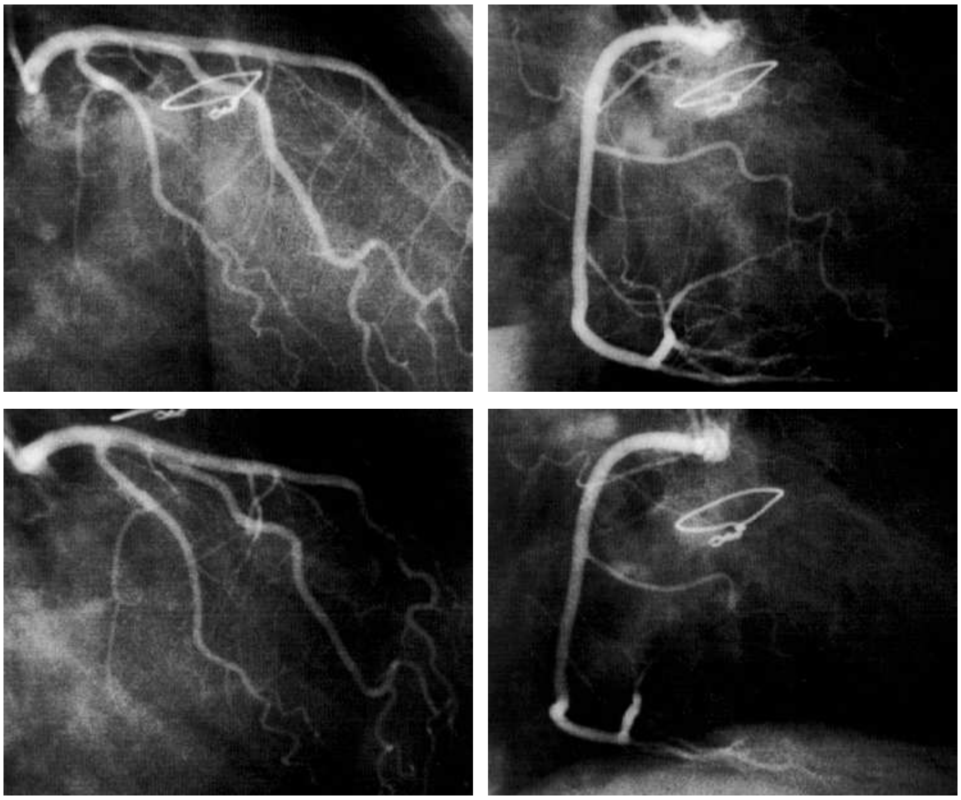

Abb. 4: „Unauffällige“ Koronararterien nach 2 Jahren postoperativ (unten). Deutlich schmalere Koronargefäße im Vergleich zum Koronarangiogramm nach einem Jahr (oben). Rechts, rechte Koronararterie; links, linke Koronararterie.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Meßgenauigkeit (s. 2.2.2.3.) wurden benutzt, um die Patienten in zwei Gruppen einzuteilen: Patienten mit einer schnelleren Entwicklung der Transplantatvaskulopathie einerseits (Gruppe A) und Patienten mit keiner oder einer langsameren Entwicklung der Transplantatvaskulopathie andererseits (Gruppe B). Von einer schnellen Progression der TVP wurde ausgegangen, wenn die Differenz zwischen den Koronar-Indizes der ersten und der zweiten Koronarangiographie das Dreifache der Standardabweichung der Meßfehler überschritt. Dieser Schwellenwert entspricht einer Änderung um $\pm 0{,}1$ mm, bzw. $4{,}1\,\%$ des Gefäßdurchmessers.

Die Abnahme des Koronar-Index war größer als $0{,}1$ mm für zehn Patienten. Zur Gruppe A wurde außer diesen Patienten auch der Patient 1 gerechnet, der an den Folgen einer Transplantatvaskulopathie verstarb. Der Koronar-Index innerhalb der Gruppe A nahm während des zweiten Jah-

Tab. 5: Auswertung der Koronarangiogramme (qualitativ und quantitativ). TVP, Transplantatvaskulopathie; *, die Differenz wurde entsprechend der tatsächlichen Zeit zwischen den Koronarangiographien korrigiert.

Pat.	Anzahl der Koronar-angio-gramme	Angiogr. Diagnose einer TVP in Tagen (Mon.)	Anzahl der quantitativ ausgewerteten Koronar-segmente	Koronar-Index für das 1. Jahr postop. (KI_1) in mm	Koronar-Index für das 2. Jahr postop. (KI_2) in mm	Differenz zwischen KI_1 und KI_2 in mm*
1	1	340 (11)	–	–	–	–
2	3	726 (24)	27	2,45	2,34	−0,11
3	2	764 (25)	18	1,85	1,73	−0,10
4	3	1098 (37)	33	2,72	2,55	−0,15
5	2	733 (24)	16	1,56	1,36	−0,19
6	4	1081 (36)	36	2,62	2,47	−0,14
7	3	1148 (38)	30	2,17	2,07	−0,10
8	4	1101 (37)	28	1,83	1,72	−0,11
9	2	–	20	2,48	2,17	−0,35
10	4	–	28	2,14	1,92	−0,21
11	4	–	40	2,11	1,91	−0,21
12	3	–	36	1,95	1,88	−0,07
13	3	–	27	1,94	2,09	+0,14
14	4	–	40	1,96	2,05	+0,08
15	4	–	52	2,26	2,19	−0,07
16	5	–	40	2,21	2,30	−0,07

res postoperativ signifikant ab von $2{,}19 \pm 0{,}36$ mm auf $2{,}02 \pm 0{,}35$ mm ($P < 0{,}001$).

Die übrigen fünf Patienten (aus der Gruppe B) zeigten über die gesamte Beobachtungsperiode keine signifikante Abnahme des Koronar-Index, d. h. die jährliche Differenz zwischen den Koronar-Indizes hat zu keinem Zeitpunkt den Schwellenwert von 0,1 mm überschritten.

3.3 Immunhistologie

Die quantitative Auswertung der Koronarangiogramme zeigte eine schnelle Progression der Transplantatvaskulopathie bei zwei Drittel der Patienten. Um einen möglichen Zusammenhang der Transplantatvaskulopathie mit der Vitronektin- oder α_v-Integrin-Expression in den Endomyokardbiopsien zu erforschen, wurden immunhistologische Färbungen in Einfach- und Doppelfluoreszenztechnik an Gefrierschnitten durchgeführt.

Die Untersuchungen erfolgten an 93 rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien von 16 herztransplantierten Patienten. Die Endomyokardbiopsien wurden zwischen 2 Wochen und 4 Jahren postoperativ gewonnen. Von den 93 Biopsien konnten 75 (81 %) für immunhistologische Untersuchungen benutzt werden. Die restlichen 18 Biopsien erwiesen sich nach dem Gefrierschneiden und einer Hämalaun-Eosin-Färbung als ungeeignet: sie enthielten nur Kapillaren; Arteriolen oder Venolen waren nicht vorhanden. Insgesamt wurden von jedem Patienten mindestens 3 (im Schnitt 5) serielle Biopsien immunhistologisch untersucht.

3.3.1 Kontrollen

Für jede Einfach- oder Doppelfluoreszenzfärbung wurden Negativ-Kontrollen mit PBS und Maus- bzw. Kaninchen-Gammaglobulin durchgeführt. Die Auswertung der Kontrollen unter dem Fluoreszenzmikroskop hat erwartungsgemäß keine Anfärbung der angeschnittenen Strukturen gezeigt.

3.3.2 Vitronektin in Endomyokardbiopsien der Patienten aus der Gruppe A

Es wurden insgesamt 54 Endomyokardbiopsien von 11 Patienten mit einer schnellen Progression der Transplantatvaskulopathie untersucht. In der Mehrzahl der Präparate wurden Vitronektin-Ablagerungen in den Gefäßwänden der Arteriolen und Venolen nachgewiesen; die Kapillaren zeigten durchgängig keine Vitronektin-Expression (Abb. 5). Drei Biopsien, die früh postoperativ entnommen wurden, zeigten keine Expression von Vitronektin in den Gefäßen.

Im Verlauf wurde bei fast allen Patienten eine Zunahme der Vitronektin-Expression (Abb. 6 und 7) beobachtet. Für die Patienten, von denen eine Frühbiopsie zur Verfügung stand, zeigte der Vitronektin-Score (zusammengefaßt in Tab. 6) eine signifikante Zunahme nach zwei Monaten postoperativ (Früh-Score 1,1±0,8 versus Folge-Score 3,8±0,4, t-Test mit $n = 7$, $P < 0{,}001$, Abb. 8).

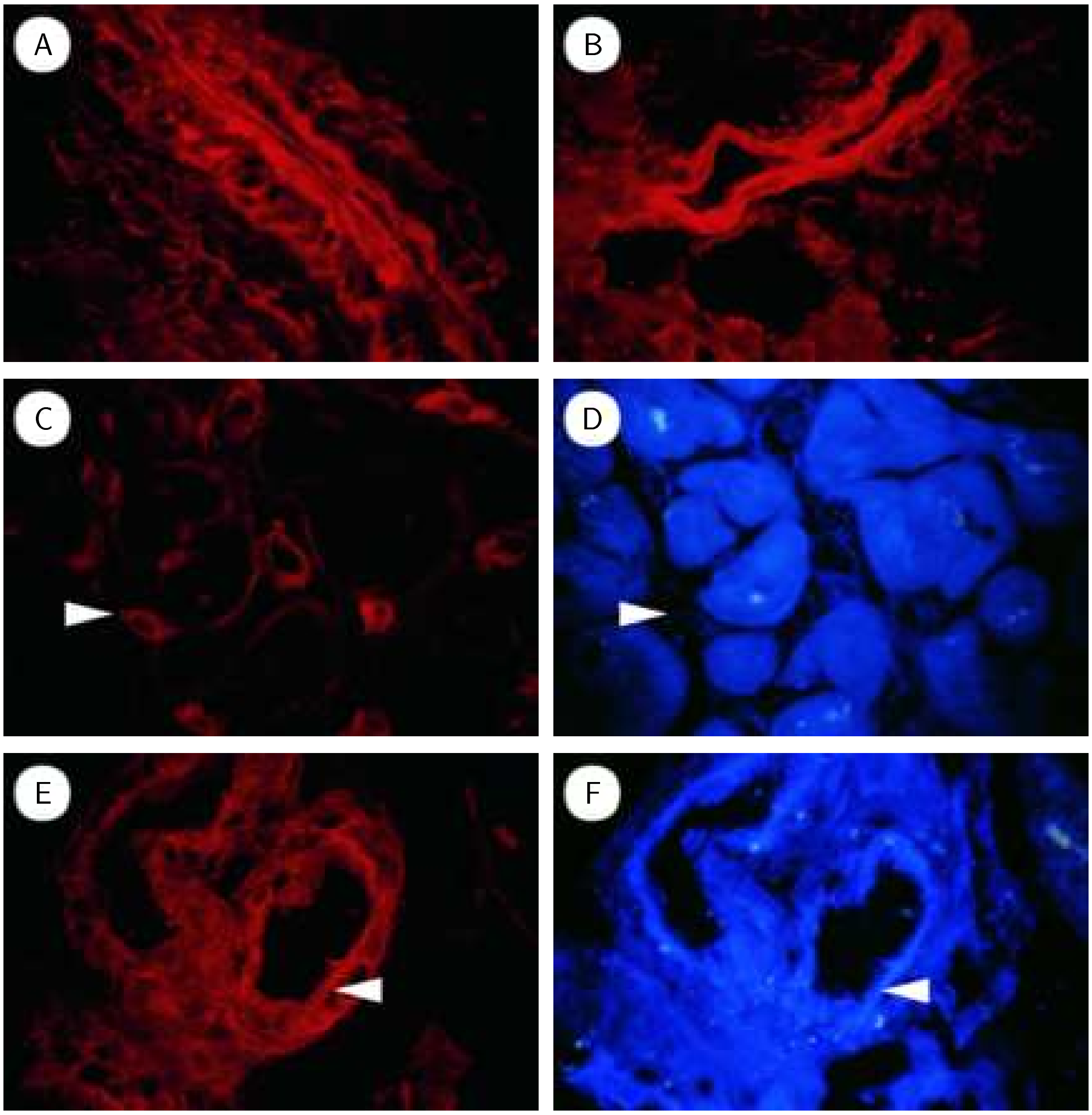

Abb. 5: Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-Vitronektin-Antikörpern (A, B, D, F) und anti-Kollagen IV-Antikörper (C, E). Nachweis des Vitronektin-Antigens in den Arteriolen (A, Vergrößerung 40 ×) und Venolen (B, Vergrößerung 40 ×). In Doppelimmunfluoreszenz zeigten die Kapillaren, dargestellt mit Kollagen IV-Antikörper (C, ▷, Vergrößerung 100 ×) keine Vitronektin-Expression (D, ▷, Vergrößerung 100 ×). Im Bereich der Basalmembranzone waren Kollagen IV (E, ◁, Vergrößerung 40 ×) und Vitronektin (F, ◁, Vergrößerung 40 ×) kollokalisiert.

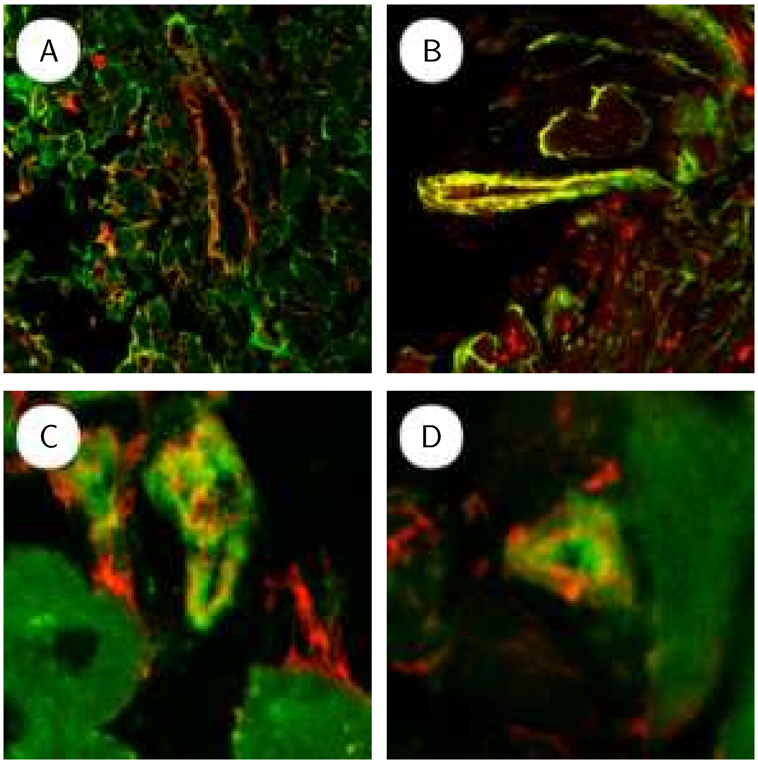

Abb. 6: Doppelimmunfluoreszenzfärbungen (DF) mit Cy3/Cy5, ausgewertet am Laser-Scan-Mikroskop. DF nach 2 Wochen (A) und nach 6 Wochen (B) postoperativ mit anti-Vitronektin- und anti-Kollagen IV-Antikörper. In A: Kollagen IV rot und Vitronektin grün; in B: Kollagen IV grün und Vitronektin rot; das Übereinanderliegen der zwei Farben ergibt gelb. Zunahme der Vitronektin-Expression nach 6 Wochen postoperativ und Nachweis der Kollokalisation der beiden Antigene (gelb). DF mit anti-Vitronektin- und anti-α_v-Integrin-Antikörper (C und D). Vitronektin rot, α_v-Integrin grün; das Übereinanderliegen der zwei Farben ergibt gelb. Nachweis der Kollokalisation von Vitronektin und α_v-Integrin in einer Venole (C) und in einer Arteriole (D) am basalen Pol der Endothelzellen.

Die Vitronektin-Ablagerungen waren mit Kollagen IV, einem Bestandteil der vaskulären Basalmembran, kollokalisiert (Abb. 5 und 6). Folglich kann aus den Doppelfluoreszenzfärbungen abgeleitet werden, daß die Vitronektin-Ablagerungen in der vaskulären Basalmembranzone lokalisiert sind.

Außerdem wurde das Vitronektin-Antigen in der extrazellulären Matrix aller untersuchten Biopsien nachgewiesen.

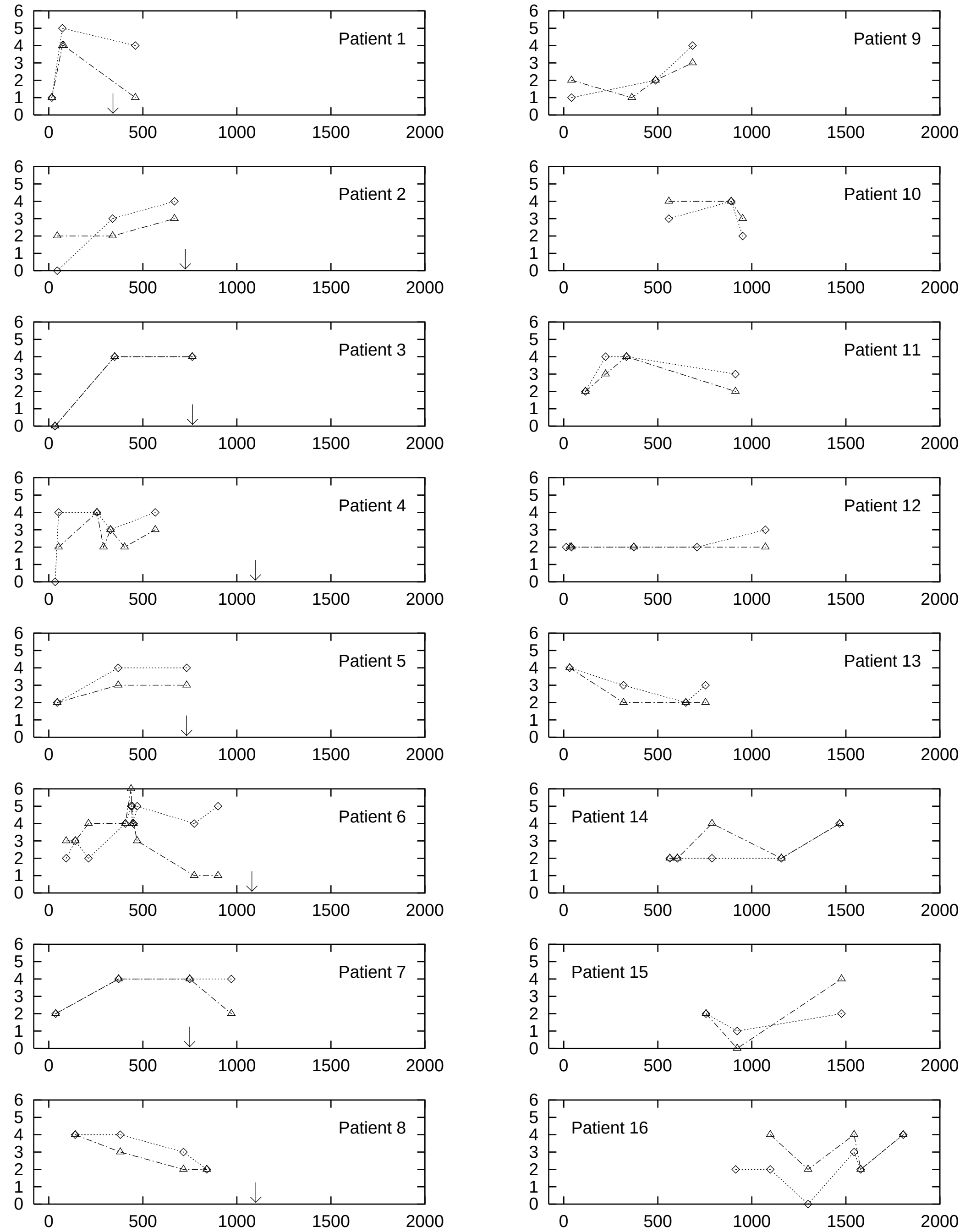

Abb. 7: Antigen-Expression im Zeitverlauf bei 16 Patienten. Auf der Abszisse die Zeit (Tage postoperativ), auf der Ordinate die Antigen-Expression (··◇··, Vitronektin; -·△·-, α_v-Integrin). Der Zeitpunkt der angiographischen Diagnose der Transplantatvaskulopathie ist ggf. mit einem Pfeil dargestellt.

Tab. 6: Antigen-Expression bei 16 Patienten (93 Endomyokardbiopsien). Früh-Score: bis 2. Monat postoperativ; Folge-Score: ab 3. Monat postoperativ.

		Vitronektin-Expression		α_v-Integrin-Expression	
Pat.	Anzahl der Biopsien	Früh-Score	Folge-Score	Früh-Score	Folge-Score
1	6	1,00	4,50	1,00	3,00
2	4	0,00	3,50	2,00	3,00
3	4	0,00	4,00	0,00	4,00
4	10	2,00	3,67	2,00	2,80
5	3	2,00	4,00	2,00	3,00
6	10	–	3,80	–	3,30
7	4	2,00	4,00	2,00	3,33
8	8	–	3,25	–	2,75
9	4	1,00	3,00	2,00	2,50
10	4	–	3,00	–	3,67
11	6	–	3,67	–	3,00
12	7	2,00	2,33	2,00	2,00
13	6	4,00	2,67	4,00	2,00
14	5	–	2,40	–	2,80
15	5	–	1,67	–	2,00
16	7	–	2,17	–	3,20

3.3.3 Vitronektin in Biopsien der Patienten aus der Gruppe B

Es wurden 21 Endomyokardbiopsien von 5 Patienten mit keiner oder einer langsamen Progression der Transplantatvaskulopathie untersucht. In allen Präparaten wurde Vitronektin nachgewiesen. Die Lokalisation des Vitronektin-Antigens stimmte überein mit dem vorher beschriebenen Fall der Gruppe A. Allerdings hatten die Vitronektin-Ablagerungen eine niedrigere Intensität, und die Zunahme der Vitronektin-Expression trat zu einem späteren Zeitpunkt auf. Bei einem Patienten aus dieser Gruppe wurde ein granuläres Verteilungsmuster der Vitronektin-Expression in einer Arteriole beobachtet (Abb. 9).

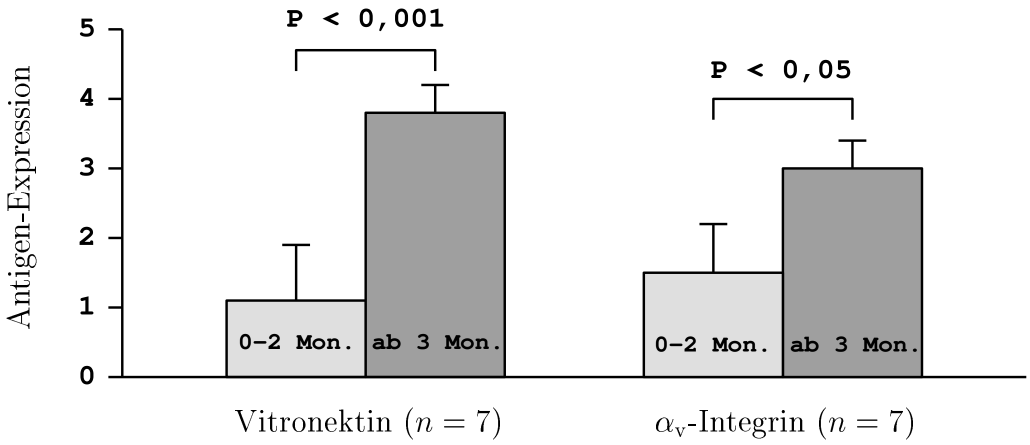

Abb. 8: Zeitverlauf der Antigen-Expression.

3.3.4 α_v-Integrin in Biopsien der Patienten aus der Gruppe A

Um zu prüfen, ob die Vitronektin Ablagerungen mit einer Expression des Vitronektin-Rezeptors $\alpha_v\beta_3$-Integrin assoziert sind, wurden Einfachfluoreszenzfärbungen für die α_v-Kette durchgeführt.

In allen Präparaten wurde α_v-Integrin-Antigen in der Gefäßwand der Arteriolen und Venolen nachgewiesen. Im Gegensatz zu Vitronektin wurde α_v-Integrin in den Kapillaren exprimiert (Abb. 10).

Analog zu Vitronektin wurde im Verlauf eine Zunahme der α_v-Integrin-Expression beobachtet (Abb. 7). Der α_v-Integrin-Score (zusammengefaßt in Tab. 6) zeigte eine signifikante Zunahme nach zwei Monaten postoperativ (Früh-Score $1{,}5 \pm 0{,}7$ versus Folge-Score $3{,}0 \pm 0{,}4$, t-Test mit $n = 7$, $P = 0{,}02$, Abb. 8).

In allen Endomyokardbiopsien war die Vitronektin-Expression signifikant mit der Expression von α_v-Integrin korreliert ($r = 0{,}513$, $P < 0{,}001$).

3.3.5 α_v-Integrin in Biopsien der Patienten aus der Gruppe B

In allen Präparaten wurde das α_v-Integrin-Antigen nachgewiesen. Seine Lokalisation stimmte wiederum überein mit der Gruppe A. Allerdings war in der Gruppe B die Expression des α_v-Integrin weniger intensiv und die Zunahme wurde später beobachtet.

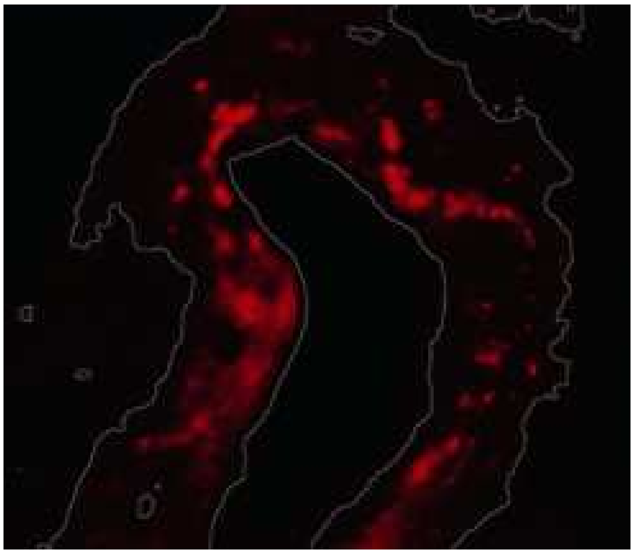

Abb. 9: Vitronektin-Expression in einer Arteriole bei einem Patienten aus der Gruppe B. Die Gefäßkonturen (weiß umrissen) wurden mittels digitaler Bildverarbeitung herausgearbeitet.

3.3.6 Kollokalisation von Vitronektin und α_v-Integrin

Um herauszufinden, ob Vitronektin eventuell an seinen Rezeptor gebunden ist, wurden Doppelfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Vitronektin- und α_v-Integrin-Antigene teilweise kollokalisiert sind, und zwar in den Arteriolen und Venolen am basalen Pol der Endothelzellen und unterhalb der vaskulären Basalmembran (Abb. 6). Das vaskuläre Endothel exprimiert das α_v-Integrin-Antigen (vor allem an der luminalen Zelloberfläche), während das Vitronektin-Antigen unter den Endothelzellen lokalisiert ist, wo es möglicherweise mit dem α_v-Integrin-Antigen zum Teil kollokalisiert ist.

3.3.7 Relation zwischen den immunhistologischen und klinischen Daten

Die Prüfung der funktionalen Abhängigkeit der immunhistologischen Ergebnisse mit den klinischen und laborchemischen Daten wurde getrennt für die Vitronektin- und α_v-Integrin-Expression vorgenommen (lineare Regression). Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Vitronektin- oder α_v-Integrin-Score einerseits und dem Spender- oder Empfängeralter, der Ischämiezeit vor der Herztransplantation, dem Blutdruck, oder dem Cholesterin- oder Triglycerid-Serumspiegel andererseits.

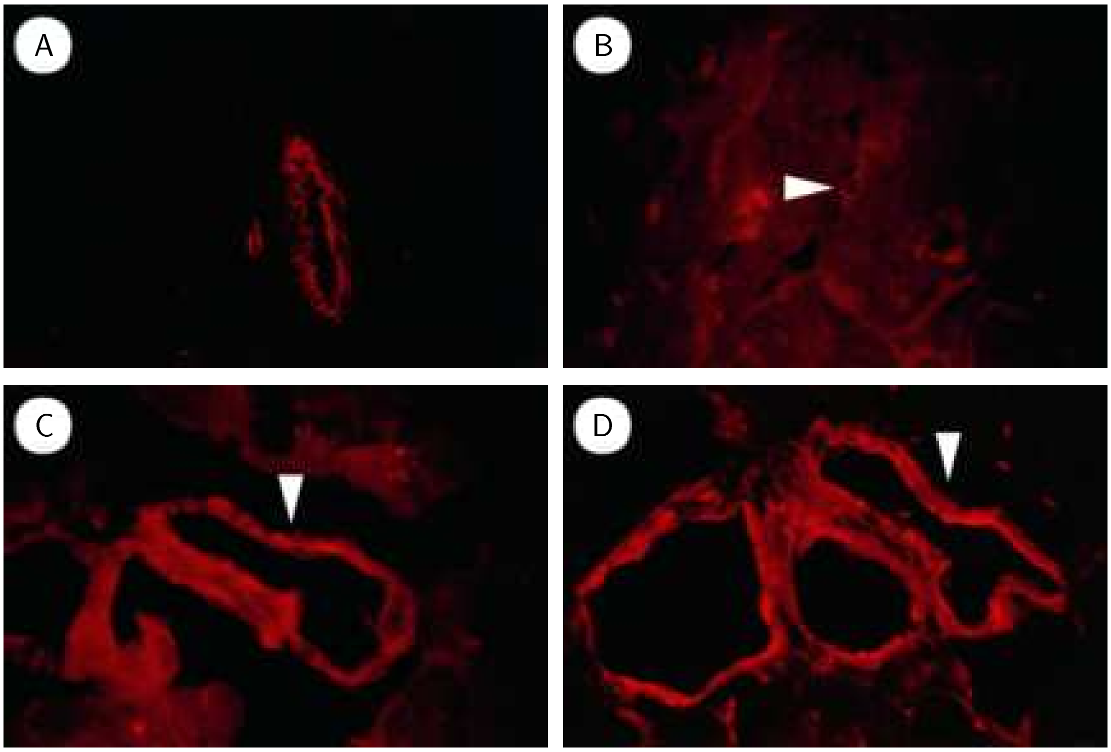

Abb. 10: Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-α_v-Integrin-Antikörper (A, B, C) und anti-Vitronektin-Antikörper (D). Nachweis des α_v-Integrin-Antigens in den Arteriolen (A) und Kapillaren (B). In C und D sind die α_v-Integrin- und Vitronektin-Antigene in den Venolen an konsekutiven Schnitten dargestellt.

3.3.8 Relation zwischen den immunhistologischen Daten und der akuten Abstoßung

Für alle 75 untersuchten immunohistologischen Präparate wurde die Präsenz bzw. die Ausprägung einer akuten Abstoßung mit der Expression der Vitronektin- und α_v-Integrin-Antigene in den Endomyokardbiopsien verglichen (lineare Regression). Sowohl für das Vitronektin als auch für das α_v-Integrin konnte keine signifikante Korrelation mit der Ausprägung der akuten Abstoßungen festgestellt werden ($r = 0{,}04$, $P = 0{,}09$).

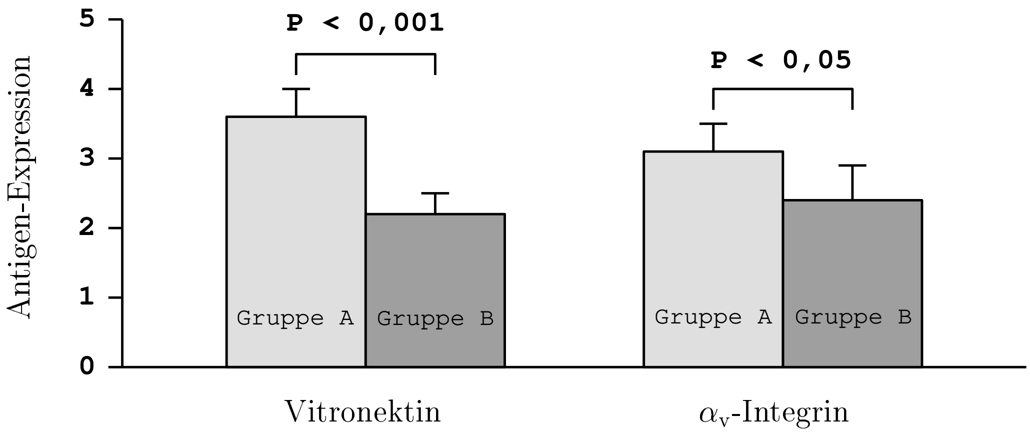

Abb. 11: Antigen-Expression ab dem 3. Monat postoperativ bei Patienten mit einer schnelleren Progression der TVP (Gruppe A, $n = 11$) und bei Patienten mit keiner oder einer langsameren Progression der TVP (Gruppe B, $n = 5$).

3.3.9 Relation zwischen der Transplantatvaskulopathie und der Vitronektin-Expression

Die immunhistologischen Ergebnisse wurden zwischen den zwei Patientengruppen mit unterschiedlicher Ausprägung der Transplantatvaskulopathie verglichen.

Es zeigte sich, daß der Vitronektin-Score (berechnet ab zwei Monaten postoperativ, Folge-Score) in der Gruppe A signifikant höher ist als in der Gruppe B (3,6 ± 0,4 versus 2,2 ± 0,3, $P < 0{,}001$). Bei der α_v-Integrin-Expression war ebenfalls ein Unterschied zwischen den Gruppen A und B vorhanden, aber schwächer ausgeprägt (3,1 ± 0,4 versus 2,4 ± 0,5, $P < 0{,}05$, Abb. 11).

Ferner ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf das Spender- oder Empfängeralter, die präoperative Diagnose, die Ischämiezeit vor der Herztransplantation, den Blutdruck, den Früh- oder Gesamt-Abstoßungsindex, den Cholesterin- oder Triglycerid-Serumspiegel (t-Test, Tab. 7).

Tab. 7: Klinische und laborchemische Daten der Patienten mit einer schnellen Progression der TVP (Gruppe A, $n = 11$) und mit keiner oder einer langsamen Progression der TVP (Gruppe B, $n = 5$). Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt; n.s., nicht signifikant (t-Test).

	Gruppe A ($n = 11$)	Gruppe B ($n = 5$)	P-Wert
Postop. Beobachtungszeit (Mon.)	$34{,}8 \pm 12{,}4$	$46{,}8 \pm 9{,}4$	n.s.
Patienten-Alter (Jahre)	$55{,}7 \pm 6{,}1$	$46{,}3 \pm 8{,}8$	n.s.
Patienten-Geschlecht (m/w)	10/1	5/0	
Präoperative Diagnose			
Dilatative Kardiomyopathie	11	3	
Koronare Herzerkrankung		1	
Vitium		1	
Präoperative Ischämiezeit (Min.)	181 ± 52	165 ± 43	n.s.
Spender-Alter (Jahre)	$37{,}8 \pm 17{,}0$	$30{,}8 \pm 9{,}3$	n.s.
Spender-Geschlecht (m/w)	7/3	4/1	
Abstoßungsscore			
im ersten Jahr postop.	$1{,}303 \pm 0{,}508$	$1{,}403 \pm 0{,}730$	n.s.
Gesamt-Score	$1{,}173 \pm 0{,}499$	$1{,}148 \pm 0{,}407$	n.s.
Blutdruck (mm Hg)			
systolisch	$131{,}8 \pm 6{,}5$	$128{,}4 \pm 3{,}7$	n.s.
diastolisch	$84{,}8 \pm 3{,}8$	$83{,}2 \pm 1{,}6$	n.s.
Triglycerid-Serumspiegel (mg/dl)	$186{,}6 \pm 74{,}5$	$152{,}2 \pm 18{,}7$	n.s.
Cholesterin-Serumspiegel (mg/dl)	$227{,}5 \pm 46{,}6$	$241{,}8 \pm 14{,}3$	n.s.
Koronar-Index (mm)			
im 1. Jahr (KI_1)	$2{,}19 \pm 0{,}38$	$2{,}06 \pm 0{,}16$	n.s.
im 2. Jahr (KI_2)	$2{,}02 \pm 0{,}37$	$2{,}10 \pm 0{,}16$	n.s.
Differenz zwischen KI_1 und KI_2	$0{,}167 \pm 0{,}078$	$0{,}002 \pm 0{,}101$	0,003

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

Ziel dieser Untersuchung war die Charakterisierung der Expression des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien nach Herztransplantation sowie die Einschätzung der diagnostischen Wertigkeit dieser Ligand/Rezeptor-Systems bezüglich der Transplantatvaskulopathie.

Die Beschreibung der Antigenlokalisation und die Zuordnung zu den Gefäßen (Arteriolen, Venolen oder Kapillaren) kann Hinweise auf die pathophysiologische Rolle dieses Rezeptor/Ligand-System liefern. Ähnliche Rückschlüsse erlaubt die Beurteilung der topographischen und temporären Zusammenhänge zwischen der Expression des Vitronektins und der Expression der Vitronektinrezeptoren. Die Expression des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems wurde am transplantierten Herzen bislang nicht untersucht. Mehrere Untersucher beschreiben in der Intima normaler Koronararterien ein diskretes granuläres Verteilungsmuster der Vitronektin-Expression sowie eine starke Antigenanreicherung im Bereich atherosklerotischer Plaques (van Zanten et al. 1994, Guettier et al. 1989, Niculescu et al. 1989). Experimentelle Daten bestätigten die Rolle des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems bei der Entstehung atherosklerotischen Läsionen. Aufgrund der Analogien, die zwischen der Pathogenese der Atherosklerose und der Transplantatvaskulopathie gezogen werden (Intimahyperplasie, Migration und Proliferation glatter Muskelzellen), wurde die Vitronektin- und α_v-Integrin-Expression mit der Ausprägung der Gefäßveränderungen nach Herztransplantation verglichen.

4.2 Methodik

Die Expression des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems wurde in seriellen Endomyokardbiopsien herztransplantatierter Patienten untersucht und intraindividuell verglichen (Longitudinalbeurteilung). Anschließend wurde ein Zusammenhang der immunhistologischen Ergebnisse mit retrospektiv erhobenen klinischen und koronarangiographischen Daten geprüft.

4.2.1 Koronarangiographie

Ziel der Auswertung der Koronarangiogramme war die Beurteilung der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie im untersuchten Patientenkollektiv. Zur Verbesserung der Sensitivität der Untersuchung wurden auch minimale Wandkonturunregelmäßigkeiten in die Bewertung eingeschlossen (Balk et al. 1993). Als pathologisch wurden nur diejenigen Veränderungen betrachtet, die sich im Verlauf nach der ersten Koronarangiographie entwickelt hatten (Schroeder et al. 1993). Die aufgrund des erhöhten Spenderalters möglicherweise präexistenten Koronargefäßveränderungen konnten durch diese Verlaufsbeobachtung erkannt werden.

Infolge des diffusen und konzentrischen Befalls der Koronargefäße wird die Präsenz bzw. die Ausprägung der Transplantatvaskulopathie durch die Koronarangiographie oft unterschätzt (Schroeder et al. 1992). Die quantitative Auswertung der Koronarangiogramme ermöglicht eine genauere Beurteilung der Progression der Transplantatvaskulopathie bei glatten, ansonsten unauffälligen Gefäßkonturen (Schroeder et al. 1992).

In dieser Arbeit wurde das CAAS II-System zur quantitativen Beurteilung der jährlichen Koronarangiogramme eingesetzt. Da diese Erhebung retrospektiv durchgeführt wurde, konnte die Vermessung der Koronarabschnitte über die Zeit nicht in identischen Projektionen durchgeführt werden. Deshalb wurden nur Koronarsegmente ausgewählt, die senkrecht zum Strahlengang verliefen, so daß kleine Winkelvariationen (wegen der konzentrischen Natur der Intimahyperplasie) keinen wesentlichen Einfluß auf die Meßergebnisse bewirkt haben dürften. Ein weiterer Störfaktor für die Genauigkeit der Meßergebnisse ist der Abstand zwischen Röntgenröhre und Tisch. Ein größerer Abstand bewirkte z. B. eine verkleinerte Darstellung der Koronarien mit relativer Koronardurchmesserabnahme. Deshalb wurde für jede Einstellung eine Kalibrierung an der Katheterspitze durchgeführt. Aufgabe der quantitativen Auswertung der Koronarangiogramme war die Errechnung des mittleren Koronardurchmessers an zuvor definierten Koronarsegmenten. Die Auswahlkriterien für die untersuchten Gefäßabschnitte erlaubten deren Wiedererkennung in den konsekutiven Koronarangiogrammen und schlossen ungeeignete Koronarsegmente aus. Für jedes Koronarangiogramm wurde der Mittelwert der (mittleren) Gefäßdurchmesser aller beurteilten Koronarsegmente als Koronar-Index definiert.

Zur Einschätzung der zeitlichen Abnahme des Gefäßdurchmessers (bzw. des Koronar-Index) wurde die Meßgenauigkeit der Methode bestimmt. Dazu wurden 36 Koronarsegmente in konsekutiven Herzzyklen vermessen und die Differenz (sowie die Standardabweichung) der erzielten Werte ermittelt. Diese Bestimmung der Meßgenauigkeit konnte allerdings die interindividuellen (zwischen mehreren Untersuchern) sowie patientenabhängigen Abweichungen (z. B. physiologischer Koronarstatus) nicht berücksichtigen. Die erzielten Ergebnisse (SD der Differenz: 0,031 mm) waren vergleichbar mit denen aus der Arbeitsgruppe Gao et al. (0,033 mm) (Gao et al. 1990). Als Schwellenwert für eine signifikante Änderung des mittleren Koronardurchmessers wurde das Dreifache der Standardabweichungen nach der Bestimmung der Meßgenauigkeit definiert (Gao et al. 1990). Da eine Verengung der Koronargefäße nach Herztransplantation früh postoperativ auftritt (Gao et al. 1990), wurde der Zeitraum für die Feststellung einer Änderung der Koronar-Indizes zwischen das erste und das zweite postoperative Jahr gelegt.

Die Beurteilung der jährlichen Koronarangiogramme erlaubte somit die Einteilung der Patienten in zwei Gruppen: solche mit einer schnelleren Progression (Gruppe A) und solche mit einer langsamen Progression der Transplantatvaskulopathie (Gruppe B).

4.2.2 Immunhistologie

Die Expression des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems wurde in 93 Endomyokardbiopsien untersucht. Bereits im Vorfeld wurde zur besseren Erhaltung der Antigene auf schonendes Einfrieren der Biopsien geachtet. Darüberhinaus wurden zur Steigerung der Sensitivität/Spezifizität der immunhistologischen Färbungen zusätzliche Blockier-Sequenzen (mit Avidin/Biotin sowie Normalserum) eingesetzt. Sowohl die Mengen als auch die Inkubationszeiten für die benutzten Antikörper waren zwischen den Serien gleich. Um die Spezifizität der Methode zu überprüfen, wurden Negativ-Kontrollen (mit PBS und Maus- bzw. Kaninchen-Gammaglobulin anstatt der Primärantikörper) mitgeführt. Erwartungsgemäß zeigte keine dieser Kontrollen eine Anfärbung. Demzufolge konnten die Präparate unter Einsatz der Primärantikörper ohne störende unspezifische Hintergrundfluoreszenz beurteilt werden. Für die Darstellung der Vitronektin-Expression wurden zwei Antikörper eingesetzt: monoklonaler Antikörper von der Maus (für die Einfachimmunfluoreszenzfärbung) sowie polyklonaler Antikörper vom Kaninchen (für die Doppelimmunfluoreszenzfärbung). In den beiden Färbungen wurden mit den zwei verschiedenen Antikörpern die gleiche Ergebnisse (bezüglich Lokalisation und Intensität der Vitronektin-Expression) erzielt. Dies spricht für eine ähnliche Sensitivität und Spezifizität der benutzten Antikörper gegen Vitronektin.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Patientenkollektiv

Die Untersuchung wurde an 16 herztransplantierten Patienten durchgeführt. Bei diesem Patientenkollektiv war das Spenderalter (im Mittel 38 ± 12 Jahre) höher als in anderen Studien: z. B. Gao et al. 22 ± 5 Jahre (Gao et al. 1990), Labarrere et al. 28 ± 1 Jahre (Labarrere et al. 1995).

4.3.2 Koronarangiographie

Bei der visuellen Beurteilung der Koronarangiogramme wurde nach 3 Jahren bei 50 % der Patienten eine Transplantatvaskulopathie diagnostiziert. Dieser Befund ist mit den Ergebnissen anderer Untersucher vergleichbar: bisher wurde, je nach Methodik und Kriterien für die Diagnostik der TVP, über Prävalenzen zwischen 44 % und 64 % nach 3 Jahren berichtet (Uretsky et al. 1987, Balk et al. 1993). Nach der quantitativen Auswertung hatten 11 der 16 Patienten (68 %) eine Abnahme des Koronarindex um mehr als 0,1 mm während des zweiten postoperativen Jahres. Demgegenüber berichten Gao et al. über eine signifikante Abnahme des mittleren Koronardurchmessers während des ersten postoperativen Jahres bei 84 % der untersuchten Patienten (Gao et al. 1990). Der höhere Prozentsatz läßt sich durch eine höhere Sensitivität dieser prospektiv durchgeführten Studie erklären.

4.3.3 Immunhistologie

Die Expression von Vitronektin und α_v-Integrin wurde in insgesamt 75 Endomyokardbiopsien untersucht. Vitronektin- und α_v-Integrin-Antigene wurden in den Arteriolen und Venolen nach Herztransplantation nachgewiesen. Die Anreicherung der beiden Antigene ereignete sich während der ersten zwei postoperativen Monate. Darüberhinaus waren die Vitronektin- und α_v-Integrin-Expression bei Patienten mit einer schnelleren Progression der Transplantatvaskulopathie stärker ausgeprägt.

4.3.3.1 Lokalisation der Antigene in den Gefäßen

Vitronektin wurde in dieser Arbeit sowohl in den Arteriolen als auch in den Venolen nachgewiesen. Der diffuse Befall dieser Gefäße mit Entwicklung einer Intimahyperplasie ist andererseits ein bedeutendes histologisches Merkmal der Transplantatvaskulopathie (Oni et al. 1992). Somit deutet die Präsenz der Vitronektin- und α_v-Integrin-Antigene in den Arteriolen und

Venolen nach Herztransplantation auf eine mögliche Rolle in der Entstehung der Gefäßveränderungen hin.

In der Mehrzahl der Präparate wurden die Vitronektin- und α_v-Integrin-Antigene diffus über den gesamten Gefäßumfang in Arteriolen oder Venolen nachgewiesen. In einer Endomyokardbiopsie von einem Patienten ohne angiographisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie konnte eine größere Arteriole quer angeschnitten werden. Hierbei wurde ein diskretes granuläres Muster der Vitronektindeposition (vorbeschrieben von Gueltier et al. in der Media normaler Arterien) beobachtet (Gueltier et al. 1989). Dieses Muster könnte der Lokalisation der glatten Muskelzellen entsprechen: Vitronektin wurde perizellulär in den glatten Muskelzellen unauffälliger Gefäße nachgewiesen (Simonton et al. 1985). Ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete ausgeprägte diffuse Vitronektin-Expression (vorwiegend bei Patienten mit nachgewiesener TVP) einer Vermehrung der glatten Muskelzellen gleichgestellt werden kann, wurde nicht untersucht. Dafür wären Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Marker der glatten Muskelzellen (z. B. alpha-Aktin) erforderlich.

Im Bereich der vaskulären Basalmembran war Vitronektin mit Kollagen IV kollokalisiert. Bisher wurde angenommen, daß in der Basalmembran der Mehrzahl humaner Gewebe kein Vitronektin vorkommt. Ausnahme war die tubuläre Basalmembran bei Patienten mit tubulo-interstitieller Nephritis (Falk et al. 1987). Allerdings wurde bei Kaninchen eine starke Expression von Vitronektin in der vaskulären Basalmembran gezeigt (Sawa et al. 1993). Darüberhinaus ist eine deutliche Interaktion von Vitronektin mit Kollagen IV in vitro bekannt (Gebb et al. 1986). Möglicherweise könnte diese Reaktion auch in vivo stattfinden und infolgedessen die Präsenz des Vitronektin-Antigens in der vaskulären Basalmembran erklären.

Die Ergebnisse zeigten, daß das vaskuläre Endothel (in Arteriolen, Venolen und Kapillaren) α_v-Integrin exprimiert, darüberhinaus wurde dieser Rezeptor subendothelial nachgewiesen. Das vaskuläre Endothel exprimiert $\alpha_v\beta_3$-Integrin als einziges Integrin mit einer α_v-Kette (Bosman 1993). Somit entspricht die endotheliale α_v-Integrin-Expression der Lokalisation des $\alpha_v\beta_3$-Integrins. Ferner wird $\alpha_v\beta_3$-Integrin in den zellulären Bereichen atherosklerotischer Plaques bzw. in Zellen, die als glatter Muskelzellen identifiziert wurden, nachgewiesen (Hosinga et al. 1995). Folglich kann vermutet werden, daß subendotheliales α_v-Integrin von glatten Muskelzellen exprimiert wird.

In den Doppelimmunfluoreszenzfärbungen zeigte sich, daß Vitronektin und α_v-Integrin am basalen Pol der Endothelzellen teilweise kollokalisiert sind, wobei beide Antigene subendothelial und α_v-Integrin zusätzlich von den Endothelzellen selbst exprimiert werden. Das Endothel als Zellschicht mit Antigencharakter spielt bei der Transplantatvaskulopathie eine entscheidende Rolle (Hosenpud et al. 1992). In diesem Zusammenhang wird über die "response to injury" Hypothese gesprochen (Ross 1986, Ross 1993). Diese Hypothese nennt die Verletzung der Endothelzellen als einleitenden Faktor für eine tiefergreifende Gefäßschädigung. Infolge einer Immunantwort des Empfängers gegen das transplantierte Organ tritt der Tod oder eine partielle Schädigung der Endothelzellen auf. Die nachfolgende gesteigerte Endothelpermeabilität könnte einigen mitogen wirkenden Plasmakomponenten den Zugang zu den subendothelialen Schichten ermöglichen (Ross 1986). Die Folge wäre eine Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen mit Neointimabildung. Somit könnte die Koexpression der Vitronektin- und α_v-Integrin-Antigene im Bereich des basalen Pols der Endothelzellen einer Ligand-Rezeptor-Interaktion (mit nachfolgender Zellaktivation und gesteigerter Proteinsynthese) entsprechen.

4.3.3.2 Vitronektin/α_v-Integrin-System und die Transplantatvaskulopathie

Die Expression von Vitronektin und α_v-Integrin war bei Patienten mit einer schnelleren Progression der Transplantatvaskulopathie stärker ausgeprägt. Der Anstieg der Antigen-Expression wurde früher (im Mittel 8 Monate postoperativ) als die angiographische Diagnose der Transplantatvaskulopathie (im Mittel 29 Monate postoperativ) ermittelt. Möglicherweise ist somit Vitronektin ein Frühmarker der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie.

Die Provenienz des vaskulären Vitronektins blieb bisher ungewiß. Einerseits könnte es sich um Ablagerungen des im Plasma zirkulierenden Glykoproteins handeln, begünstigt durch den ursprünglichen Endothelschaden mit gesteigerter Endothelpermeabilität. Anderseits könnte Vitronektin lokal sezerniert sein. Dafür spricht die Beobachtung, daß die Monozyten/Makrophagen und die glatten Muskelzellen Vitronektin in vitro sezernieren (Hetland et al. 1989, Preissner 1991): die Intimahyperplasie nach Herztransplantation enthält eine große Zahl an glatten Muskelzellen und „lipidbeladenen" Makrophagen (Billingham 1992). Bisher wurde Vitronektin in vivo perizellulär in den vaskulären glatten Muskelzellen unauffälliger Gefäße (Simonton et al. 1985) und um „lipidbeladene" Makrophagen in den atherosklerotischen Plaques nachgewiesen (Lupu et al. 1993). Nach Ballonverletzung der Aorta bei Kaninchen unter hypercholesterolemischer Diät fanden Sawa et al. Vitronektin-mRNA in den „lipidbeladenen" Makrophagen (Sawa et al. 1993). Diese experimentellen Daten legen die Vermutung nahe, daß Vitronektin lokal von Makrophagen und/oder glatten Muskelzellen in die Gefäßwand der Patienten mit Transplantatvaskulopathie sezerniert werden könnte.

Bei der klassischen Atherosklerose gilt die pathophysiologische Rolle des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems als gesichert. In diesem Zusammenhang zeigten Brown et al. eine Stimulation der Wanderung humaner aortaler glatter Muskelzellen durch Vitronektin in vitro; inhibitorische Antikörper gegen das $\alpha_v\beta_3$-Integrin hemmten diese Zellwanderung (Brown et al. 1994). Im Tierexperiment erzielten Choi et al. ebenfalls eine Hemmung der Intimahyperplasie der A. carotis nach Ballonverletzung durch einen Antagonisten des Vitronektins (GpenGRGDSPCA) (Choi et al. 1994). Neben der $\alpha_v\beta_3$-Integrin-dependenten Migration der glatten Muskelzellen beeinflußt Vitronektin auch deren Phänotyp in der Richtung eines „synthetischen“ Phänotyps (Hayward et al. 1995). Die glatten Muskelzellen aus der Intima atherosklerotischer Arterien sind zu unterscheiden von denselben Zellen aus der Media unauffälliger Gefäße: sie exprimieren weniger Myofilamente, dafür mehr Organellen, und haben somit die Fähigkeit, Proteine der extrazellulären Matrix zu synthetisieren: der „synthetische“ Phänotyp (Mosse et al. 1985, Mosse et al. 1986). Ferner ist die Bedeutung des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems für die Adhäsion der Endothelzellen an die extrazelluläre Matrix bekannt (Ruoslahti et al. 1985, Preissner et al. 1988, Underwood u. Bennett 1989). Ebenfalls beeinflußt das Vitronektin/α_v-Integrin-System die Tumorangiogenese (Brooks et al. 1994, Löhr et al. 1994). Antikörper gegen das $\alpha_v\beta_3$-Integrin hemmten im Tierexperiment die retinale Neovaskularisation (Hammes et al. 1996) ebenso wie die intrakutane Angiogenese des Mammakarzinoms (Brooks et al. 1995). Bei der Transplantatvaskulopathie werden T-Zellen-vermittelte Reaktionen gegen spendereigene MHC-Moleküle als Grundlage für die Entstehung der Gefäßveränderungen vermutet (Pober u. Contran 1990). In diesem Zusammenhang konnte experimentell gezeigt werden, daß die Bindung des $\alpha_v\beta_3$-Integrins an seinen Liganden eine Aktivation der T-Zellen mit konsekutiver Sekretion von Zytokine zur Folge hat (Sturmhofel et al. 1995). Diese antigenunabhängige Integrin-vermittelte Aktivation der T-Lymphozyten könnte also eine wesentliche Rolle in der Potenzierung der Immunreaktion spielen (Sturmhofel et al. 1995, Halvorson et al. 1996).

Das Vitronektin/α_v-Integrin-System spielt eine Rolle in der Adhäsion der Endothelzellen an der extrazellulären Matrix, in der Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen sowie in der Aktivation der T-Lymphozyten. Somit könnten die Funktionen einer Mehrzahl von Zellen, die an der Entstehung der Transplantatvaskulopathie beteiligt sind, durch dieses Ligand/Rezeptor-Systems beeinflußt werden. Demzufolge besteht möglicherweise bei der Transplantatvaskulopathie ähnlich wie bei der klassischen Atherosklerose eine Beziehung zur Entstehung der Gefäßveränderungen.

4.3.3.3 Risikofaktoren bei der Transplantatvaskulopathie

Die Untersuchung der klinischen und laborchemischen Parameter (Spender- und Empfängeralter, präoperative Diagnose, Ischämiezeit vor der Herztransplantation, Blutdruck, Cholesterin- oder Triglycerid-Serumspiegel) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit einer schnelleren oder einer langsameren Progression der Transplantatvaskulopathie. Über das Fehlen einer engen Korrelation zwischen der Transplantatvaskulopathie und den „klassischen“ koronaren Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie oder Raucheranamnese wird auch in einer Mehrzahl von Studien berichtet (Uretsky et al. 1987, Gao et al. 1987, Billingham 1989, Labarrere et al. 1995). Dies bestätigt die Annahme, daß die Gefäßveränderungen im Transplantat immunologisch bedingt sind.

4.4 Studienlimitationen

Die hauptsächlichen Limitationen dieser Untersuchung sind einerseits auf die retrospektive Auswertung der Koronarangiogramme und anderseits auf das Fehlen von time-zero Biopsien zurückzuführen.

Die quantitative Auswertung der Koronarangiogramme wurde zur Steigerung der Sensitivität der Methode durchgeführt. Die Hauptergebnisse dieser Untersuchung wären jedoch auch ohne quantitative Auswertung erzielt worden: der Unterschied der Vitronektin-Expression zwischen Patienten mit und ohne angiographisch nachweisbare Transplantatvaskulopathie ist weiterhin vorhanden ($3{,}8 \pm 0{,}3$ versus $2{,}6 \pm 0{,}6$, $P < 0{,}001$).

Zur Kontrolle der immunhistologischen Ergebnisse standen keine Probeentnahmen zum Zeitpunkt der Transplantation zur Verfügung. Allerdings zeigten sehr frühe Endomyokardbiopsien (ca. 2 Wochen postoperativ) keine Vitronektin-Expression. In anderen Arbeiten werden zwar deutliche Vitronektin-Ablagerungen in den atherosklerotischen Plaques beschrieben, die unbetroffene gegenüberliegende Gefäßwand exprimierte jedoch kein oder nur wenig Vitronektin (Guettier et al. 1989, Niculescu et al. 1989). Es kann folglich angenommen werden, daß die normalen Gefäße kein Vitronektin exprimieren und daß die Ablagerung von Vitronektin in den Arteriolen und Venolen nach Herztransplantation ein Zeichen für erfolgte Gefäßveränderungen ist. Außerdem empfiehlt sich aufgrund des begrenzten Stichprobenumfangs (Patientenzahl), die statistischen Auswertungen an einem größeren Patientenkollektiv zu bestätigen.

4.5 Schlußfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, daß bei der Transplantatvaskulopathie analog zur klassischen Atherosklerose eine Beziehung des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems zur Entstehung der Gefäßveränderungen besteht.

5 Zusammenfassung

Die Langzeitprognose nach Herztransplantation wird maßgeblich durch das Auftreten einer Transplantatvaskulopathie bestimmt. Diese ist gekennzeichnet durch eine Intimahyperplasie, die gleichermaßen in Arterien und Venen des Transplantats auftritt und schließlich zum Funktionsverlust des transplantierten Organs führt.

Bei der klassischen Atherosklerose kann die pathogenetische Bedeutung des Vitronektin/$\alpha_v\beta_3$-Integrin-Systems für die Entstehung der Intimahyperplasie als gesichert angesehen werden. Arbeitshypothese der vorliegenden Untersuchungen war, daß diesem Ligand/Rezeptor-System bei der Transplantatvaskulopathie eine ähnliche pathogenetische Bedeutung zukommt. Daher wurde zunächst die Expression des Vitronektin/$\alpha_v\beta_3$-Integrin-Systems in rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien charakterisiert. Die Untersuchungen erfolgten an 93 seriellen Endomyokardbiopsien von 16 herztransplantierten Patienten. Hierzu wurden Einfach- und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Vitronektin und α_v-Integrin eingesetzt. Parallel wurden die jährlichen Koronarangiogramme qualitativ und quantitativ (mit dem CAAS-II System) beurteilt. Anschließend wurden koronarangiographische Befunde mit den immunhistologischen Daten verglichen. Ziel dieser Analyse war die Bewertung der Expression von Vitronektin und $\alpha_v\beta_3$-Integrin als Marker für die Progression der Transplantatvaskulopathie. Die immunhistologischen Untersuchungen brachten den Nachweis der Vitronektin- und α_v-Integrin-Expression in den Arteriolen und Venolen nach Herztransplantation. Im Gegensatz hierzu zeigten die Kapillaren keine Vitronektin-Expression, wohl aber eine α_v-Integrin-Expression. Im Verlauf wurde bei Patienten, bei denen eine Frühbiopsie vorlag, eine Zunahme der Vitronektin- und α_v-IntegrinExpression in den Arteriolen und Venolen beobachtet. Darüberhinaus war die Vitronektin- und α_v-Integrin-Expression bei Patienten mit nachgewiesener Transplantatvaskulopathie stärker ausgeprägt. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen demnach die Hypothese, daß bei der Transplantatvaskulopathie ebenso wie bei der klassischen Atherosklerose eine Beziehung des Vitronektin/α_v-Integrin-Systems zur Entstehung der Gefäßveränderungen besteht.

6 Literaturverzeichnis

Athanasou NA, Quinn J, Horton MA, McGee JO (1990)
New sites of cellular vitronectin receptor immunoreactivity detected with osteoclast-reacting monoclonal antibodies 13C2 and 23C6.
Bone Miner 8: 7–22

Balk AHMM, Simoons ML, vd Linden MJMM, de Feyter PJ, Mochtar B, Weimar W, Bos E (1993)
Coronary artery disease after heart transplantation: timing of coronary arteriography.
J Heart Lung Transplant 12: 89–99

Barnes DW, Reing J (1985)
Human spreading factor: synthesis and response by HepG2 hepatoma cells in culture.
J Cell Physiol 125: 207–214

Bieber CP, Hunt SA, Schwinn DA, Jamieson SA, Reitz BA, Oyer PE, Shumway NE, Stinson EB (1981)
Complications in long-term survivors of cardiac transplantation.
Transplant Proc 13: 205–211

Billingham ME (1987)
Cardiac transplant atherosclerosis.
Transplant Proc 19 suppl 5: 19–25

Billingham ME (1989)
Graft coronary disease: the lesions and the patients.
Transplant Proc 21: 3665–3666

Billingham ME (1992)
Histopathology of graft coronary disease.
J Heart Lung Transplant 11: S38–S44

Billingham ME, Cary NRB, Hammond ME, Kemnitz J, Marboe C, McCallister HA, Snovar DC, Winters GL, Zerbe A (1990)
A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group.
J Heart Lung Transplant 9: 587–593

Bosman FT (1993)
Integrins: cell adhesives and modulators of cell function.
Histochem J 25: 469–477

Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA (1994)
Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.
Cell 79: 1157–1164

Brooks PC, Strömblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA (1995)
Antiintegrin $\alpha_v\beta_3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin.
J Clin Invest 96: 1815–1822

Brown SL, Lundgren CH, Nordt T, Fujii S (1994)
Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cell by vitronectin: implications for atherosclerosis.
Cardiovasc Res 28: 1815–1820

Choi ET, Engel L, Callow AD, Sun S, Trachtenberg J, Santoro S, Ryan US (1994)
Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking $\alpha_v\beta_3$ integrin with a small peptide antagonist GpenGRGDSPCA.
J Vasc Surg 19: 125–134

Denk H (1989)
Immunhistochemische Färbemethoden, 251–260.
In: Romeis B (Hrsg): Mikroskopische Technik. 17. Aufl. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore

Falk RJ, Podack E, Dalmasso AP, Jennette JC (1987)
Localization of S protein and its relationship to the membrane attack complex of complement in renal tissue.
Am J Pathol 127: 182–190

Forbes RDC, Gomersall M, Darden AG, Guttmann R (1991)
Multiple patterns of MHC class II antigen expression on cellular constituents of rat hearts grafts.
Transplantation 51: 942–948.

Gao SZ, Alderman EL, Schroeder JS, Hunt SA, Wiederhold V, Stinson EB (1990)
Progressive coronary luminal narrowing after cardiac transplantation.
Circulation 82 suppl IV: IV-269–IV-275

Gao SZ, Alderman EL, Schroeder JS, Silverman JF, Hunt SA (1988)
Accelerated coronary vascular disease in the heart transplant patient: coronary arteriographic findings.
J Am Coll Cardiol 12: 334–340

Gebb C, Hayman EG, Engvall E, Ruoslahti E (1986)
Interaction of vitronectin with collagen.
J Biol Chem 261: 16698–16703

Guettier C, Hinglais N, Bruneval P, Kazatchkine M, Bariety J, Camilleri J-P (1989)
Immunohistochemical localisation of S protein/vitronectin in human atherosclerotic versus arteriosclerotic arteries.
Virchows Arch A Pathol Anat 414: 309–313

Halvorson MJ, Coligan JE, Sturmhofel K (1996)
The vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) as an example for the role of integrins in T lymphocyte stimulation.
Immunol Res 15: 16–29

Hammes H-P, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT (1996)
Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization.
Nature Med 2: 529–533

Hayward IP, Bridle KR, Campbell GR, Underwood PA, Campbell JH (1995)
Effects of extracellular matrix proteins on vascular smooth muscle cell phenotype.
Cell Biol Intl 19: 839–846

Hetland G, Pettersen HB, Mollnes TE, Johnson E (1989)
S-protein is synthesized by human monocytes and macrophages in vitro.
Scand J Immunol 29: 15–21

Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR (1992)
Cardiac allograft vasculopathy: current concepts, recent developments, and future directions.
J Heart Lung Transplant 11: 9–23

Hosinga M, Alpers CE, Smith LL, Giachelli CM, Schwartz SM (1995)
$\alpha_v\beta_3$ integrin expression in normal and atherosclerotic artery.
Circ Res 77: 1129–1135

Labarrere CA, Pitts D, Nelson DR, Faulk WP (1995)
Vascular tissue plasminogen activator and the development of coronary artery disease in heart-transplant recipients.
N Engl J Med 333: 1111–1116

Lesperance J, Hudon G, White CW, Laurier J, Waters D (1989)
Comparison by quantitative angiographic assessment of coronary stenoses of one view showing the severest narrowing to two orthogonal views.
Am J Cardiol 64: 462–465

Löhr M, Trautmann B, Göttler M, Peters S, Zauner I, Maillet B, Klöppel G (1994)
Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins.
Br J Cancer 69: 144–151

Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, Cousin E, Genton CY, Bachmann F, Kruithof EKO (1993)
Localisation and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries.
Arterioscler Thromb 13: 1090–1100

Mihatsch MJ, Thiel G, Spichtin HP, Oberholzer M, Brunner FP, Harder F, Olivieri V, Bremer R, Ryffel B, Stöcklin E, Torhorst J, Gudat F, Zollinger HU, Loertscher R (1983)
Morphological findings in kidney transplants after treatment with cyclosporine.
Transplant Proc 15: 2821–2835

Mosse PRL, Campbell GR, Campbell JH (1986)
Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. II. Atherosclerosis-free diffuse intimal thickenings compared with the media.
Arteriosclerosis 6: 664–669

Mosse PRL, Campbell GR, Wang ZL, Campbell JH (1985)
Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media.
Lab Invest 53: 556–562

Niculescu F, Rus HG, Poruţiu D, Ghiurca V, Vlaicu R (1989)
Immunoelectron-microscopic localization of S-protein/vitronectin in human atherosclerotic wall.
Atherosclerosis 78: 197–203

Olivari MT, Homans DC, Wilson RF, Kubo SH, Ring WS (1989)
Coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving triple drug immunsuppressive therapy.
Circulation 80: III-111–115

Oni AA, Ray J, Hosenpud JD (1992)
Coronary venous intimal thickening in explanted cardiac allografts.
Transplantation 53: 1247–1251

Pinto FJ, St Goar FG, Gao SZ, Chenzbraun A, Fischell TA, Alderman EL, Schroeder JS, Popp RL (1993)
Immediate and one-year safety of intracoronary ultrasonic imaging. Evaluation with serial quantitative angiography.
Circulation 88: 1709–1714

Pober JS, Contran RS (1990)
The role of endothelial cells in inflammation.
Transplantation 50: 537–544.

Porter KA, Thomson WB, Owen K, Kenyon JR, Mowbray JF, Peart WS (1963)
Obliterative vascular changes in four human kidney homotransplants.
Br Med J II: 639–645

Preissner KT (1991)
Structure and biological role of vitronectin.
Ann Rev Cell Biol 7: 275–310

Preissner KT, Anders E, Grulich-Henn J, Müller-Berghaus G (1988)
Attachment of cultured human endothelial cells is promoted by specific association with S protein (vitronectin) as well as with the ternary S-protein-thrombin-antithrombin III complex.
Blood 71: 1581–1589

Reiber JHC, Serruys PW, Kooijman CJ, Wijns W, Slager CJ, Gerbrands JJ, Schuurbiers JCH, den Boer A, Hugenholtz PG (1985)
Assessment of short-, medium-, and long-term variations in arterial dimensions from computer-assisted quantitation of coronary cineangiograms.
Circulation 71: 280–288

Ross R (1986)
The pathogenesis of atherosclerosis—an update.
N Engl J Med 314: 488–500

Ross R (1993)
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature 362: 801–809

Ruoslahti E, Hayman EG, Pierschbacher MD (1985)
Extracellular matrices and cell adhesion.
Arteriosclerosis 5: 581–594

Russell ME, Fujita M, Masek MA, Rowan RA, Billingham ME (1993)
Cardiac graft vascular disease. Nonselective involvement of large and small vessels.
Transplantation 56: 1599–1601

Sawa H, Sobel BE, Fujii S (1993)
Potentiation by hypercholesterolemia of the induction of aortic intramural synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 by endothelial injury.
Circ Res 73: 671–680

Schroeder JS, Gao SZ, Alderman EL, Hunt SA, Johnstone I, Boothroyd BD, Wiederhold V, Stinson EB (1993)
A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart-transplant recipients.
N Engl J Med 328: 164–170

Schroeder JS, Gao SZ, Hunt SA, Stinson EB (1992)
Accelerated graft coronary artery disease: diagnosis and prevention.
J Heart Lung Transplant 11: S258–S265

Simonton SC, Basara ML, Bardes DW, Furcht LT (1985)
Distribution and immunolocalization of serum-spreading factor in human tissue.
Lab Invest 52: 63A

St Goar FG, Pinto FJ, Alderman EL, Valantine HA, Schroeder JS, Gao SZ, Stinson EB, Popp RL (1992)
Intracoronary ultrasound in cardiac transplant recipients. In vivo evidence of “angiographically silent” intimal thickening.
Circulation 85: 979–987

Starzl TE, Porter KA, Brettschneider L, Penn I, Bell P, Putnam CW, Mcguire RL (1969)
Clinical and pathologic observations after orthotopic transplantation of the human liver.
Surg Gynecol Obstet 128: 327–339

Sturmhofel K, Brando C, Martinon F, Shevach EM, Coligan JE (1995)
Antigen-independent, integrin-mediated T cell activation.
J Immunol 154: 2104–2111

Suzuki S, Pierschbacher MD, Hayman EG, Nguyen K, Öhgren Y, Ruoslahti E (1984)
Domain structure of vitronectin. Alignment of active sites.
J Biol Chem 259: 15307–15314

Tomasini BR, Mosher DF (1991)
Vitronectin.
Prog Hemost Thromb 10: 269–305

Uretsky BF, Murali S, Reddy PS, Rabin B, Lee A, Griffith BP, Hardesty RL, Trento A, Bahnson HT (1987)
Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone.
Circulation 76: 827–834

van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, Heijnen HFG, Connolly TM, de Groot PG, Sixma JJ (1994)
Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries.
J Clin Invest 93: 615–632

7 Lebenslauf

Personalien

Name und Vorname:	Steinbach Michaela, geb. Biesiadowski
Geburtsdatum:	25. April 1967
Geburtsort:	Craiova, Rumänien
Familienstand:	verheiratet
Vater:	Michael Günter Biesiadowski
Mutter:	Nadejda Biesiadowski

Schulischer Werdegang

1973–1981	Gesamtschule Craiova
1981–1985	Gebrüder-Buzeşti-Lyzeum, Craiova
06.07.1985	Abitur

Universitärer Werdegang

WS 1985/86	Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Craiova
WS 1990/91	Fortführung des Studiums der Medizin an der Universität Köln
13.07.1990[1]	Ärztliche Vorprüfung und 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.04.1993	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
16.05.1994	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27.03.1996	Approbation

[1] Anerkennung der an der Med. Hochschule Craiova (Rumänien) abgelegten Prüfungen als Ärztliche Vorprüfung und 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung durch das Landesprüfungsamt für Medizin und Pharmazie, Nordrhein-Westfalen.

8 Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Zimmermann danke ich für den Vorschlag des Themas der Dissertation sowie für die exzellenten Arbeitsbedingungen und die hervorragende materielle Ausstattung, die er mir gewährte.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. med. B. Schäfer vom Institut für Immunologie der Universität Heidelberg, die mich mit wertvollen Hinweisen bei der Planung und Durchführung des Arbeitsprogramms unterstützte.

Weiter gilt mein Dank Herrn Dr. med. K. T. Preissner, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim, der die anti-Vitronektin-Antikörper zur Verfügung stellte.

Herrn Dr. rer. nat. H. Spring danke ich für die Möglichkeit, die immunhistologischen Präparate am Laser-Scan-Mikroskop des Deutschen Krebsforschungszentrums auszuwerten.

Schließlich danke ich Herrn Dr. rer. nat. M. Steinbach für die Durchsicht der Arbeit und für die digitale Bearbeitung der Bilder am Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin.