

Aus der Medizinischen Klinik II – Kardiologie und Pulmologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion im Langzeitverlauf  
der Akuten Myokarditis

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Simon Pronk

aus Alkmaar (NL)

Datum der Promotion: 27.02.2015

# Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen.....	1
2. Abstrakt/Abstract.....	3
3. Einleitung.....	6
3.1 Ätiologie und Pathogenese der Myokarditis.....	6
3.2 Prognose.....	7
3.2.1 Die diastolische Herzinsuffizienz und HFNEF – mögliche Langzeitfolgen einer AMC .....	8
3.3 Diagnostik.....	10
3.3.1 Klinisch-apparative Diagnostik .....	11
3.3.2 Endomyokardbiopsie .....	11
3.3.2.1 Histologische Diagnostik - Die Dallas-Kriterien.....	13
3.3.2.2 Immunhistologie .....	13
3.3.2.3 Molekularbiologischer Virusnachweis .....	14
3.4 Therapie .....	14
4. Zielsetzung der Promotionsarbeit .....	16
5. Methoden .....	17
5.1 Patienten.....	17
5.2 Konventionelle echokardiographische Untersuchung und Tissue Doppler Imaging ...	17
5.3 Diagnostik der HFNEF .....	22
5.3.1 NT-proBNP.....	24
5.4 Detektion von viralen Genomen in EMB durch nPCR und qPCR .....	24
5.5 Immunhistochemische Färbung .....	25
5.6 Statistische Analyse und Erklärung der statistischen Tabellen .....	26
6. Ergebnisse.....	27
6.1 Demographische und klinische Daten .....	27
6.2 Herzinsuffizienzsymptomatik - NYHA-Klassifikation .....	31
6.3 Zahl der Krankenhausaufnahmen .....	32
6.4 Herzgröße.....	32
6.5 Systolische Funktion des linken Ventrikels.....	32
6.6 Diastolische Funktion des linken Ventrikels .....	33
6.7 NT-proBNP bei der Verlaufsuntersuchung .....	35

6.8 Der Nachweis von viralen Genomen und die immunhistologische Färbung der EMBs bei der Erstpräsentation .....	35
7. Diskussion.....	37
8. Literaturverzeichnis .....	45
9. Anhang.....	56
9.1 Eidesstattliche Versicherung.....	56
9.2 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....	57
9.3 Lebenslauf.....	58
9.4 Publikationsliste.....	58
9.5 Danksagung .....	61

## 1. Abkürzungen

A – Flussgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der atrialen Füllung

AMC – Akute Myokarditis

AMI – Akuter Myokardinfarkt

ANP – Atrial natriuretic peptid

B19V – Parvovirus B19

BNP – Brain natriuretic peptid

CAM – Cell adhesion molecules

CK – Kreatinkinase

DCM – Dilatative Kardiomyopathie

DT – Dezelerationszeit

E - Flussgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der schnellen Füllung

EBV – Epstein-Barr-Virus

ECM – Extrazellulärmatix

EKG - Elektrokardiogramm

EMB – Endomyokardbiopsie

ESC – European Society of Cardiology

EV – Enterovirus

HHV6 – Humanes Herpesvirus 6

HFNEF – Heart failure with normal ejection fraction

HFREF – Heart failure with reduced ejection fraction

InfCM – Inflammatorische Kardiomyopathie

IVRT – Isovolumic relaxation time

LA – Linksatrial

LV – Linksventrikulär

LVEF – Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

LVEDD – Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser

LVESD – Linksventrikulärer Endsystolischer Durchmesser

NT-pro-BNP – N-terminal-proB-typ natriuretisches Peptid

NYHA – New York Heart Association

PCR – Polymerase Kettenreaktion

RAAS – Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

SLE – Systemischer Lupus erythematodes

## TDI – Tissue Doppler Imaging

## 2. Abstrakt/Abstract

### Abstrakt

#### Einleitung

Die akute Myokarditis (AMC) ist eine schwere Erkrankung, die in Europa hauptsächlich durch kardiotope Viren verursacht wird.<sup>1, 2</sup> In der Literatur wird eine fortschreitende Erkrankung mit dem klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) bei ungefähr 20% der Patienten beschrieben. Die betroffenen Patienten haben ein erhöhtes Risiko, früh einen kardialen Tod zu erleiden oder herztransplantiert zu werden.<sup>3-5</sup>

Neben den bereits sehr häufig durchgeführten Studien nach der Progression zu einer DCM wird in dieser Arbeit zusätzlich genauer die systolische und die diastolische Funktion des Herzens im Verlauf untersucht. Insbesondere besteht Interesse für die mögliche Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion nach einer AMC.

#### Methodik

In diese retrospektive Studie wurden 50 Patienten eingeschlossen (37 Männer, 13 Frauen), die vom Januar 1995 bis zum November 2004 in unsere Klinik aufgenommen wurden - bei allen wurde eine Endomyokardbiopsie (EMB) durchgeführt. Alle Patienten in der Kohorte wurden aufgenommen mit Brustschmerz, ST-Hebungen und/oder erhöhten herzspezifischen Laborparametern. Die durchschnittliche Zeit bis zur Nachuntersuchung betrug 72 Monate (Spannweite 58-78 Monate). Es wurden klinische Untersuchungen, konventionelle Herzechos und Tissue Doppler Untersuchungen durchgeführt. Retrospektiv wurden Herzkatheteruntersuchungen als auch Endomyokardbiopsien aller in die Studie eingeschlossenen Patienten ausgewertet.

#### Ergebnisse

4% (2/50) sind verstorben, 6% (3/50) entwickelten eine DCM, 90% (45/50) zeigten eine normalisierte oder verbesserte LV Funktion im Verlauf. Im Verlauf zeigten 49% (22/45) eine Herzinsuffizienzsymptomatik bei einer normalen LVEF (HFNEF- nach den gültigen diagnostischen Kriterien). Dabei zeigte sich bei diesen Patienten ein umgekehrtes E/A Verhältnis, eine Verlangsamung der frühen mitralen Flussgeschwindigkeit und der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT), und ein pathologischer Anstieg des LV Füllung Indexes  $E/E'$ , im Vergleich zu Patienten ohne Herzinsuffizienzsymptomatik ( $E/E'_{\text{septal}}$  10.9 (9.3–13.8) vs 6.8 (6.4–9.1);  $p=0.001$ ). Plasma N-terminal proB-type natriuretic peptid Werte waren

dreifach erhöht bei Patienten mit einer HFNEF (19.9 (10.6–24.1) vs 7.3 (4.2–11.9) pmol/l; p=0.006).

Das Patientenkollektiv zeigt ebenfalls, dass HFNEF assoziiert ist mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität.

### Schlussfolgerung

Hiermit wird erstmals bewiesen, dass ungefähr 50% der Patienten Jahre nach einer AMC immer noch an einer Herzinsuffizienzsymptomatik aufgrund einer diastolischen Dysfunktion leiden. Das wesentliche Ergebnis unserer Studie ist, dass eine erlittene AMC der Auslöser für die Entwicklung einer HFNEF sein kann, und dass dies unabhängig ist von den klassischen Risikofaktoren für diese Erkrankung.

Angesichts der Tatsache, dass Patienten mit einer HFNEF hinsichtlich Mortalität und Morbidität eine ähnliche Prognose haben wie Patienten mit einer Herzinsuffizienz aufgrund einer reduzierten LVEF, ist die Bedeutung dieser Erkenntnis groß.

## **Abstract**

### Background

Acute myocarditis (AMC) is a severe illness caused in Europe mostly by cardiotropic viruses.<sup>1,2</sup> A progression to a clinical appearance of a dilated cardiomyopathy (DCM) is described in approximately 20% of the cases. These patients have an increased risk of an early cardiac death, which might necessitate a heart transplantation.<sup>3-5</sup>

As a follow-up to the numerous studies regarding the progression of an AMC to a DCM, this study takes a more detailed look at the diastolic and systolic function of the heart. In particular the possible evolution of a diastolic dysfunction after AMC is a major point of interest.

### Methods

This retrospective study includes 50 patients (37 men, 13 women), who were hospitalized in the period between January 1995 and November 2004. Endomyocarbiopsies (EMBs) were performed on all patients. All patients were initially seen with chest pain, ST-elevation and/or increased heart-specific laboratory parameters. Their clinical condition was examined during a mean follow-up period of 72 (58–78) months, including conventional echocardiography and tissue Doppler imaging (TDI). Retrospectively, the intracardiac catheterisations and EMBs of all patients were evaluated.

## Results

4% (2/50) died, and 6% (3/50) developed dilated cardiomyopathy. 45/50 (90%) showed a normal or improved LV function over time. In the course of the follow-up, 49% (22/45) suffered from heart failure symptoms despite a normal ejection fraction (HFNEF- according to the valid diagnostic criteria). This was associated with an abnormal E/A ratio, an impaired deceleration time of early mitral flow velocity and isovolumic relaxation time, and a pathological increase in the LV filling index E/E', in contrast with patients without heart failure symptoms (E/E'<sub>septal</sub> 10.9 (9.3–13.8) vs 6.8 (6.4–9.1); p=0.001). Plasma N-terminal proB-type natriuretic peptide levels were increased threefold in patients with HFNEF (19.9 (10.6–24.1) vs 7.3 (4.2–11.9) pmol/l; p=0.006).

An increased morbidity and mortality was also shown for patients with HFNEF.

## Conclusion

The findings show for the first time that years after having an AMC, 50% of the patients still suffer from symptoms of heart failure caused by a diastolic dysfunction. The essential outcome is that - independent of classical risk factors of developing a HFNEF - an AMC can be the reason for the development of HFNEF.

Given the fact that patients with HFNEF have a similarly high mortality and morbidity rate as patients with heart failure because of a reduced LVEF the outcome is vitally important.

### **3. Einleitung**

Die akute Myokarditis (AMC) ist eine entzündliche Herzmuskelerkrankung, die durch kardiotope Viren verursacht wird.<sup>1, 2</sup> Der klinische Verlauf und die klinische Präsentation sind sehr variabel. Aktuell gibt es keine klinischen Kriterien, die verlässlich vorhersagen können, welche Patienten mit einer AMC wieder genesen. Im natürlichen Verlauf einer AMC entwickeln ungefähr 20% der Patienten eine chronisch fortschreitende Erkrankung mit einer fortschreitenden Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion, entsprechend dem klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Dies wird häufig in Verbindung gebracht mit einer chronischen Entzündung und einer nicht adäquaten Immunreaktion nach einer AMC. Die betroffenen Patienten haben ein erhöhtes Risiko, früh einen kardialen Tod zu erleiden oder herztransplantiert zu werden.<sup>3-5</sup>

Der Großteil der Patienten jedoch entwickelt im Laufe der Zeit keine signifikante linksventrikuläre Dilatation und auch keine schwerwiegende Verschlechterung der linksventrikulären Auswurfraction (LVEF). Im Allgemeinen werden 80 % der Patienten nach einer Krankenhausaufnahme aufgrund einer AMC mit einer normalen Herzfunktion entlassen und gelten als geheilt. Medizinische Behandlungen und Untersuchungen werden meist einige Monate später eingestellt. Die Frage, ob die Patienten sich im Laufe der Zeit vollständig erholen oder ob sich Folgen der Erkrankung nach Jahren doch noch offenbaren, wurde noch nicht untersucht. Es fehlen also definitive Daten bezüglich der klinischen Langzeitprognose. Aus diesem Grund haben wir die Langzeitergebnisse untersucht von Patienten, die eine AMC gehabt haben. Hierzu wurden die Patienten klinisch untersucht, Herzechos und Herzkatheteruntersuchungen durchgeführt sowie Endomyokardbiopsien in einer größeren Kohorte entnommen.

#### **3.1 Ätiologie und Pathogenese der Myokarditis**

Myokarditis ist eine Entzündung des Herzmuskels,<sup>5-8</sup> die hauptsächlich Patienten im mittleren Lebensalter trifft und im Alter bis zu 40 Jahren die häufigste Ursache des plötzlichen, unerwarteten Herztodes ist.<sup>9</sup> Eine Myokarditis zeigt sehr unterschiedliche klinische Verläufe. Sie kann als eine klinisch fast oder ganz symptomfreie, scheinbar unbedeutende Begleiterscheinung einer stattfindenden oder stattgefundenen systemischen Infektionskrankheit auftreten, die dann auch meist wieder innerhalb von Wochen bis Monaten abheilt.<sup>10</sup> Das einzige, was davon zurückbleibt, kann dann eine geringe Narbenbildung im Myokard sein.

Die akute Myokarditis lässt sich von anderen Myokarditiden unterscheiden durch ihr plötzliches und den Patienten schwer beeinflussendes Auftreten. Sie präsentiert sich herzinfirmähnlich mit den dazugehörigen typischen Symptomen sowie CK- und Troponinerhöhungen.<sup>11-13</sup>

Nach einer klinisch unauffälligen Latenzperiode kann sich bei einem Teil dieser Patienten allerdings eine chronische Herzinsuffizienz entwickeln, die dann als eine inflammatorische dilatative Kardiomyopathie gilt. Zugleich kann eine Myokarditis aber auch die Ursache sein für lebensgefährliche Herzrhythmusstörungen und eine sich innerhalb von wenigen Tagen entwickelnde schwere Herzinsuffizienz mit einer hohen Mortalität.

Als Ursache für die Myokarditis spielt in Europa hauptsächlich die Infektion mit kardiotropen Viren eine Rolle. Außerdem, in Europa jedoch untergeordnet, wird die Infektion auch durch Bakterien (im Rahmen einer Sepsis, Tuberkulose, Lyme-Borreliose, Yersiniose) oder durch Protozoen, Pilze und Parasiten verursacht.

Neben diesen infektiösen Ursachen findet man ein weites Feld an Erkrankungen, die zu einer Myokarditis führen können, worunter immunologische (Allergene, Alloantigene, Autoantigene), toxische (Drogen, Schwermetalle, Bestrahlung), systemische (Sarkoidose, SLE, Sklerodermie), rheumatische (als Teil einer Pankarditis bei Rheumatischem Fieber) und idiopathische.

Seit der Einführung des molekularbiologischen Virusnachweises werden folgende Viren zu den epidemiologisch relevanten kardiotropen Viren gezählt: Enteroviren, Adenoviren, Parvovirus B19, Humanes Herpes-Virus 6, Epstein-Barr-Virus und im ostasiatischen Raum das Hepatitis C Virus.<sup>1, 14-19</sup>

Die initiale Entzündungsreaktion im Myokard dient im Falle eines Virusbefalles des Myokards der Viruselimination und ist gewollt. In einigen Fällen persistiert diese Entzündungsreaktion jedoch über Monate bis hin zu Jahren und Jahrzehnten. Dies führt über das „remodelling“ der extrazellulären Matrix<sup>20</sup> letztendlich zu einer DCM.

### **3.2 Prognose**

Für eine akute Myokarditis wird eine 10-Jahres-Mortalitätsrate von 20-56% angegeben.<sup>21, 22</sup> Patienten, die initial eine fulminante lymphozytäre Myokarditis mit einer sich innerhalb von Stunden bis Tagen entwickelnden Lungenstauung und Kardiomegalie bei deutlicher Einschränkung der LVEF zeigen, haben eine signifikant bessere Prognose als Myokarditis-Patienten ohne derartige hämodynamische Kompromittierungen.<sup>22</sup> Diesem Patientenkollektiv wird eine sehr gute Langzeitprognose mit einer 10-Jahres-Mortalität von weniger als 10% nachgewiesen.<sup>22, 23</sup> Bei erwachsenen Patienten scheint ein fulminanter Verlauf also vorteilhaft

für die Langzeitprognose. Bei Kindern mit einer fulminanten Myocarditis liegen die Sterberaten im frühen Stadium bei über 75%, dies aufgrund von Multiorganversagen.<sup>24-26</sup>

Die Langzeitprognose der akuten Myokarditis hängt maßgeblich davon ab, ob man eine DCM entwickelt. Vor 44 Jahren wurde vermutlich zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen einer akuten Myokarditis und der dilatativen Kardiomyopathie gesehen.<sup>27</sup> Seitdem wurde dieser Zusammenhang in vielen klinischen und experimentellen Studien immer deutlicher und besser erforscht. Beispielsweise wurde an Mäusen, die mit einem Enzephalomyokarditis-Virus infiziert wurden gezeigt, dass sich aus einer Myokarditis eine DCM entwickeln kann.<sup>28, 29</sup> Auch zeigen immunhistologische und virale Untersuchungen von DCM-Hezen, dass bis zu 67% eine Entzündung viraler Genese haben. Die Studien, die es bis heute zur Langzeit-Prognose der akuten Myokarditis gibt, zeigen deutlich, dass sich aus einer AMC eine DCM entwickeln kann. Sie geben allerdings keine einheitlichen Zahlen bezüglich des Anteils an Patienten, die eine DCM entwickeln.

In einem Review von D´Ambrosio et al<sup>3</sup> aus dem Jahre 2001 werden 26 Studien, die sich mit diesem Thema befasst haben, miteinander verglichen. D´Ambrosio et al<sup>3</sup> beschreiben in ihrer Metaanalyse, dass nach 33 Monaten 21% der AMC-Patienten eine DCM entwickeln. Diese Zahl ist aufgrund der diagnostischen Methoden in einigen der eingeschlossenen Studien umstritten.

In Anbetracht der relativ hohen Zahl von Patienten, die Jahre nach einer AMC eine Herzinsuffizienz haben, stellt sich die Frage, ob die Ätiologie vollkommen erforscht ist. Dass sich in vielen Fällen eine DCM entwickelt, ist eindeutig geklärt. In der gesamten Literatur werden neben der DCM und den Herzrhythmusstörungen keine weiteren möglichen Ursachen für die Herzinsuffizienz nach einer AMC angegeben.

Der Verlauf und die Entwicklung von möglichen Zwischenstufen in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist jedoch noch nicht untersucht worden. Gerade die Frage nach dem Verlauf von geringer linksventrikulärer Einschränkung zu einer linksventrikulären Dilatation ist denkbar, aber bisher noch nicht beschrieben.

Ob eine systolische oder eher eine diastolische Herzinsuffizienz oder die HFNEF (Heart Failure with Normal Ejection Fraction) als Langzeitfolge einer AMC für die Herzinsuffizienzsymptomatik verantwortlich ist, wurde bisher noch nicht eindeutig beschrieben.

### **3.2.1 Die diastolische Herzinsuffizienz und HFNEF – mögliche Langzeitfolgen einer AMC**

Pathophysiologische Veränderungen der diastolischen Herzinsuffizienz können sich in allen 4 Phasen der Diastole manifestieren. Eine Störung der aktiven Relaxation als auch ein

mechanischer Widerstand gegenüber Dehnung und Füllung können Ursachen einer gestörten diastolischen Funktion sein.

Auch biochemische und molekulare Veränderungen auf der Ebene der Kardiomyozyten können zu erheblichen Störungen der aktiven Relaxation führen. Diese Veränderungen können sich akut ereignen (z.B. durch einen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg oder Abfall energiereicher Phosphate bei Ischämie und Hypoxie) oder langfristig durch eine Änderung der Expression und Funktion myofibrillärer und  $\text{Ca}^{2+}$ -transportierender Proteine (Phänotypkonversion) auftreten.<sup>30</sup>

„Heart Failure with Normal Ejection Fraction“ ist die Bezeichnung für eine Herzinsuffizienzsymptomatik, die sich manifestiert ohne eine eingeschränkte LVEF zu zeigen. Die klinischen Symptome einer Herzinsuffizienz können auch durch nichtkardiale Erkrankungen wie Lungenerkrankungen, Anämie, Hyperthyreodismus und durch fehlende physische Ausdauer hervorgerufen werden. All diese Ursachen und auch kardiale Erkrankungen wie Herzklappenerkrankungen, Kardiomyopathien und Ischaemien müssen ausgeschlossen werden, bevor man die Diagnose einer HFNEF stellen kann.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass etwa 50% aller herzinsuffizienten Patienten eine normale LVEF haben (HFNEF).<sup>31</sup> Die bisher bekannten Ursachen oder Risikofaktoren einer HFNEF sind die arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, Obesitas, Alter und das weibliche Geschlecht. Patienten mit einer HFNEF haben hinsichtlich Mortalität und Morbidität eine ähnliche Prognose wie Patienten mit einer Herzinsuffizienz aufgrund einer reduzierten LVEF.

Pathophysiologisch spielen Veränderungen in der Struktur des Herzmuskels wie z.B. eine Fibrose aufgrund von Veränderungen der extrazellulären Matrix und eine kardiale Hypertrophie eine wichtige Rolle.

Es werden zwei mögliche Ursachen der HFNEF diskutiert. Die HFNEF mit linksventrikulärer diastolischer Dysfunktion und die HFNEF ohne linksventrikuläre diastolische Dysfunktion.<sup>32</sup>

Die linksventrikuläre diastolische Dysfunktion entsteht z.B. durch eine erlittene Myokarditis<sup>33</sup>, eine LV Hypertrophie, eine Anhäufung der ECM (Fibrose), eine Ischaemie (z.B. Mikroangiopathie, endotheliale Dysfunktion), eine linksatriale Dysfunktion (durch die LV Hypertrophie folgt eine LA Hypertrophie und Dysfunktion) oder durch intrazelluläre Veränderungen in den Myozyten (Veränderungen der Titin-Isoformen führen zu einer Veränderung der federartigen frühen diastolischen Füllung, der Calciumhaushalt beeinträchtigt die Relaxation des LV).

Dies alles resultiert in der „ventricular stiffness“, beeinträchtigt die linksventrikuläre Füllung, führt zu einer Vergrößerung des linken Atriums und führt so zur diastolischen Dysfunktion.

Das Auftreten der HFNEF ohne linksventrikuläre diastolische Dysfunktion ist hauptsächlich in Verbindung mit Diabetes mellitus, Obesitas oder dem Alter zu bringen. Dazu gehören eine schlecht regulierte „ventricular-vascular-coupling“, eine diastolische und systolische Dyssynchronie (z.B. aufgrund von Perikarderkrankungen oder pulmonaler Hypertension) und eine chronotrope Inkompetenz.

Im Gegensatz zur HFREF konnte die Prognose der HFNEF trotz gleicher medikamentöser Therapie mit ACE-Hemmern, AT-II-Rezeptorblockern und Beta-Blockern nicht verbessert werden.<sup>34</sup> Aus diesem Grund sind neue Therapieansätze notwendig, welche die pathophysiologische Entwicklung der HFNEF, insbesondere die Herzmuskelhypertrophie und ihre Genese besser berücksichtigen.

### **3.3 Diagnostik**

Die Diagnose einer Myokarditis gestaltet sich mitunter schwierig. Bei der Myokarditis treten die Symptome in sehr unterschiedlicher Form und Ausprägung auf. Das Spektrum reicht von grippeähnlichen Symptomen mit leichten Palpitationen bis hin zum kardialen Notfall mit lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen und möglichem Herzversagen.

Da die Patienten relativ jung und gesund sind, werden etwaige Warnsymptome leicht auf eine Grippe bezogen und nicht weiter beachtet.

Den klinischen Verdacht einer Myokarditis hat man bei Patienten, die sich mit Herzrhythmusstörungen, Zeichen der Herzinsuffizienz und Kurzatmigkeit oder mit einer herzinfarktähnlichen Symptomatik präsentieren. Anamnestisch wird von einer in letzter Zeit erlittenen Virusinfektion oder einer akut auftretenden oder persistierenden allgemeinen Symptomatik wie körperlicher Abgeschlagenheit und Schwäche, Müdigkeit und Leistungseinschränkung berichtet.

Um die Diagnose zu stellen, muss man zunächst das EKG auswerten, Laborwerte (CRP, Leukozyten, BSG, Troponin, CK, CK-MB, GOT, HBDH) überprüfen und eine Herzechuntersuchung machen. Bei erhöhten Herzenzymen muss zum Ausschluss einer KHK eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt werden. Wird hierbei eine KHK ausgeschlossen, besteht die Verdachtsdiagnose einer AMC und ist eine Herzmuskelbiopsie indiziert.

### **3.3.1 Klinisch-apparative Diagnostik**

Ein EKG eines Myokarditis-Patienten kann alle Typen der Arrhythmien, der Blockierungen und Erregungsausbreitungsstörungen zeigen.

Bei einer akuten Myokarditis sind oft EKG Veränderungen wie z.B. monophasische ST-Streckenhebungen, wie man sie sonst typischerweise bei einem Myokardinfarkt sieht, zu sehen.<sup>12</sup>

Als Ausdruck einer schon länger bestehenden Myokarditis kann man in einigen Fällen Q-Zacken und eine fehlende R-Progression über den Brustwandableitungen sehen. Dies sind Zeichen von interstitiellen Fibrosierungen, Hypertrophien und Myokardnarben, möglicherweise als Folge einer Myokarditis.<sup>35, 36</sup>

Mit der transthorakalen Echokardiographie können Bewegungsstörungen des Herzmuskels beurteilt und feste Parameter der Herzfunktion bestimmt werden. So werden LVEF, E, A, E/A, IVRT, DT, linksventrikulärer Diameter und Herzwanddicken bestimmt. Ein im Rahmen der Entzündung vorhandener Perikarderguss kann beschrieben werden. Mögliche intrakavitäre Thromben, die bei stark eingeschränkter linksventrikulärer Funktion auftreten können, können nachgewiesen werden. Bei akuten Entzündungen können ödematöse Auflockerungen der Myokardstruktur sichtbar sein.

In erster Linie dient die Echokardiographie dem Ausschluss anderer Ursachen der Herzinsuffizienz.

Für die Verlaufsbeobachtung ist die Echokardiographie unverzichtbar. Die Symptomarmut bei einem Teil der DCM Patienten und gleichzeitig die hohe Zahl an DCM Patienten mit einer Myokarditis in der Vorgeschichte zeigt, wie wichtig es ist, Patienten nach einer Myokarditis jährlich kardiologisch mittels Echokardiographie zu untersuchen.

Die echokardiographische Untersuchung ist das wichtigste nicht-invasive Verfahren zur Verlaufsbeobachtung bei der Myokarditis als auch bei der DCM.

Neben der linksventrikulären systolischen Funktion, dem linksventrikulären Diameter und der Kontraktilität, ist auch die diastolische Funktion ein prognostisch wichtiger Parameter.<sup>37</sup>

### **3.3.2 Endomyokardbiopsie**

In den 60'er Jahren wurde die Technik zur Entnahme von Endomyokardbiopsien entwickelt.<sup>41</sup>

Mit Biopomen können Endomyokardbiopsien (EMBs) vom linken und vom rechten Ventrikel, von dem interventrikulären und dem atrialen Septum entnommen werden.

Bei einer akuten Myokarditis mit herzinfarktähnlicher Symptomatik mit positivem Troponin, sollte sofort mittels einer Koronarangiografie eine koronare Herzerkrankung ausgeschlossen werden. In derselben Sitzung kann man dann auch eine EMB durchführen.

Eine Herzmuskelbiopsie ist auch indiziert, wenn bei Ausschluss anderer Ursachen eine unklare kardiale Beschwerdesymptomatik und eine persistierende bzw. progrediente Störung der Myokardfunktion besteht.<sup>42, 43</sup>

Eine multidisziplinäre Expertengruppe auf dem Gebiet der Kardiomyopathien und Kardiovaskulären Pathologie hat unter Cooper et al<sup>43</sup> in einer Übersichtsarbeit zur Myokardbiopsie Empfehlungen herausgegeben, unter welchen klinischen Indikationen eine Biopsie indiziert ist. Diese wurden von den Gremien der “American Heart Association”, der “American College of Cardiology” und der “European Society of Cardiology” zur Publikation freigegeben, und werden von der “Heart Failure Society of America” und der “Heart Failure Association of the European Society of Cardiology“ als offizielle Empfehlung zur Endomyokardbiopsie herausgegeben. In dem Paper „The role of endomyocardial biopsy in cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.“<sup>43</sup> von Cooper et al werden die Empfehlungen in „Table 2“ übersichtlich dargestellt.

### 3.3.2.1 Histologische Diagnostik - Die Dallas-Kriterien

Die Dallas-Kriterien wurden von einer Expertengruppe von kardiovaskulären Pathologen im Jahre 1987 in Dallas veröffentlicht.<sup>44</sup>

Heute weiß man jedoch, dass die Dallas-Kriterien bei weitem nicht die nötige Sensitivität und Spezifität haben um als einziges diagnostisches Mittel genutzt zu werden.

Veröffentlichungen verschiedener unabhängiger Gruppen zeigen eine sehr hohe Variabilität der Prävalenz von 0% bis 63%.<sup>45</sup>

Zwei Punkte, nämlich der „sampling error“ und die „interobserver variability“ sind für diese hohe Variabilität verantwortlich, und machen aus den Dallas-Kriterien bei EMBs ein diagnostisches Mittel mit einer sehr geringen Spezifität.

### 3.3.2.2 Immunhistologie

Die Immunhistologie hat eine wesentlich größere Sensitivität und Spezifität als die Histologie. Mit ihr ist es möglich, gering ausgeprägte Zellinfiltrate hochempfindlich zu erfassen. So können Leukozyten, Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen und viele andere Zellen sehr exakt erfasst werden. Dies geschieht durch den Einsatz von hochspezifischen monoklonalen Antikörpern, die außer diesen Zellen auch Schritte der Immunantwort, wie beispielsweise die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, anzeigen können.<sup>46-48</sup>

Als wichtigste Kennzeichen einer myokardialen Entzündung in der immunhistologischen Diagnostik haben sich die verstärkte Expression der CAMs („cell adhesion molecules“), z.B.: HLA, ICAM-1, VCAM-1, und die Quantifizierung der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten gezeigt. Dies zeigt sich nach den Resultaten von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen, die unter Einsatz von monoklonalen Antikörpern, gerichtet gegen diverse immunkompetente Oberflächenantigene, bei bis zu 67 % der untersuchten Proben von DCM oder Myokarditis-Patienten intramyokardiale Entzündungen diagnostizierten.<sup>49-57</sup>

Da die vermehrte CAM-Expression gleichmäßig verteilt im gesamten Herzen stattfindet und die T-Lymphozyten oft nur fokal bei einer Entzündung vermehrt nachweisbar sind, hat die CAM-Expression die wichtige Rolle, den „sampling error“ zu reduzieren und damit die Spezifität zu steigern.

In einer vergleichenden Analyse wurden bei EMBs von 299 DCM-Patienten mittels histologischer Diagnostik nach den Dallas-Kriterien sowie auch mittels Immunhistologie nach einer InfCM gesucht. Die Immunhistologie konnte bei 43% der Patienten eine Myokarditis

nachweisen, wohingegen dies mittels Histologie nach den Dallas-Kriterien nur bei 5,6% der Fall war.<sup>58</sup> Studien zur immunsuppressiven Therapie belegen, dass die Immunhistologie diagnostisch und prognostisch der Histologie überlegen ist.<sup>5, 59, 60</sup> Dies wird dadurch deutlich, dass vor allem Patienten mit einer immunhistologisch gesicherten InfCM von der Immunsuppression hinsichtlich der LVEF und NYHA profitieren.

### **3.3.2.3 Molekularbiologischer Virusnachweis**

Ende der 80'er, Anfang der 90'er Jahre konnten in mehreren Studien erstmals Viren in endomyokardialen Biopsien aus Herzen mit Myokarditis oder DCM nachgewiesen werden. So konnte die schon seit langem bestehende Theorie der viralen Pathogenese durch den Einsatz der Polymerase Kettenreaktion (PCR) bestätigt werden. Die ersten Viren, die gefunden wurden, waren Entero- und Coxsackieviren.<sup>61</sup> Außerdem wurden Adenoviren gefunden. Der Kardiotropismus dieser physiologisch nicht verwandten Viren wird durch die Expression des physiologisch nur in der Kindheit existierenden Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors begründet.<sup>5, 62</sup> Heute ist bekannt, dass diese Viren nur einen kleinen Teil der kardiotropen Viren ausmachen. Die epidemiologisch relevanten Viren sind: Enteroviren, Adenoviren, Parvovirus B19, Humanes Herpes-Virus 6, Epstein-Barr-Virus und im ostasiatischen Raum das Hepatitis C Virus.<sup>1, 14-19</sup>

## **3.4 Therapie**

Die Therapie einer AMC verlangt eine enge kardiologische Betreuung. In einigen Fällen ist die Betreuung auf einer kardiologischen Intensivstation notwendig.

Die Therapie richtet sich initial hauptsächlich auf die symptomatische Behandlung der Herzinsuffizienz. Als kausale Therapieansätze sind eine antivirale oder eine immunmodulierende Therapie vielversprechend.

Mehrere Studien zeigen mittlerweile sehr gute Resultate bei einer antiviralen Therapie mit Interferon, einem potenten antiviralen Zytokin<sup>63</sup>, an Patienten mit einer Viruspersistenz bei einer InfCM. In einer Phase-2-Studie wurden 22 InfCM-Patienten mit Enterovirus (n=14) oder Adenovirus-Persistenz (n=8) mit Interferon-beta über 6 Monate behandelt. Die Patienten haben sehr profitiert von dieser Therapie. Eine komplette Viruselimination, eine Verbesserung der Symptomatik, ein Anstieg der LVEF und eine Abnahme des linksventrikulären Durchmessers waren nach 12 Monaten das Ergebnis. Ferner wurde eine Reduzierung der für den Nachweis einer Entzündung geeigneten intramyokardialen CAM-Expression gezeigt. Die Therapie wird

nebenwirkungsarm toleriert. Die bisherigen Studien umfassen nur kleine Studienpopulationen mit einer möglicherweise geringen Aussagekraft. Aus diesem Grund wird viel von der seit vielen Jahren laufenden multizentrischen BICC-Studie ( $\beta$ -Interferon in Patients with chronic viral cardiomyopathy) erwartet.

Zeigt die Endomyokardbiopsie immunhistologisch eine inflammatorische Kardiomyopathie ohne Viruspersistenz, ist eine immunsuppressive Therapie sinnvoll. Bei 64% eines Patientenkollektivs mit immunhistologisch gesicherter inflammatorischer Kardiomyopathie und bei Ausschluss einer Viruspersistenz zeigte sich eine solche Therapie als sehr effektiv. Nach 6-monatiger immunsuppressiver Therapie hatte diese Gruppe eine signifikant bessere LVEF, eine bessere Herzinsuffizienzsymptomatik und es wurde eine signifikante Abnahme der CAM-Expression nachgewiesen.<sup>64</sup> In einer Placebo-kontrollierten Studie von Wojnicz et al. wurde bei einem ähnlichen Patientenkollektiv 3 Monate immunsuppressiv mit Kortikosteroiden und Azathioprin behandelt. Zwei Jahre später hatte die Gruppe immer noch eine Verbesserung der LVEF, der linksventrikulären Dilatation und der Symptomatik.<sup>57</sup>

In einer retrospektiven Analyse zeigte sich deutlich, dass die Patienten die keinen Nutzen oder sogar eine Verschlechterung durch eine Immunsuppressionstherapie erfahren haben, eine Viruspersistenz aufwiesen.<sup>65</sup>

Das Paper von Cooper et al.<sup>43</sup> zeigt 14 Szenarien mit der Indikation zur EMB mit unterschiedlichen Evidenzlagen. Eine EMB kann zur richtigen Behandlung einer entzündlichen Herzmuskelerkrankung essentiell sein. Eine Riesenzellmyokarditis erfordert beispielsweise eine Immunsuppression und viruspositive Patienten können gegebenenfalls immunmodulatorisch mit Interferon behandelt werden. Nur durch eine EMB kann über die spezifische Therapie entschieden werden. Die Herzinsuffizienztherapie richtet sich nach der von der WHO empfohlenen Vorgehensweise.

#### **4. Zielsetzung der Promotionsarbeit**

Diese Arbeit untersucht die Langzeit-Prognose von Patienten nach einer akuten Myokarditis. Neben den bereits sehr häufig durchgeführten Studien nach der Progression zu einer DCM wird in dieser Arbeit zusätzlich genauer die systolische und die diastolische Funktion des Herzens im Verlauf untersucht. Die Zahl von Patienten mit einer Herzinsuffizienzsymptomatik scheint deutlich höher zu sein als die der Patienten, die eine DCM entwickeln. Deshalb gilt es herauszufinden, welche weiteren Ursachen möglicherweise neben der DCM noch für die Herzinsuffizienzsymptomatik vieler Patienten nach einer AMC verantwortlich sein könnten. Insbesondere besteht Interesse für die mögliche Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion nach einer AMC.

Folgende Fragestellungen sollen dabei genauer untersucht werden:

1. Wie viele Patienten entwickeln nach einer AMC eine Herzinsuffizienzsymptomatik und in welchem Ausmaß ist die diastolische Dysfunktion dafür verantwortlich?
2. Kann mit der konventionellen Echokardiographie die Ursache der Herzinsuffizienz gefunden werden, oder ist zur Diagnose das „Tissue Doppler Imaging“ erforderlich?
3. Gibt es prognostische Faktoren für eine mögliche Entwicklung einer HFNEF?
4. Gibt es einen statistischen Zusammenhang zwischen der Myokardinfektion durch bestimmte Viren und der HFNEF-Entwicklung?
5. Ist ein Zusammenhang der medikamentösen Therapie post AMC mit der weiteren Prognose ersichtlich?

## **5. Methoden**

### **5.1 Patienten**

In diese retrospektive Studie wurden 50 Patienten eingeschlossen (37 Männer, 13 Frauen), die vom Januar 1995 bis zum November 2004 in unsere Klinik aufgenommen wurden. Aus unserem klinikinternen Archiv wurden zunächst 65 Klinikaufnahmen mit der offiziellen Diagnose einer AMC herausgesucht. 50 dieser 65 Fälle konnten nach ausführlicher Prüfung und Erfüllung aller für diese Studie gesetzten Diagnosekriterien einer AMC – wie im nächsten Absatz beschrieben – in die Studie aufgenommen werden.

Im Einzelnen wurde die vorläufige klinische Verdachtsdiagnose einer AMC gestellt bei Patienten, die sich vorstellig machten mit einem abrupten Auftreten von Beschwerden wie Angina Pectoris oder Dyspnoe, sowie mit jeglicher infarktverdächtiger Präsentation mit erhöhten Serum-Markern eines myokardialen Schadens (Troponin T und Kreatinkinase/Kreatinkinase-MB) und/oder mit neu aufgetretenen EKG-Veränderungen (ST-Anhebung oder T-Negativierungen).

Die demographischen und klinischen Eigenschaften der Patienten bei Aufnahme sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bei allen Patienten wurde zur Beurteilung des koronaren Gefäßstatus eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt. Nach angiographischem Ausschluss einer Herzkranzgefäßerkrankung und anderen möglichen Ursachen einer linksventrikulären Dysfunktion (z.B. schwere arterielle Hypertonie, Herzklappenerkrankungen, metabolische und endokrine Erkrankungen) wurden durch Zugang über die Femoralvene<sup>33, 66, 67</sup> EMBs vom rechtsventrikulären Septum mit flexiblen Biotomen (Westmed, Germany) entnommen. Alle 50 Patienten wurden eingeladen, an einer ambulanten Verlaufsuntersuchung in unserer Ambulanz teilzunehmen. Die Untersuchung beinhaltete eine körperliche Untersuchung, eine Analyse der Plasma NT-pro-BNP Werte und eine transthorakale Echokardiographie bei jeder Verlaufsuntersuchung.

### **5.2 Konventionelle echokardiographische Untersuchung und Tissue Doppler Imaging**

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden bei allen Patienten vom gleichen Untersucher mittels der Vivid 7 mit der TDI (Tissue Doppler Imaging) Anwendung (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) vorgenommen.<sup>68</sup> Wir benutzten einen kombinierten 3,5-

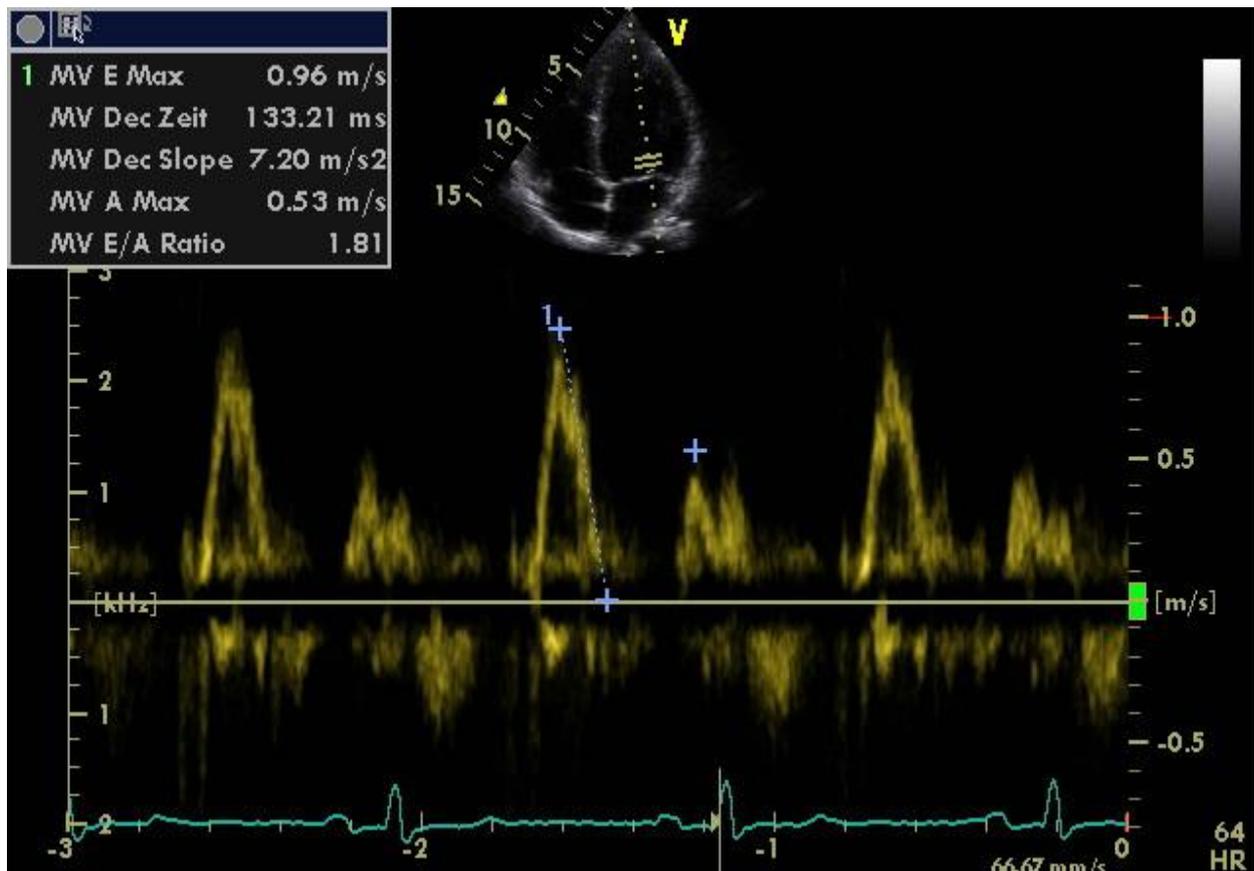
MHz/2,5-MHz Doppler Schallkopf. Im 4-Kammerblick wurden 2D-Bilder und Doppler-Flussgeschwindigkeiten aufgezeichnet und später ausgewertet.

Alle Patienten wurden in Linksseitenlage bei Ruheatmung untersucht und waren im Sinusrhythmus.

Die Mitralflussgeschwindigkeit wurde am Ende der Expiration gemessen. Dabei wurde der Messpunkt im linken Ventrikel auf die Spitzen der sich öffnenden Mitralsegel gesetzt.

Die Mitralklappeneinflussmessungen beinhalteten die Messung der Spitze der frühen (early) (E) und der späten (atrialen) (A) Einstromgeschwindigkeit, des E/A Verhältnisses, der Verzögerungszeit der frühen Mitralflussgeschwindigkeit (DT), und der isovolumischen Entspannungszeit (IVRT) – siehe Bild 1. Diese Daten wurden dem Alter und der Herzfrequenz angepasst, dies entsprechend den von Swedberg et al beschriebenen Richtlinien.<sup>69,70</sup>

**Bild 1: PW Dopplermessung Mitralklappe - regelrechtes E/A Verhältnis**



**oben** 4 Kammerblick im transthorakalen echokardiographischen Bild, Pulsed Waved (PW) Dopplermessung über der Mitralklappe  
**unten** Blutflussprofil über der Mitralklappe  
**E** - frühe (early) Mitralklappeneinstromgeschwindigkeit  
**A** - späte (atriale) Mitralklappeneinstromgeschwindigkeit

Die Messungen der Kammergrößen einschließlich des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVDD), septaler und hinterer Wanddicke, und linker Vorhofgröße wurden mit den Standardmethoden aus einem geeigneten 2D-Bild bestimmt. Die LVEF wurde mittels Simpsons 2-Ebenenmethode<sup>71</sup> bestimmt.

Alle Klappenereignisse [Aortenklappenöffnung (AVO), Aortenklappenschluss (AVC), Mitralklappenöffnung (MVO), Mitralklappenschluss (MVC)] wurden mit Hilfe des Continuous Wave (CW) Doppler-Bildes (Aortenklappe) bzw. Pulsed Wave (PW) Doppler-Bildes

(Mitralklappe) markiert. An diesen Markierungen konnte man sich für die spätere Auswertung des Tissue Doppler Imaging (TDI) bezüglich des Herzzyklus (Systole, Diastole) orientieren.

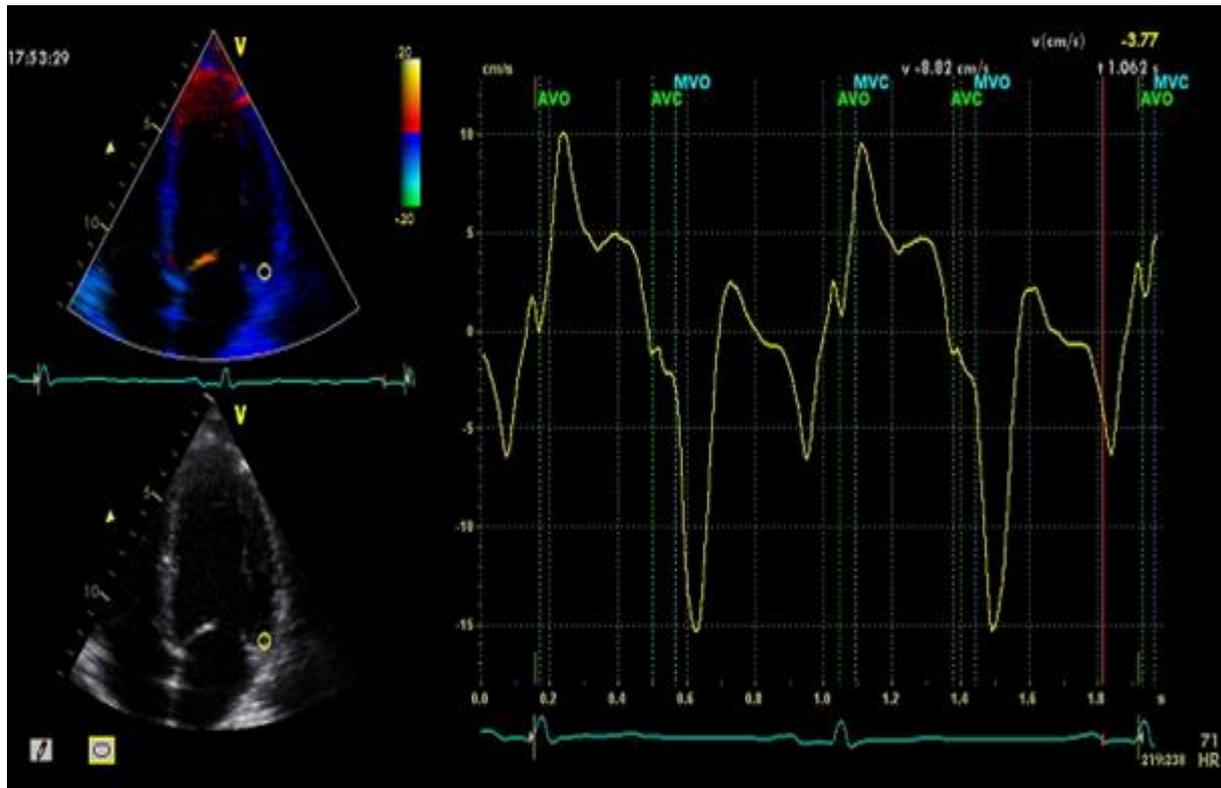
Alle sonographischen Untersuchungen wurden auf der internen Festplatte des Echokardiographiegeräts und auf einen externen Speicher (1,2-GB Magnet-Optischen Diskette) gespeichert. Auf diese Weise konnten die Daten später in einem zweiten Arbeitsgang bezüglich des TDI ausgewertet werden.

Tissue Doppler Imaging (TDI) ermöglicht die Erfassung myokardialer Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeiten während einer Ultraschalluntersuchung<sup>72-74</sup> und liefert quantitative Informationen über regionale myokardiale Bewegungen während des Herzzyklus.

Bei der Untersuchung der auf der linken Seite liegenden Patienten wurden die TDI Kurven des Septums sowie der lateralen Wand, jeweils an basaler Position, im 4-Kammerblick für mindestens drei Herzzyklen registriert. Dabei beschränkte sich die TDI Messung jeweils auf eine definierte Region (region of interest, ROI). Die Bildrate beträgt ca. 200 Bilder/Sekunde.

Anhand des jeweiligen ROI wurden nacheinander am lateralen und septalen Mitralling jeweils für jeden Zyklus die maximalen systolischen ( $S'_{\text{septal}}$  bzw.  $S'_{\text{lateral}}$ ), die frühen diastolischen ( $E'_{\text{septal}}$  bzw.  $E'_{\text{lateral}}$ ) und die späten diastolischen ( $A'_{\text{septal}}$  bzw.  $A'_{\text{lateral}}$ ) Höchstgeschwindigkeiten gemessen und das jeweilige arithmetische Mittel bestimmt. Anhand der zuvor bei der konventionellen Herzechokardiographie markierten Klappenereignisse und dem zugleich mitlaufenden Echokardiogramm konnte sich der Untersucher zeitlich orientieren – siehe Bild 2.

**Bild 2: TDI Messung an der Basis der lateralen Wand**



**links oben** Tissue Doppler Imaging (TDI) Bild im 4 Kammerblick der transthorakalen Echokardiographie

**links unten** 4 Kammerblick der transthorakalen Echokardiographie

**rechts** TDI Kurvenverlauf während einer Herzaktion

**MVO** - Mitralklappenöffnung

**MVC** - Mitralklappenschluss

**AVO** - Aortenklappenöffnung

**AVC** - Aortenklappenschluss

**S'** - maximale systolische Myokardgeschwindigkeit

**E'** - frühe diastolische Myokardgeschwindigkeit

**A'** - späte diastolische Myokardgeschwindigkeit

Das Verhältnis der frühen zur späten Mitralringhöchstgeschwindigkeit ( $E'/A'$ ) wurde als ein Maß für die diastolische Funktion bestimmt. Ebenso wurde - durch das Verhältnis der Geschwindigkeit des Flusses durch die Mitralklappe zur Mitralringgeschwindigkeit ( $E/E'$ ) - der

linksventrikuläre Füllungsindex als Maß der diastolischen Funktion bestimmt. Die gesamte diastolische Phase wurde durch das mitrale und pulmonale Flussprofil definiert.

Eine verringerte diastolische Funktion wurde bei der Erstuntersuchung mittels konventioneller Echokardiographie wie folgt definiert: E/A ratio < 1, DT > 220 ms.

Der linksventrikuläre Füllungsindex wurde am Anfang der Studie (Initial) nicht bestimmt, da die Bedeutung des „tissue Dopplers“ erst seit kurzem bekannt ist. Neue Richtlinien zeigen, wie wichtig der „tissue Doppler“ ist um eine Herzinsuffizienz mit einer normalen Ejektionsfraktion (HFNEF) zu diagnostizieren.<sup>69</sup>

Eine diastolische Dysfunktion lässt sich nach heutigem Kenntnisstand mit den herkömmlichen echokardiographischen Untersuchungen nicht sicher diagnostizieren. Die Spezifität der Einzelparameter der Echokardiographie (IVRT, DT, E, A, E/A) liegt bei nur 40-70 %.<sup>75</sup>

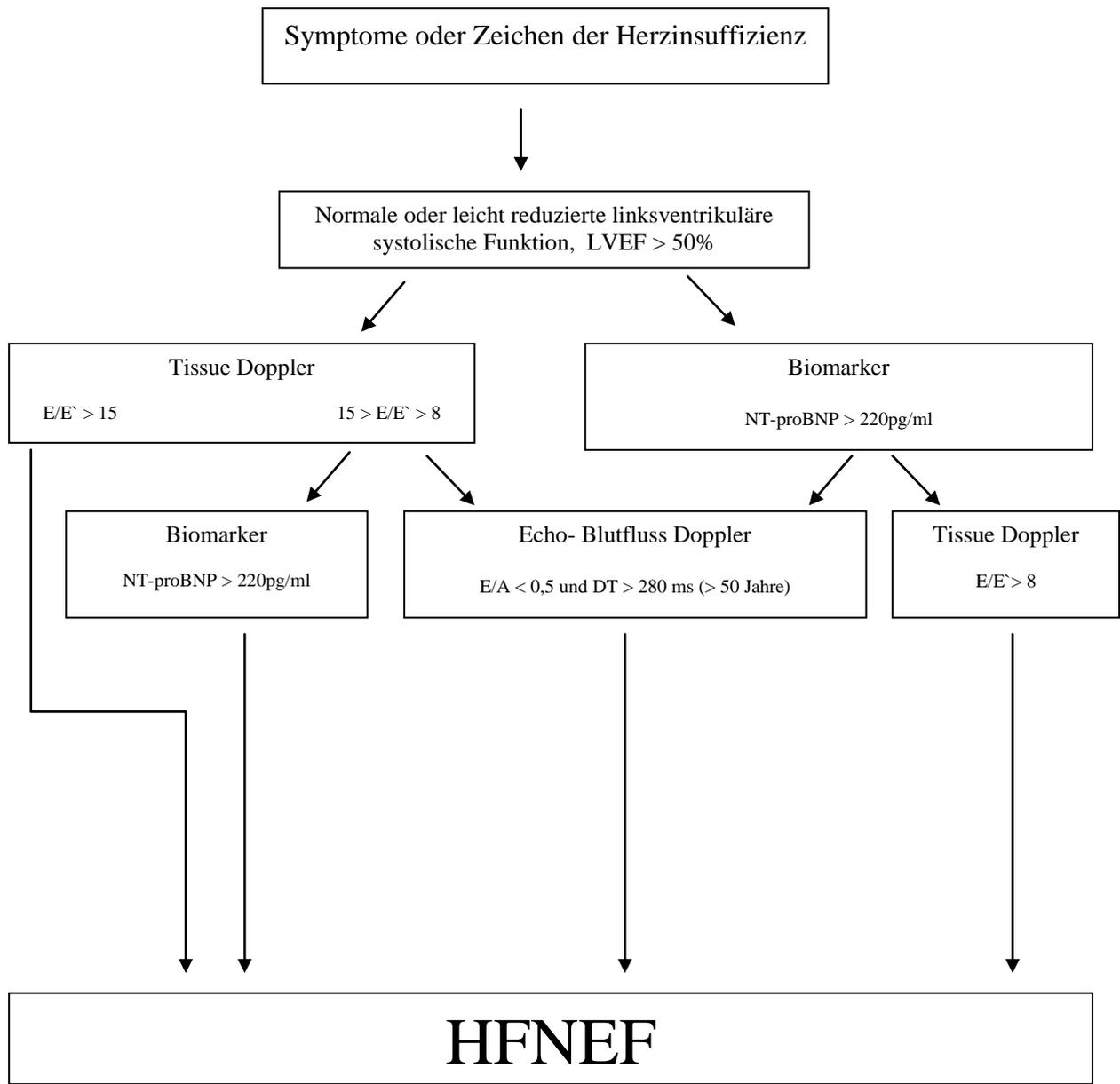
Die ESC empfiehlt den Einsatz des Tissue Doppler Imaging (TDI), wobei insbesondere das Verhältnis des frühen Mitralflusses (E) zur Mitralringbewegungsgeschwindigkeit (E') ein Schlüsselparameter zur Diagnose einer HFNEF mit diastolischer Dysfunktion ist.

Von allen echokardiographisch genutzten Parametern ist der linksventrikuläre Füllungsindex E/E' am geeignetsten um eine diastolische Dysfunktion bei einer HFNEF zu erkennen.<sup>68</sup> Dieser Index korreliert sehr eng mit dem LV Füllungsdruck und der „diastolic stiffness“. Ein Füllungsindex  $E/E' < 8$  spricht für einen normalen, und ein  $E/E' > 15$  für einen erhöhten LV Füllungsdruck.<sup>76</sup> Demzufolge ist bei E/E' Werten über 15 von einer HFNEF mit diastolischer Dysfunktion auszugehen.

### **5.3 Diagnostik der HFNEF**

Die Diagnose einer Herzinsuffizienz mit einer normalen Ejektionsfraktion (HFNEF) wurde laut den Richtlinien der „Heart Failure and Echocardiography Associations“ der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie gestellt.<sup>77</sup>

In der folgenden Abbildung wird in Anlehnung an das Flussdiagramm zur Diagnose einer HFNEF aus „How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction“ von Paulus et al.<sup>77</sup>, der Diagnoseweg in unserer Studie dargestellt:



### 5.3.1 NT-proBNP

Atrial natriuretic peptid (ANP) und brain natriuretic peptid (BNP) werden bei erhöhter atrialer oder ventrikulärer Dehnung von Myozyten gebildet und abgegeben. BNP bildet sich aus dem von den Myozyten abgegebenen pro-BNP, wobei das Nebenprodukt NT-proBNP entsteht.

Der Biomarker NT-proBNP hat einen mit der TDI vergleichbaren diagnostischen Wert für die diastolische Herzinsuffizienz.<sup>78</sup> Die ESC zeigt in ihrem Flussdiagramm zur Diagnose der HFNEF deutlich den diagnostischen Wert von NT-proBNP.<sup>77</sup> Zur Diagnostik einer HFNEF muss der NT-proBNP Wert immer in Kombination mit einer nichtinvasiven Untersuchung wie dem TDI kombiniert werden.<sup>77</sup> Allein kann der NT-proBNP Wert lediglich zum Ausschluss, nicht aber zur Diagnose einer HFNEF verwendet werden.

Bei den Verlaufsuntersuchungen wurde von allen Patienten Serum entnommen und auf NT-pro BNP (pmol/l) hin untersucht.

Das NT-proBNP wurde mittels des cobas e Immunoassay-Systems von Roche nach den Anleitungen des Herstellers des Testsystems in dem Labor der Charité -Campus Benjamin Franklin- bestimmt. Untersucht wurde das Patientenserum, entnommen mit Standard-Probenentnahmeröhrchen – Li-Heparin.

### 5.4 Detektion von viralen Genomen in EMB durch nPCR und qPCR

Die Methode zur PCR-Amplifikation von enteroviralem (RNA) und adenoviralem Genom (DNA) aus EMBs ist, wie detailliert veröffentlicht,<sup>17</sup> angewandt worden und stellt keine experimentelle Eigenleistung dieser Promotion dar. Die Daten stammen aus der Routineanalyse, die an dem Institut für kardiale Diagnostik und Therapie Berlin (IKDT) durchgeführt wurde.

An jeweils vier Proben wurde, übereinstimmend mit oben genannten bereits publizierten Techniken<sup>2, 17</sup>, eine molekularbiologische Untersuchung nach kardiotropen viralen Genomen durchgeführt. Kurz dargestellt, wurde an RNA Strängen, welche bei den EMBs gewonnen wurden, zur Suche nach Enteroviren - einschließlich Cocksackie Viren und Echo Viren - und im DNA nach dem Epstein Barr Virus, dem Parvovirus B19 und dem humanen Herpes Virus 6 eine „PCR/reverse transcription-PCR“ durchgeführt. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Extraktion von DNA und RNA aus dem Herzmuskelgewebe wurden oligonukleotide Sequenzen der DNA-Sequenz vom Gen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase bestimmt. Die Spezifität aller Amplifikationsprodukte wurde durch die automatische DNA Sequenzierung bestätigt.<sup>49</sup>

## 5.5 Immunhistochemische Färbung

Die Methode zur immunhistochemischen Färbung der EMBs ist bereits mehrfach detailliert durch Kollegen unserer Arbeitsgruppe unter Prof. Dr. Pauschinger und Prof. Dr. Tschöpe veröffentlicht<sup>17</sup> worden. Die immunhistochemische Färbung erfolgte bei allen bei uns in der Studie eingeschlossenen Patienten im Rahmen der initialen Behandlung und erfolgte nach den genannten wissenschaftlichen Standards in Anlehnung an Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe.<sup>17,</sup>

<sup>79</sup> Die Immunhistologie stellt keine experimentelle Eigenleistung dieser Promotion dar. Zusammenfassend erfolgte die immunhistologische Diagnostik wie folgt: Die EMBs wurden aus dem rechtsventrikulären Septum via perkutanem transvenösem Zugang über die rechte V. femoralis im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung unter Einsatz eines Cordis Bioptoms® (Cordis GmbH, Haan, Deutschland) entnommen. Zur konventionellen Histologie wurde jeweils 1 EMB nach Standardmethoden in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die hieraus angefertigten Schnitte wurden nach Standardprotokollen mit Haematoxylin-Eosin gefärbt. Zur immunhistologischen Evaluation wurden die EMBs in OCT-Compound® (Tissue TEC® (SLEE, Mainz, Germany) eingebettet und umgehend in Methylbutane in flüssigem Stickstoff schockgefroren und hiernach bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Nutzung gelagert.

Eingelegte Proben wurden seriell in Kryoschnitten mit einer Dicke von  $5\ \mu\text{m}$  geschnitten und auf einen mit 10% Poly-L-Lysine beschichteten Objektträger gelegt. Durch die Immunhistochemie wurden die entzündlichen Infiltrate charakterisiert. Eine myokardiale Entzündung wurde definiert durch den Fund von infiltrierenden Lymphozyten (mittlere Zellausählung  $> 7.0$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) und Makrophagen (mittlere Zellausählung  $> 35.0$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) in Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von „intercellular cell adhesion molecule-1“ (ICAM-1) auf interstitiellen oder endothelialen Zellen. Als Primärantikörper verwendeten wir: CD3<sup>+</sup> (Dako, Glostrup, Denmark, dilution 1:25), CD11b<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup> (ImmunoTools, Friesoythe, Germany, dilution 1:500), HLA-1 (Dako, dilution 1:2000), ICAM-1 (ImmunoTools, dilution 1:800) und Perforin (BD Bioscience, San Jose, California, dilution 1:150).

Zur histologischen Diagnostik wurden die Dallas-Kriterien angewandt.<sup>80</sup> Die kodierten Objektträger wurden verblindet untersucht. Sie wurden immunhistologisch gefärbt und die Immunreaktivität wurde bei einer 200-fachen Vergrößerung mittels einer digitalen Bildanalyse, „digital image analysis“(DIA) quantifiziert.<sup>55, 81</sup>

## **5.6 Statistische Analyse und Erklärung der statistischen Tabellen**

Die Daten werden als Mediane (25% - 75% Perzentil) gezeigt. Als sich herausstellte, dass die Daten nicht normalverteilt waren, wurde der „Mann-Whitney U Test“ angewandt. „Fisher’s exact test“ wurde eingesetzt um kategoriale Variablen zu analysieren. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Daten wurden mit Graphpad 5.01 (PRISM, SanDiego, USA) und PASW Statistics 18 analysiert.

## **6. Ergebnisse**

### **6.1 Demographische und klinische Daten**

Die Grundpopulation und die klinischen Charakteristika werden in Tabelle 1 dargestellt. Es wurden 50 Patienten in die Studie eingeschlossen, 13 Frauen und 37 Männer, mit einem Durchschnittsalter von 43,5 Jahren (Spannweite 35.1 bis 57.3 Jahre). Alle Patienten in der Kohorte wurden aufgenommen mit Brustschmerz, ST-Hebungen und/oder erhöhten herzspezifischen Laborparametern. Während dieser Aufnahme wurden sie einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen. Die durchschnittliche Zeit bis zur Nachuntersuchung betrug 72 Monate (Spannweite 58-78 Monate). Zwei der Patienten entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie. Zwei männliche Patienten verstarben innerhalb von 2 Jahren nach ihrer ersten Präsentation an kardiovaskulären Erkrankungen. Ein 42-jähriger männlicher AMC-Patient benötigte 1,5 Jahre nach seiner ersten Präsentation eine Herztransplantation. Die Grundpopulation hatte anfangs mehrheitlich eine Herzinsuffizienz NYHA Klasse 2.

In der Nachuntersuchung hatten 22 von 45 Patienten klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz bei einer normalen linksventrikulären Funktion. Bei diesen 22 Patienten konnte nach den gültigen diagnostischen Kriterien eine HFNEF diagnostiziert werden. Die übrigen 23 Patienten waren gesund. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Patientendaten in der Verlaufsuntersuchung. Die echokardiographisch ermittelten Parameter der Verlaufsuntersuchung werden in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 1: Patientendaten initial

	Alle eingeschlossenen Patienten	Keine HFNEF-Entwicklung im Verlauf	HFNEF-Entwicklung im Verlauf
<b>Patientenzahl</b>	<b>50</b>	<b>23</b>	<b>22</b>
<b>Alter, Jahre</b>	<b>43,53 (35,09-57,27)</b>	<b>40,2(31,5-56,9)</b>	<b>44,1 (40,1-57,7)</b>
<b>Geschlecht, Mann/Frau</b>	<b>37/13</b>	<b>20/3</b>	<b>15/7</b>
<b>Verlaufsuntersuchung, Monate</b>	<b>72 (58-78)</b>	<b>72,0(52,5-75,5)</b>	<b>72,0(39,5-79,0)</b>
<b>NYHA initial, n</b>	<b>8 x I, 35 x II, 6 x III, 1 x IV</b>	<b>23x I</b>	<b>17x II, 5x III</b>
<b>Medikamente, n</b>			
<b>-β-Blocker</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>-ACE-Hemmer</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>-Diuretika</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b><u>Echokardiographie</u></b>			
<b>LVEF, Simpson (%)</b>	<b>67,0 (53,5-73,5)</b>	<b>71,0(56,0-78,0)</b>	<b>62,5(54,5-70,5)</b>
<b>LA parasternal, mm</b>	<b>36,0 (34,0-38,0)</b>	<b>37,0(35,0-39,0)</b>	<b>34,0(30,0-37,5)</b>
<b>LVEDD, mm</b>	<b>50,0 (48,0-55,5)</b>	<b>51,0(48,0-55,0)</b>	<b>49,0(48,0-54,5)</b>
<b>LVESD, mm</b>	<b>33,0 (29,5-37,5)</b>	<b>33,0(31,0-37,0)</b>	<b>32,0(28,5-35,0)</b>
<b>Septum, mm</b>	<b>10,0 (10,0-12,0)</b>	<b>11,0(10,0-13,0)</b>	<b>10,0(9,5-11,0)</b>
<b>Hintere Wand, mm</b>	<b>10,0 (9,0-11,0)</b>	<b>10,0(9,0-12,0)</b>	<b>10,5(10,0-11,0)</b>
<b><u>konventioneller Doppler</u></b>			
<b>E/A<sub>aged</sub></b>	<b>1,1 (0,83-1,5)</b>	<b>0,94(0,77-1,35)</b>	<b>1,19(0,82-1,46)</b>
<b>IVRT, ms</b>	<b>93,0 (88,8-112,0)</b>	<b>93,0(88,0-112,0)</b>	<b>93,0(88,0-113,5)</b>
<b>DT, ms</b>	<b>183,0 (180,0-199,5)</b>	<b>182,0(180,0-199,0)</b>	<b>183,0(180,0-201,0)</b>

**\*Werte als Median dargestellt (25-75% quartile)**

A – Flussgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der atrialen Füllung

DT – Dezelerationszeit

E - Flussgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der schnellen Füllung

IVRT – Isovolumic relaxation time

LA – Linksatrial

LVEDD – Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser

LVEF – Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

LVESD – Linksventrikulärer Endsystolischer Durchmesser

NYHA – New York Heart Association

Tabelle 2: Vergleich der Patientendaten in der Verlaufsuntersuchung

	Verlaufsuntersuchung	Verlaufsuntersuchung	
Demographische Daten	Patienten ohne HFNEF	Patienten mit HFNEF	P Wert
Anzahl an Patienten	23	22	n.s.
Alter initial, Jahre	40.2 (31.5-56.9)	44,1 (40,1-57,7)	n.s.
Geschlecht, Mann/Frau	20/3	15/7	n.s.
Verlaufsuntersuchung, Monate	72 (51-76)	71 (55-80)	n.s.
Krankenhausaufnahmen, n	1	7	0.02
- Tage im Krankenhaus	4	7.0 (4.0-8.0)	n.s.
NT-pro BNP pmol/L	7.3 (4.2-11.9)	19.9 (10.6-24.15)	0.006
Medikamente, n			
- $\beta$ -Blocker	6	5	n.s.
- ACE-Hemmer	10	12	n.s.
- Diuretika	4	1	n.s.

Tabelle 3: Echokardiographisch ermittelte Herzgröße und Messwerte der systolischen und diastolischen Funktion bei der Verlaufsuntersuchung

	Verlaufsuntersuchung	Verlaufsuntersuchung	
	Patienten ohne HFNEF	Patienten mit HFNEF	P Wert
<b><u>Echokardiographie</u></b>			
LVEF, Simpson (%)	64.0 (63.0-68.0)	64.0(59.0-68.0)	0.42
LA parasternal, mm	38.0 (37.0-40.0)	36.5 (33.0-42.0)	0.33
LVEDD, mm	52.0 (49.0-55.0)	49.0 (45.0-52.0)	0.05
LVESD, mm	32.0 (27.0-35.0)	31.0 (27.0-33.5)	0.48
Septum, mm	11.0 (10.0-11.0)	10.0 (9.0-11.5)	0.57
Hintere Wand, mm	11.0 (10.0-11.0)	11.0 (9.0-11.0)	0.57
LVOT, m/s	1.0 (0.92-1.10)	1.0 (0.95-1.13)	0.79
<b><u>konventioneller</u></b>			
<b><u>Doppler</u></b>			
E, m/s	0.7 (0.63-0.84)	0.81 (0.71-0.94)	0.16
A, m/s	0.61 (0.47-0.7)	0.84 (0.74-0.99)	0.001
E/A	1.12 (1.03-1.42)	0.97 (0.81-1.18)	0.012
IVRT, ms	85.6 (73.9-95.6)	102.7 (91.3-107.9)	0.0024
DT, ms	205 (180-216)	241 (205-255)	0.02
<b><u>Tissue Doppler</u></b>			
S <sub>lateral</sub> , m/s	0.08 (0.06-0.09)	0.07 (0.05-0.08)	0.09
E' <sub>lateral</sub> , m/s	0.09 (0.08-0.11)	0.07 (0.06-0.08)	0.006
A' <sub>lateral</sub> , m/s	0.07 (0.05-0.09)	0.07 (0.06-0.08)	0.9
E'/A' <sub>lateral</sub>	1.43 (0.87-1.95)	0.92 (0.61-1.3)	0.03
E/E' <sub>lateral</sub>	7.9 (6.9-8.9)	9.4 (8.3-16.9)	0.006
S <sub>septal</sub> , m/s	0.06 (0.06-0.07)	0.06 (0.05-0.06)	0.07
E' <sub>septal</sub> , m/s	0.09 (0.08-0.11)	0.07 (0.06-0.09)	0.03
A' <sub>septal</sub> , m/s	0.07 (0.06-0.09)	0.07 (0.07-0.08)	0.9
E'/A' <sub>septal</sub>	1.19 (0.98-1.45)	0.9 (0.75-1.25)	0.04
E/E' <sub>septal</sub>	6.8 (6.4-9.1)	10.9 (9.3-13.8)	0.001
E/E' <sub>mean</sub>	7.4 (6.8-9.8)	10.8 (9.5-14.4)	0.001

\*Werte als Median dargestellt (25-75% quartile)

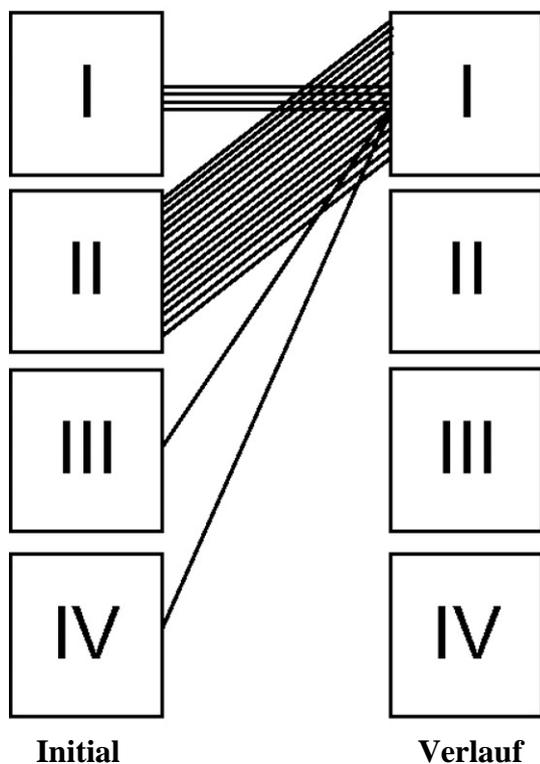
## 6.2 Herzinsuffizienzsymptomatik - NYHA-Klassifikation

Die Patienten mit einer HFNEF zeigen in der Verlaufsuntersuchung eine Verschlechterung der Herzinsuffizienzsymptomatik. Dies ist mittels der NYHA-Klassifizierung nachweisbar. Acht der 22 Patienten haben in der Verlaufsuntersuchung eine schlechtere NYHA-Klassifizierung. Nur ein Patient verbesserte sich diesbezüglich.

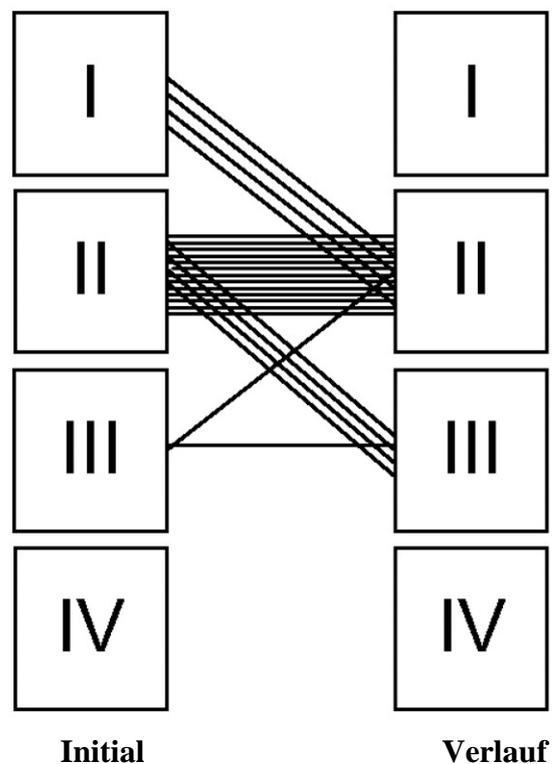
Bei den Patienten ohne HFNEF zeigt sich eine Verbesserung bei 19/23 Patienten. Alle Patienten präsentieren sich in der Verlaufsuntersuchung mit einer NYHA-Klassifizierung Grad I.

NYHA-Klassifizierung	Initial	Verlauf
HFNEF (n=22)	4 x I, 16 x II, 2 x III	17 x II, 5 x III
Kein HFNEF (n=23)	4 x I, 17 x II, 1 x III, 1 x IV	23 x I

**Patienten ohne HFNEF**



**Patienten mit HFNEF**



### **6.3 Zahl der Krankenhausaufnahmen**

Während des Beobachtungszeitraumes wurden 32% (7/22) der HFNEF Patienten aufgrund einer Herzinsuffizienzsymptomatik in ein Krankenhaus aufgenommen. Diese hatten eine mittlere Krankenhausaufenthaltsdauer von 7.0 (4.0-8.0) Tagen. Dahingegen wurde nur 1 Patient (1/23) aus der Gruppe der Patienten ohne HFNEF wieder in ein Krankenhaus aufgenommen (4 Tage). Bezüglich der Rehospitalisation zeigt sich eine signifikante Korrelation mit der Diagnose einer HFNEF ( $p=0,02$ ).

### **6.4 Herzgröße**

Die echokardiographischen Messergebnisse bei der Erstaufnahme und bei der Nachuntersuchung werden in Tabelle 1 und Tabelle 3 gezeigt. Die mittlere linksventrikuläre diastolische Größe sowie der linksatriale Durchmesser waren bei der Erstaufnahme nicht erhöht. Bei der Nachuntersuchung konnte kein Unterschied dieser Parameter bei Patienten mit oder ohne HFNEF festgestellt werden.

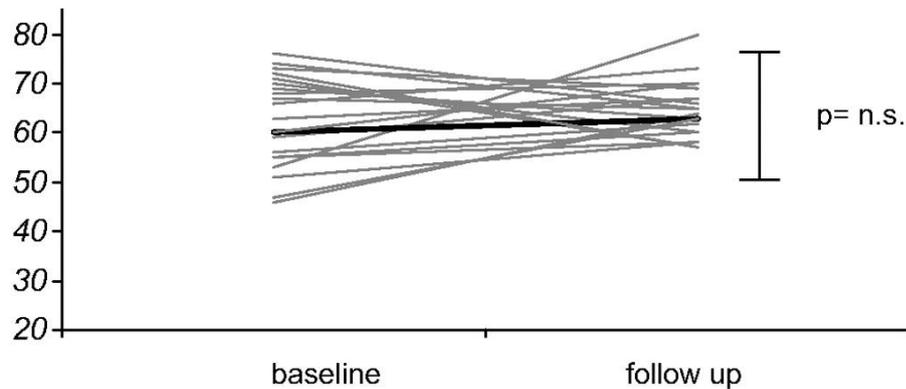
### **6.5 Systolische Funktion des linken Ventrikels**

Bei Patienten mit einer HFNEF und denen ohne HFNEF wurde initial kein Unterschied der durchschnittlichen linksventrikulären Funktion bezüglich der Ejektionsfraktion gesehen. Auch konnte diesbezüglich bei der Verlaufsuntersuchung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Drei der 23 Patienten ohne Symptome einer Herzinsuffizienz und 3 der 22 Patienten mit HFNEF erholten sich von einer eingeschränkten linksventrikulären systolischen Funktion ( $LVEF < 50\%$ ) und zeigten in der Nachuntersuchung eine vollständige Normalisierung der linksventrikulären Funktion. Zwei der Patienten mit einer initial leicht reduzierten LVEF entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie.

**Hämodynamische Veränderungen der systolischen Ejektionsfraktion (%) mittels konventionellen Herzechos gemessen. (a) asymptotische Patienten im Verlauf und (b) symptomatische Patienten im Verlauf.**

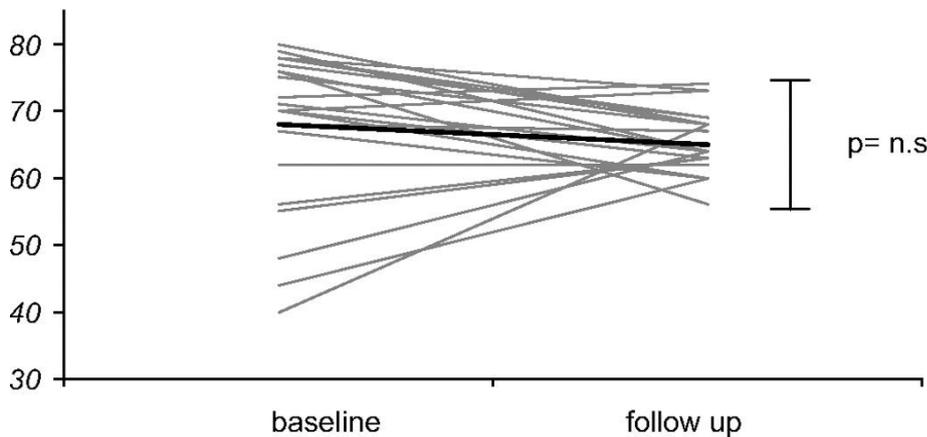
**a) EF (%) at baseline and follow-up in asymptomatic patients**

ejection fraction (%)



**b) EF (%) at baseline and follow-up in symptomatic patients**

ejection fraction (%)



**6.6 Diastolische Funktion des linken Ventrikels**

Die diastolische Funktion wurde mittels konventioneller Echokardiographie, und bei der Verlaufsuntersuchung zusätzlich mittels TDI Echokardiographie untersucht.

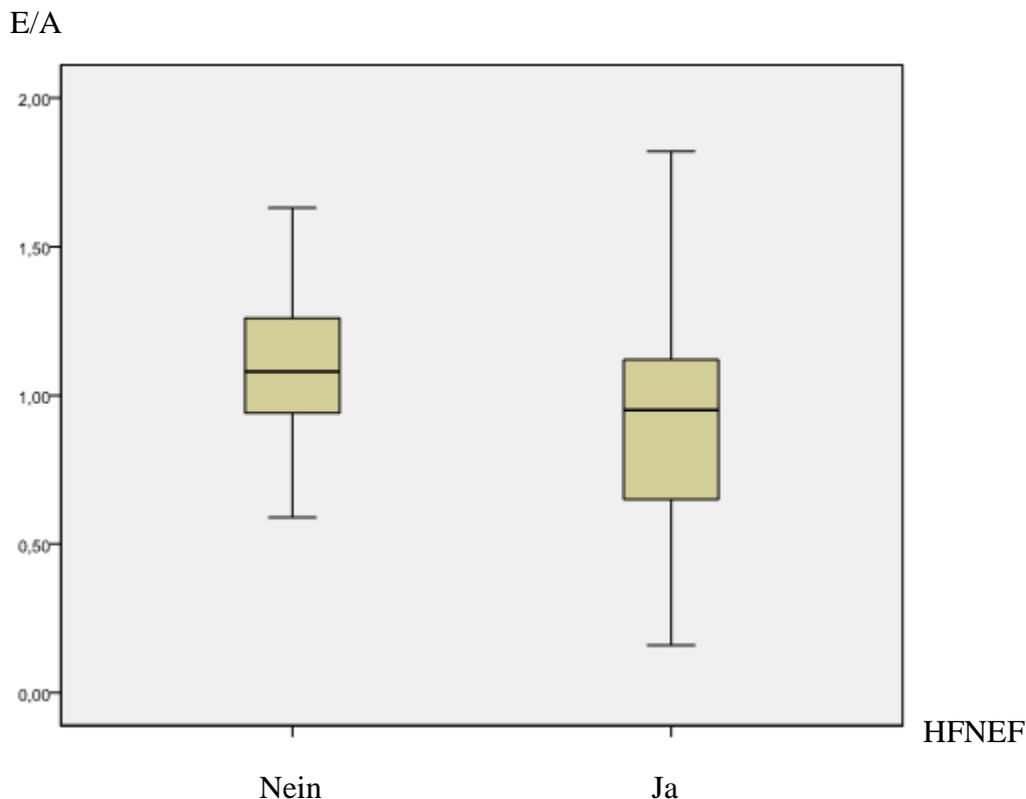
Tabelle 3 zeigt die diastolischen Messergebnisse des konventionellen Dopplers und des TDI. Eine Analyse der diastolischen Füllungsmuster bei Erstaufnahme zeigten im Mittel keine Fehlfunktionen. Bei der Erstaufnahme gab es keine Unterschiede zwischen der Patientengruppe, die in der Verlaufsuntersuchung eine HFNEF zeigt und derjenigen, die keine HFNEF zeigt. In

der Nachuntersuchung hatten Patienten mit einer HFNEF im Vergleich zu den Patienten ohne HFNEF eine signifikant erhöhte IVRT und ein verringertes E/A Verhältnis ( $p < 0,012$ ) - siehe Grafik 1.

Mittels der Untersuchung des Füllungsindex  $E/E'$  konnten wir einen signifikanten Anstieg der Patienten mit einer HFNEF mit diastolischer Herzinsuffizienz beobachten (Tabelle 3). Ohne Anwendung des Füllungsindex  $E/E'$  hätten nicht alle HFNEF Patienten erkannt werden können. Dies zeigt, wie wichtig das TDI für die Diagnostik einer HFNEF ist.

Zwischen den Patienten mit HFNEF und denen ohne HFNEF wurde kein Unterschied hinsichtlich des Alters festgestellt. Genau so wenig konnte zwischen den Patienten ein Unterschied bezüglich der bekannten Risikofaktoren für die Entwicklung einer HFNEF gefunden werden. Eine Korrelation zwischen HFNEF und dem weiblichen Geschlecht gab es nicht ( $p = 0,305$ ).

Grafik 1: Boxplot HFNEF(ja/nein) / E/A Verlauf ( $p < 0,012$ )



## **6.7 NT-proBNP bei der Verlaufsuntersuchung**

Patienten mit einer HFNEF hatten einen 3-mal höheren Plasma pro-N terminal-BNP (pmol/l) Wert ( $p=0,006$ ) als Patienten mit einer normalen LV diastolischen Funktion ohne Symptome einer Herzinsuffizienz in der Nachuntersuchung (siehe Tabelle 2).

## **6.8 Der Nachweis von viralen Genomen und die immunhistologische Färbung der EMBs bei der Erstpräsentation**

Die Häufigkeiten, in der virale Genome durch nPCR gefunden wurden, werden in Tabelle 4 gezeigt. Die Prävalenz von viralen Genomen war bei Patienten mit HFNEF im Vergleich zu Patienten ohne jeglichen Anhaltspunkt für eine HFNEF nicht signifikant erhöht (16/22 versus 12/23;  $p = 0,133$ ).

Zwischen viruspositiven und virusnegativen Patienten konnte mittels der immunhistologischen Färbung weder bei T-Lymphozyten oder Makrophageninfiltraten noch bei der endothelialen Expression von CAM ein Unterschied gezeigt werden. Dennoch war die Zahl der Lymphozyten und der Makrophagen in der Gruppe der virusnegativen als auch der viruspositiven Gewebeproben erhöht ( $> 7$  Zellen/mm<sup>2</sup>), und die Expression der Adhäsionsmoleküle korrelierte mit den infiltrierenden Entzündungszellzahlen.

Tabelle 4: Verteilung der Virusgenome (mittels PCR bestimmt) und der immunhistochemisch nachgewiesenen intramyokardialen Entzündung bei Patienten mit und ohne HFNEF

	Patienten ohne HFNEF	Patienten mit HFNEF
<b>B19V, n</b>	<b>5</b>	<b>12</b>
<b>EV, n</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>HHV6, n</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>EBV, n</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>B19V+EBV, n</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>B19V+HHV6+EBV, n</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
<b>Intramyokardiale Entzündung</b>		
<b>ICAM-1 Expression, n</b>	<b>23</b>	<b>22</b>
<b>CD3+ Lymphozyten/mm<sup>2</sup></b>	<b>18.8 (10.5-24.2)</b>	<b>17.6 (11.6-34.2)</b>
<b>zytotoxische T-Lymphozyten/mm<sup>2</sup></b>	<b>2.5 (1.2-6.3)</b>	<b>4.5 (3.5-7.9)</b>
<b>Mac-1 (Makrophagen)/mm<sup>2</sup></b>	<b>38.5 (27.2-51.2)</b>	<b>42.5 (20.7-53.7)</b>

Nach statistischer Überprüfung mittels des exakten Tests nach Fischer zeigten sich weder bei viruspositiven Herzmuskelbiopsien mit B19V ( $p=0,231$ ) noch bei HHV6 ( $p=0,159$ ) eine Korrelation zur möglichen Entwicklung einer HFNEF. Der Nachweis von EBV ( $n=1$ ) und EV ( $n=2$ ) zeigte sich nur bei Proben von Patienten, die keine HFNEF entwickelt haben.

Tendenziell zeigt sich jedoch ein möglicher Zusammenhang des B19V-Befalls mit der Entwicklung einer HFNEF.

Drei Patienten zeigten eine Tripelinfektion mit B19+HHV6+EBV. Diese Patienten entwickelten alle keine HFNEF.

## 7. Diskussion

Die Zielsetzung der Arbeit war, die möglichen Langzeitfolgen einer erlittenen AMC zu untersuchen. Im Allgemeinen gilt,<sup>22</sup> dass im natürlichen Verlauf der AMC der Großteil der Patienten sich im Laufe der Zeit vollkommen erholt, auch hinsichtlich der LVEF und der linksventrikulären Dimensionen. Die jetzt präsentierten Daten zeigen aber zum ersten Mal, dass nach einer AMC knapp die Hälfte der Patienten einen kardialen Schaden entwickelt, der sich in einer Herzinsuffizienzsymptomatik äußert und nicht auf eine DCM zurückzuführen ist.

Die Entwicklung einer DCM ist bereits in vielen Studien beschrieben worden. Die Anzahl der Patienten mit einer Herzinsuffizienzsymptomatik ist allerdings weitaus größer als die Anzahl derer die eine DCM entwickeln. Eine mögliche Ursache für die Entwicklung der Herzinsuffizienzsymptomatik sehen wir in einer sich post AMC entwickelnden diastolischen Dysfunktion.

Mit dem „Tissue Doppler Imaging“ wurde eine neue Methode zur Untersuchung der Entwicklung der Herzfunktion nach AMC verwendet.

Zunächst untersuchten wir, wie viele Patienten nach einer AMC eine Herzinsuffizienzsymptomatik entwickeln und in welchem Ausmaß die diastolische Dysfunktion dafür verantwortlich ist.

Die wesentliche Erkenntnis dieser Studie ist, dass nach 4 bis 6 Jahren nach AMC 49% der Patienten (22/45) eine Herzinsuffizienzsymptomatik entwickeln, die sich durch eine Dyspnoe und Belastungsintoleranz manifestiert, sich aber nicht durch eine reduzierte LVEF begründen lässt. Dies zeigt sich signifikant in einer NYHA Klassifizierung von II-III bei guter systolischer Funktion. 90% (45/50) der AMC Patienten haben in der Verlaufsuntersuchung keine Einschränkung der LVEF. In dieser Studie zeigt sich, dass die Herzinsuffizienzsymptomatik mit einer diastolischen Dysfunktion assoziiert ist. Somit leidet im Verlauf ein Teil der Patienten mit Herzinsuffizienzsymptomatik an einer HFNEF mit diastolischer Dysfunktion. Die bisher bekannten prädisponierenden Faktoren für eine diastolische Dysfunktion<sup>83,84</sup> wie Alter, schwerer Bluthochdruck, koronare Herzerkrankungen, Diabetes mellitus und Obesitas wurden bei den Patienten in unserer Studienpopulation ausgeschlossen. Eine Korrelation zwischen HFNEF und dem weiblichen Geschlecht, als weiterem prädisponierenden Faktor, gab es nicht ( $p=0,305$ ).

Da in bisherigen Verlaufsuntersuchungen hauptsächlich die systolische Funktion und nicht die diastolische Funktion des Herzens kontrolliert wurden, wurden die wichtigen Verlaufsuntersuchungen und die medikamentöse Behandlung aufgrund der guten systolischen Funktion schon oft früh unterbrochen und nicht mehr fortgeführt.

Die bisherige Erkenntnis, dass bei einem Teil der Patienten eine AMC nach und nach zu einer dilatativen Kardiomyopathie und zum Tode führt, wird bestätigt. Bei zwei der Patienten konnte im Verlauf die Entwicklung einer DCM beobachtet werden. Ein Patient musste sich aufgrund einer fortschreitenden Herzinsuffizienz und DCM einer Herztransplantation unterziehen. Außerdem starben zwei der Patienten an Herzversagen nach der AMC.

D'Ambrosio et al<sup>3</sup> beschreiben in ihrer Metaanalyse, dass nach 33 Monaten 21% der AMC-Patienten eine DCM entwickeln. In diesem Review aus dem Jahre 2001 werden 26 Studien, die sich mit diesem Thema befasst haben, miteinander verglichen. Hier wird bei 0 bis 52% der Patienten, bei einem Verlaufsbeobachtungszeitraum von 3 bis 153 Monaten, ein Fortschreiten der AMC zur DCM gezeigt. Die Studien sind aus den Jahren 1966-1997, einer Zeit, in der teilweise die Dallas-Kriterien noch nicht etabliert waren und die Diagnosekriterien nicht dem heutigen wissenschaftlichen Stand entsprechen. So wurden in 10 dieser Studien die Patienten nach klinischen Gesichtspunkten und in 16 Studien nach histologischen Kriterien ausgewählt. Neben den sehr wenig spezifischen und wenig sensitiven diagnostischen Methoden, werden in 8 der Studien Verlaufsbeobachtungszeiträume von nur 3-12 Monaten beschrieben. Bei 16 Studien wurden lediglich 5-20 Patienten eingeschlossen.

Die großen Vorteile der vorliegenden Studie sind, dass die Diagnose der akuten Myokarditis objektivierbar und nach dem neuestem Stand der Wissenschaft gestellt wurde und eine vergleichsweise große Studienpopulation in einer Langzeitstudie über einen Zeitraum von 6 Jahren untersucht wurde. So ist die Aussagekraft im Hinblick auf die tatsächliche Prognose deutlich größer als alle zuvor durchgeführten Studien bezüglich der Langzeitprognose nach AMC.

Am Anfang der Studie haben wir 50 Patienten untersucht, die aufgrund eines akuten Symptombeginns (Angina pectoris, Dyspnoe, Palpitationen, Herzinsuffizienz) in unsere Klinik verwiesen wurden. Bei allen Patienten mit akutem Herzmuskelschaden, bewiesen durch erhöhte Kreatinkinase und Troponin T Werte, wurde eine koronare Herzerkrankung und ein Myokardinfarkt durch eine Koronarangiographie ausgeschlossen. Eine aktive Myokarditis nach den Dallas-Kriterien wurde bei 40%, und ein Virusgenomnachweis im Herzmuskelgewebe wurde bei 70% der EMBs der Patienten gefunden. Immunhistologische Zeichen einer Entzündung wurden bei allen Patienten festgestellt. Somit ist die AMC klinisch und immunhistologisch sicher diagnostiziert worden.

Einen möglichen Grund dafür, dass bei nur 40 % der Patienten eine akute Myokarditis nach den Dallas-Kriterien nachgewiesen werden konnte, liegt vermutlich darin, dass unsere Patienten relativ früh -zum Nachweis möglicherweise zu früh- biopsiert worden sind. Hierdurch sind

histologische Veränderungen in den Biopsaten oft noch nicht sichtbar. Auch aufgrund eines sampling errors, die AMC ist oft ein fokaler Prozess, können die Biopsate einen falsch negativen Befund zeigen.

Bei der Verlaufsuntersuchung wurde eine klinisch manifeste Herzinsuffizienzsymptomatik weiter verifiziert durch den Nachweis eines erhöhten NT-proBNP Wertes, der als objektiver Marker für Patienten mit einer klinischen Symptomatik einer Herzinsuffizienz und HFNEF gilt<sup>78, 85, 86</sup>. Patienten mit einer HFNEF hatten einen 3-mal höheren Plasma pro-N terminal-BNP (pmol/l) Wert ( $p=0,006$ ) als Patienten mit einer normalen LV diastolischen Funktion ohne Symptome einer Herzinsuffizienz in der Nachuntersuchung.

Diese Studie zeigt, dass HFNEF assoziiert ist mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität. Dies spiegelt sich wider in einer hohen Herzinsuffizienzsymptomatiekrate und einer erhöhten Hospitalisationsrate über den 5-jährigen Beobachtungszeitraum. Während des Beobachtungszeitraums wurden 32% (7/22) der HFNEF Patienten aufgrund einer Herzinsuffizienzsymptomatik in einem Krankenhaus aufgenommen. Die durchschnittliche Verweildauer der Wiederaufnahme betrug 7.0 (4.0-8.0) Tage, wobei nur 1 Patient ohne HFNEF wieder aufgenommen werden musste (Verweildauer: 4 Tage). Dies ist in Übereinstimmung mit Studien, die die Morbidität und die Mortalität bei Patienten mit schwerer HFNEF ähnlich hoch beschreiben wie bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz und reduzierter LVEF.<sup>87-90</sup>

Es zeigte sich deutlich, dass viele Patienten mit einer unauffälligen konventionellen Doppleruntersuchung im TDI auffällige pathologische Veränderungen zeigen. Damit kann zugleich die zweite wesentliche Frage der Studie beantwortet werden, ob mit der konventionellen Echokardiographie die Ursache der Herzinsuffizienzsymptomatik gefunden werden kann, oder ob zur Diagnose das „Tissue Doppler Imaging“ erforderlich ist.

Unter alleiniger Verwendung der konventionellen Doppleruntersuchung konnten nicht alle Patienten mit einer HFNEF zuverlässig diagnostiziert werden. Hier zeigt sich die Notwendigkeit spezifischer echokardiographischer Kriterien, um eine HFNEF mit einer diastolischen Dysfunktion zu diagnostizieren. Unsere Studie zeigt, dass bei Patienten, die bei der Nachuntersuchung bei normaler LVEF über eine Herzinsuffizienzsymptomatik klagen, im Unterschied zu den Patienten, die dies nicht tun, pathologisch erhöhte mitrale Flussprofile und erhöhte linksventrikuläre Füllungsindices  $E/E'$  nachweisbar sind. Dies führt zur Diagnose einer HFNEF. Bis heute sind die pathophysiologischen Mechanismen, die zu dieser

Herzinsuffizienzsymptomatik führen, nicht vollständig geklärt. Die diastolische Dysfunktion wird aber als ein Schlüsselmechanismus zur Entwicklung einer HFNEF angesehen.

Unter den Patienten der Untersuchungsgruppe gab es bei der Erstuntersuchung keine statistischen Unterschiede in der diastolischen Funktion, gemessen mit dem konventionellen echokardiographischen Doppler. Eine diastolische Dysfunktion lässt sich allerdings mit den herkömmlichen echokardiographischen Untersuchungen nicht sicher diagnostizieren. Die Spezifität der Einzelparameter der Echokardiographie (IVRT, DT, E, A, E/A) liegt bei nur 40-70 %.<sup>75</sup> Dies spielt bei der initialen Untersuchung aber keine Rolle, da es nur darum geht, die Patienten untereinander zu vergleichen. Eine TDI Untersuchung wurde initial nicht durchgeführt, da das TDI noch nicht etabliert war. Trotzdem suggeriert dieses Ergebnis ganz klar, dass sich bei den HFNEF Patienten die diastolische Dysfunktion in der Zwischenzeit entwickelt hat, was sich möglicherweise auf einen inflammatorischen Prozess zurückführen lässt.

Ein wesentlicher Punkt für gegebenenfalls erforderliche frühzeitige prophylaktische oder therapeutische Maßnahmen zur Vermeidung oder Verringerung einer sich möglicherweise post AMC entwickelnden HFNEF, ist die Frage nach den prognostischen Faktoren für eine mögliche Entwicklung einer HFNEF.

Nach einem jüngst veröffentlichten Artikel von Kindermann et al.<sup>91</sup> ist der immunhistologische Nachweis einer Inflammation entscheidend für die Prognose und könnte die Art und Ausdehnung der Inflammation ein Risikofaktor für die Entwicklung einer HFNEF nach einer AMC sein. Obwohl sich in unserer Studie die anfängliche Entzündungsreaktion bei den untersuchten Patienten nicht unterschied, könnte eine über längere Zeit anhaltende Entzündung, selbst bei einer abgeschwächten Entzündungsreaktion, zu einem signifikant anderen Krankheitsverlauf führen.

Wie in anderen Studien gezeigt werden konnte, führt eine anhaltende Entzündungsreaktion über das „remodelling“ zur DCM und durch unter anderem die erhöhte Fibrose, die erhöhte Kammersteifigkeit und die endotheliale Dysfunktion der Herzmuskulatur zur HFNEF mit diastolischer Herzinsuffizienz.

Für die persistierende myokardiale Entzündungsreaktion gibt es 2 mögliche Ursachen:

1. Das Immunsystem ist nicht in der Lage, das Virus zu eliminieren und damit die Entzündung zu beenden. Selbst bei niedrigen Kopienzahlen des viralen Proteins, kann das Immunsystem anhaltend aktiviert bleiben.
2. Es entsteht eine anti-kardiale-Autoimmunität z.B. durch „molecular mimicry“.<sup>92-96</sup>

„Molecular mimicry“ findet bei genetisch prädisponierten Patienten statt,<sup>97</sup> wenn dem Immunsystem ein Virusprotein präsentiert wird und die darauf folgende Immunreaktion sich nicht nur gegen das Virusantigen, sondern auch gegen kryptische myokardiale Antigene richtet. Ist dies der Fall, so kann die Myokarditis selbst nach eventueller Virusbeseitigung fortschreiten und letztendlich zu einer DCM oder HFNEF führen.

Aktivierte B-Lymphozyten produzieren im Falle eines „molecular mimicry“ Antikörper gegen Myokardantigene. Durch diesen Immunprozess werden wiederum proinflammatorische Zytokine (Interleukin-1, Interleukin-2, Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) freigesetzt, die eine Kardiomyozytenhypertrophie und das „remodelling“ unterhalten.<sup>98-100</sup>

Für eine suffiziente Therapie dieser Patienten, ist die genaue Kenntnis von bioptisch gesicherter Viruspersistenz/ und oder Entzündungsreaktion unabdingbar.

Eine Rebiopsie wurde nicht bei allen Patienten entnommen. Prinzipiell sollte im Verlauf eine Rebiopsie von Patienten mit HFNEF nach AMC zum Ausschluss einer Persistenz der Entzündung erfolgen.<sup>43</sup> So wäre eine mögliche anhaltende Entzündungsreaktion oder eine eventuelle myokardiale Strukturveränderung nachzuweisen.

Der Zuwachs kardialer Fibrose ist eines der gut erforschten Kennzeichen, die sich bei einer experimentellen viralen Myokarditis im Tiermodell finden.<sup>101</sup> Zugleich ist die Fibrosierung ein wichtiger pathophysiologischer Bestandteil der Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion. Diese ist das Ergebnis einer Summe komplexer, verschiedener, zusammenhängender Ereignisse einschließlich einer anhaltenden ventrikulären Relaxation, erhöhter myokardialer Fibrose, erhöhter Kammersteifigkeit und endothelialer Dysfunktion, welche alle zu Leistungseinbußen und Symptomen einer Angina oder Dyspnoe führen.<sup>102-104</sup>

Ebenfalls im Zusammenhang mit der Prognose und den prognostischen Faktoren steht die vierte Frage der Studie, ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen der Myokardinfektion durch bestimmte Viren und der HFNEF-Entwicklung gibt.

Vor dem Hintergrund einer isolierten diastolischen Dysfunktion wird ein großer kausaler Zusammenhang zwischen der B19V-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie und der HFNEF gesehen.<sup>33</sup> Tendenziell bestätigt diese Studie den Zusammenhang einer Parvovirus-B19 Infektion und die Entwicklung einer HFNEF. Bei zwölf der HFNEF Patienten und bei neun der nicht HFNEF Patienten konnte eine myokardiale B19V Infektion nachgewiesen werden. Dennoch waren in dieser Studie bei der Erstuntersuchung keine signifikanten Unterschiede bezüglich der viralen Genome bei den Patienten mit oder ohne HFNEF-Entwicklung im Verlauf feststellbar. Die Schlussfolgerung, dass aus diesem Grund anhand von gefundenen viralen

Genomen nicht unbedingt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer HFNEF vorhergesagt werden kann, wäre aufgrund der Limitation der kleinen Studienpopulation nicht richtig. Bei einem großen Teil der Studienpopulation wurde allerdings die Viruslast nicht bestimmt und deshalb auch nicht in dieser Studie berücksichtigt. Die Viruslast könnte Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Weitere Untersuchungen bezüglich der Viruslast bei Patienten mit diastolischer Dysfunktion sind erforderlich, um die Frage nach einer virusassoziierten Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion zu klären.

Zuletzt ist die Frage nach einem möglichen Zusammenhang der medikamentösen Therapie post AMC mit der weiteren Prognose zu erörtern.

Der Großteil der Patienten dieser Studie hat bei Krankheitsbeginn eine symptomatische Herzinsuffizienztherapie gemäß den Richtlinien der WHO erhalten. Die Herzinsuffizienzmedikation wurde vom Großteil der Patienten bis zur Verlaufsuntersuchung weiter genommen. Eine antivirale oder immunmodulierende Therapie hat keiner erhalten. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Medikation und der Entwicklung einer HFNEF konnte nicht gezeigt werden. Diese Studie war allerdings auch nicht darauf ausgerichtet, Aussagen bezüglich der Therapie zu machen. Dafür wären weitere Studien mit genauer Überwachung der medikamentösen Therapie erforderlich.

Trotzdem können auf Basis der Ergebnisse dieser Studie, nämlich dass die AMC zu einer diastolischen Herzinsuffizienz führen kann, und aufgrund der bereits vorliegenden wissenschaftlichen Erkenntnisse zur medikamentösen Prophylaxe und Therapie einer diastolischen Herzinsuffizienz Grundlagen für künftige Untersuchungen diskutiert werden.

Die möglicherweise anhaltende Entzündungsreaktion nach einer AMC kann zu einem langsamen, aber fortschreitenden, pro-fibrotischen Prozess führen, welcher mit der Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion assoziiert ist. Dies zeigt, wie wichtig es sein könnte, eine medikamentöse Herzinsuffizienztherapie mit einer antifibrotischen myokardialen Wirkung (z.B. ACE-Hemmer, Carvedilol) auch bei wieder intakter LVEF fortzusetzen und diese erst zu beenden, wenn keine myokardialen Entzündungszeichen mehr nachweisbar sind.

Eine Übersichtsarbeit von Studien der vergangenen 30 Jahre aus dem Jahre 2010 von Paulus et al.<sup>34</sup> bezüglich der medikamentösen Therapie bei Patienten mit einer diagnostizierten HFNEF zeigt, dass die Therapie mit ACE-Hemmern, AT-II- Rezeptorblockern und Beta-Blockern keine Prognoseverbesserung wie bei einer HFREF zu bringen scheint. Diese Schlussfolgerung sollte aufgrund der in einem Teil der Studien nicht angewandten anerkannten Richtlinien zur HFNEF Diagnostik<sup>77</sup> in weiteren Studien hinterfragt werden. Darin sollten die nach den Richtlinien

identifizierten HFNEF Patienten in Gruppen eingeteilt werden, welche die Ursache der HFNEF berücksichtigen. Die Prophylaxe einer HFNEF nach AMC oder die Therapie einer HFNEF nach AMC wird möglicherweise ein anderes medikamentöses Vorgehen erfordern als eine HFNEF bei Diabetes mellitus und Adipositas.

Zusammenfassend präsentiert die hier vorgelegte Studie zum ersten Mal Beweise, dass knapp 50% der Patienten Jahre nach einer AMC immer noch an einer Herzinsuffizienzsymptomatik leiden. Diese Patientengruppe hat eine isolierte diastolische Dysfunktion entwickelt. Die genauen pathologischen Mechanismen erfordern weitere Studien. Unsere Daten legen obligatorische Nachuntersuchungen und die Behandlung diastolischer Dysfunktionen bei allen Patienten vom Zeitpunkt der Diagnose einer AMC an nahe, da eine langfristige pathologische Entwicklung nicht ausgeschlossen werden kann.

Das wesentliche Ergebnis dieser Studie ist, dass eine erlittene AMC der Auslöser für die Entwicklung einer HFNEF sein kann, und dass dies unabhängig ist von den klassischen Risikofaktoren für diese Erkrankung. Es wird notwendig sein, die bereits bestehenden Empfehlungen für die Nachbehandlung einer AMC zu bekräftigen oder sogar neue Empfehlungen zu erarbeiten.

So könnte in Zukunft eine enge Überwachung der myokardialen Entzündungsreaktion mittels CMR und der diastolischen Funktion mittels TDI über mehrere Jahre eine Möglichkeit sein, die Entwicklung einer HFNEF frühzeitig zu erkennen und richtig zu behandeln. Zudem sollte künftig der Fokus der behandelnden Ärzte, neben der möglichen Entwicklung einer DCM mit eingeschränkter LVEF, gleichermaßen auf die mögliche Entwicklung einer HFNEF mit diastolischer Dysfunktion gerichtet sein.

## Methodische Einschränkungen der Studie

Aufgrund der relativ geringen Anzahl an Patienten, die aufgrund einer AMC im Krankenhaus behandelt werden, war eine Rekrutierung einer größeren Studienpopulation nicht möglich. Die Teilnehmerzahl von 50 Studienteilnehmern schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse teilweise ein. Trotzdem konnten wesentliche Punkte der Studie statistisch gesichert beschrieben werden. Im Vergleich zu ähnlichen, zuvor genannten Studien bezüglich der Prognose nach AMC ist diese Studienpopulation eine der größten bisher. Eine Kontrollgruppe nicht an AMC erkrankter Patienten gab es nicht. Es ist eine nicht randomisierte retrospektive Studie. Dies schmälert die Aussage unserer Studie allerdings nur unwesentlich, da die Anzahl der Patienten die eine diastolische Herzinsuffizienz entwickelt hat im Vergleich zur Normalbevölkerung, so wie diese in vielen Studien beschrieben ist,<sup>31, 32</sup> deutlich erhöht ist.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol.* Aug 6 2003;42(3):466-472.
2. Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation.* Sep 27 2005;112(13):1965-1970.
3. D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart.* 2001;85(5):499-504.
4. Pauschinger M, Noutsias M, Lassner D, Schultheiss HP, Kuehl U. Inflammation, ECG changes and pericardial effusion : Whom to biopsy in suspected myocarditis? *Clin Res Cardiol.* Aug 16 2006.
5. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation.* 2001;104(9):1076-1082.
6. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med.* Nov 9 2000;343(19):1388-1398.
7. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.* Apr 11 2006;113(14):1807-1816.
8. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation.* 1996;93(5):841-842.
9. Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, Lev B, Fisman EZ, Pines A, Kramer MR. Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol.* Nov 15 1991;68(13):1388-1392.

10. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;342(15):1077-1084.
11. Lauer B, Niederau C, Kuhl U, Schannwell M, Pauschinger M, Strauer BE, Schultheiss HP. Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(5):1354-1359.
12. Dec GW, Jr., Waldman H, Southern J, Fallon JT, Hutter AM, Jr., Palacios I. Viral myocarditis mimicking acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1992;20(1):85-89.
13. Olbrich HG. [Epidemiology-etiology of dilated cardiomyopathy]. *Z Kardiol.* 2001;90 Suppl 1:2-9.
14. Archard LC, Khan MA, Soteriou BA, Zhang H, Why HJ, Robinson NM, Richardson PJ. Characterization of Coxsackie B virus RNA in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy by nucleotide sequencing of reverse transcription-nested polymerase chain reaction products. *Hum Pathol.* 1998;29(6):578-584.
15. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation.* Feb 22 2005;111(7):887-893.
16. Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S. Dilated cardiomyopathy associated with hepatitis C virus infection. *Circulation.* Nov 1 1995;92(9):2519-2525.
17. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kuhl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Towbin JA. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation.* 1999;99(10):1348-1354.
18. Pauschinger M, Doerner A, Kuehl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation.* 1999;99(7):889-895.
19. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1994;89(6):2582-2589.

20. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation*. 1999;99(21):2750-2756.
21. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med*. 1995;333(5):269-275.
22. McCarthy RE, 3rd, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Hare JM, Baughman KL. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med*. 2000;342(10):690-695.
23. Aoyama N, Izumi T, Hiramori K, Isobe M, Kawana M, Hiroe M, Hishida H, Kitaura Y, Imaizumi T. National survey of fulminant myocarditis in Japan: therapeutic guidelines and long-term prognosis of using percutaneous cardiopulmonary support for fulminant myocarditis (special report from a scientific committee). *Circ J*. Feb 2002;66(2):133-144.
24. Sinagra G, Maras P, D'Ambrosio A, Gregori D, Bussani R, Silvestri F, Morgera T, Pinamonti B, Salvi A, Alberti E, Di Lenarda A, Lardieri G, Klugmann S, Camerini F. [Clinical polymorphic presentation and natural history of active myocarditis: experience in 60 cases]. *G Ital Cardiol*. 1997;27(8):758-774.
25. Fenoglio JJ, Ursell PC, Kellogg CF, Drusin RE, Weiss MB. Diagnosis and classification of myocarditis by endomyocardial biopsy. *N Engl J Med*. 1983;308(1):12-18.
26. Stiller B, Dahnert I, Weng YG, Hennig E, Hetzer R, Lange PE. Children may survive severe myocarditis with prolonged use of biventricular assist devices. *Heart*. Aug 1999;82(2):237-240.
27. Burch GE DPN. Viral myocarditis. Churchill JA, ed: *Cardiomyopathies*. London: Churchill, 1964; 99-115.
28. Sole MJ, Liu P. Viral myocarditis: a paradigm for understanding the pathogenesis and treatment of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22(4 Suppl A):99A-105A.
29. Matsumori A, Kawai C. An animal model of congestive (dilated) cardiomyopathy: dilatation and hypertrophy of the heart in the chronic stage in DBA/2 mice with myocarditis caused by encephalomyocarditis virus. *Circulation*. Aug 1982;66(2):355-360.
30. Hasenfuss G PB, Department of Cardiology and Pneumology UoG, Robert-Koch-Strasse 40, 37075 Göttingen, Germany. hasenfus@med.uni-goettingen.de. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Aug;34(8):951-69. 2002.

31. Fonarow GC, Stough WG, Abraham WT, Albert NM, Gheorghiade M, Greenberg BH, O'Connor CM, Sun JL, Yancy CW, Young JB. Characteristics, Treatments, and Outcomes of Patients With Preserved Systolic Function Hospitalized for Heart Failure: A Report From the OPTIMIZE-HF Registry. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(8):768-777.
32. Tschöpe C, Westermann D. Heart Failure with Normal Ejection Fraction. *Herz*. 2009;34(2):89-96.
33. Tschöpe C, Bock CT, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck PL, Pauschinger M, Poller WC, Kuhl U, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation*. Feb 22 2005;111(7):879-886.
34. Paulus WJ, van Ballegoij JJM. Treatment of Heart Failure With Normal Ejection Fraction: An Inconvenient Truth! *Journal of the American College of Cardiology*. 55(6):526-537.
35. Strauer BE, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Figulla HR, Schwartzkopff B, Brehm M, Schultheiss HP. Update 2001. Myocarditis--cardiomyopathy. *Med Klin*. 2001;96(10):608-625.
36. Hennersdorf MG, Perings C, Niebch V, Vester EG, Strauer BE. T wave alternans as a risk predictor in patients with cardiomyopathy and mild-to-moderate heart failure. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2000;23(9):1386-1391.
37. Schannwell CM, Schoebel FC, Marx R, Plehn G, Leschke M, Strauer BE. [Prognostic relevance of left ventricular diastolic function parameters in dilated cardiomyopathy]. *Z Kardiol*. 2001;90(4):269-279.
38. Nelson KH, Li T, Afonso L. Diagnostic Approach and Role of MRI in the Assessment of Acute Myocarditis. *Cardiol Rev*. Vol 17; 2009:24-30.
39. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, Meinhardt G, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Fritz P, Klingel K, Kandolf R, Sehtem U. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology. *Circulation*. Mar 16 2004;109(10):1250-1258.
40. Skouri HN, Dec GW, Friedrich MG, Cooper LT. Noninvasive Imaging in Myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(10):2085-2093.
41. Sakakibara S, Konno S. Endomyocardial biopsy. *Jpn Heart J*. Nov 1962;3:537-543.
42. H.P. Schultheiss und U. Köhl. Medizinische Klinik II KuP, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin Stand der

Diagnostik und Therapie der inflammatorischen Kardiomyopathie. *Der Internist Verlag Springer Berlin / Heidelberg ISSN 0020-9554 (Print) 1432-1289 (Online) Heft Volume 49, Number 1 / Januar 2008 Kategorie Schwerpunkt: Entzündliche Herzerkrankunge. DOI 10.1007/s00108-007-1966-y* 2008:Seiten 7-16

43. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology*. Nov 6 2007;50(19):1914-1931.
44. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol*. 1987;18(6):619-624.
45. Strauer BE, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Schwartzkopff B, Schultheiss HP. Myocarditis--cardiomyopathy. Consensus Report of the German Association for Internal Medicine, presented at the 100th annual meeting, Wiesbaden, 13 April 1994. *Acta Cardiol*. 1996;51(4):347-371.
46. Kuhl U, Seeberg B, Schultheiss HP, Strauer BE. Immunohistological characterization of infiltrating lymphocytes in biopsies of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1994;15(Suppl C):62-67.
47. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B, Schannwell M, Welp LB, Schultheiss HP. Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*. 1994;1(1):13-25.
48. Kuhl U, Noutsias M, Schultheiss HP. The Role of Immune Mechanisms in Cardiovascular Disease. Chapter: *Immunohistochemical Analysis of Inflammatory Heart Disease*. pages 101-121. Berlin: Springer-Verlag; 1997.
49. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart*. 1996;75(3):295-300.
50. Mahon NG, Madden BP, Caforio AL, Elliott PM, Haven AJ, Keogh BE, Davies MJ, McKenna WJ. Immunohistologic evidence of myocardial disease in apparently healthy relatives of patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(3):455-462.
51. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wodniecki J, Szczurek-Katanski K, Nozynski J, Zembala M, Rozek MM. Immunohistological diagnosis of myocarditis. Potential role of

- sarcolemmal induction of the MHC and ICAM-1 in the detection of autoimmune mediated myocyte injury. *Eur Heart J*. 1998;19(10):1564-1572.
52. Ino T, Kishiro M, Okubo M, Akimoto K, Nishimoto K, Yabuta K, Okada R. Late persistent expressions of ICAM-1 and VCAM-1 on myocardial tissue in children with lymphocytic myocarditis. *Cardiovasc Res*. 1997;34(2):323-328.
  53. Tazelaar HD, Billingham ME. Leukocytic infiltrates in idiopathic dilated cardiomyopathy. A source of confusion with active myocarditis. *Am J Surg Pathol*. 1986;10(6):405-412.
  54. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kuhl U. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;99(16):2124-2131.
  55. Noutsias M, Pauschinger M, Ostermann K, Escher F, Blohm JH, Schultheiss H, Kuhl U. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit*. May 2002;8(5):MT59-71.
  56. Herskowitz A, Ahmed-Ansari A, Neumann DA, Beschorner WE, Rose NR, Soule LM, Burek CL, Sell KW, Baughman KL. Induction of major histocompatibility complex antigens within the myocardium of patients with active myocarditis: a nonhistologic marker of myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(3):624-632.
  57. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM, Wodniecki J. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation*. Jul 3 2001;104(1):39-45.
  58. Kuhl U, Pauschinger M, Schultheiss HP. [New concepts in the diagnosis of inflammatory myocardial disease]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1997;122(21):690-698.
  59. Kuhl U, Pauschinger M, Schultheiss HP. [Etiopathogenetic differentiation of inflammatory cardiomyopathy. Immunosuppression and immunomodulation]. *Internist (Berl)*. 1997;38(6):590-601.
  60. Parrillo JE. Inflammatory cardiomyopathy (myocarditis) : which patients should be treated with anti-inflammatory therapy? *Circulation*. 2001;104(1):4-6.
  61. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archard LC. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1986;1(8490):1120-1123.
  62. Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, Hirono S, Okura Y, Kato K, Hotta Y, Honda T, Kuwano R, Aizawa Y. Expression of coxsackievirus and

- adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res.* 2000;86(3):275-280.
63. Heim A, Grumbach I, Pring-Akerblom P, Stille-Siegener M, Muller G, Kandolf R, Figulla HR. Inhibition of coxsackievirus B3 carrier state infection of cultured human myocardial fibroblasts by ribavirin and human natural interferon-alpha. *Antiviral Res.* 1997;34(3):101-111.
  64. Kuhl U, Schultheiss HP. Treatment of chronic myocarditis with corticosteroids. *Eur Heart J.* 1995;16(Suppl O):168-172.
  65. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation.* Feb 18 2003;107(6):857-863.
  66. Kuhl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation.* Jun 10 2003;107(22):2793-2798.
  67. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. *Circulation.* Nov 6 2007;116(19):2216-2233.
  68. Kasner M, Westermann D, Steendijk P, Gaub R, Wilkenshoff U, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Schultheiss H-P, Pauschinger M, Tschope C. Utility of Doppler Echocardiography and Tissue Doppler Imaging in the Estimation of Diastolic Function in Heart Failure With Normal Ejection Fraction: A Comparative Doppler-Conductance Catheterization Study. *Circulation.* Vol 116; 2007:637-647.
  69. Authors/Task Force M, Swedberg K, Writing C, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Other C, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A, Jaarsma T, Korewicki J, Levy S, Linde C, Lopez-Sendon J-L, Nieminen MS, Pierard L, Remme WJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Soc. of Cardiology. *Eur.HeartJ.* Vol 26; 2005:1115-1140.
  70. Sinning DL. *Tissue Doppler Imaging, Strain Rate und Strain bei Patienten mit Herzinsuffizienzsymptomen trotz normaler Ejektionsfraktion – Diastolische und*

*systolische Funktion gemessen mittels Konduktanzkathetermethode und Echokardiographie.* Dissertation. Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Medizinischen Fakultät, Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2009.

71. Schiller NB SP, Crawford M et al. . Recommendations for quantification of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989;2:358-367.
72. Mc Diken WN SG, Moran CM, Gordon LN. Colour Doppler velocity imaging of the myocardium. *Ultrasound Med Biol.* 1992;18:651-654.
73. Isaaq K TA, Ethevenot G, Cloez JL, Brembilla B, Pernot C. . Doppler echocardiographic measurement of low velocity motion of the left ventricular posterior wall. *Am J Cardiol.* 1989; 64:66-75.
74. Miyatake K YM, Tanaka N et al. New method for evaluating left ventricular wall motion by color-coded tissue Doppler imaging: in vitro and in vivo studies. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25:717-724.
75. Michael R. Zile MWHG, MD; John D. Carroll, MD; Marc D. Feldman, MD; Gerard P. Aurigemma, MD; Gary L. Schaer, MD; Jalal K. Ghali, MD; Philip R. Liebson, MD Heart Failure With a Normal Ejection Fraction Is Measurement of Diastolic Function Necessary to Make the Diagnosis of Diastolic Heart Failure? . *Circulation.* 2001 Aug 14;104(7):779-82. 2001.
76. Ommen SR NR, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, Tajik AJ. Division of Cardiovascular Diseases, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA. Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation.* 2000 Oct 10;102(15):1788-94. *Links.* 2000.
77. Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbely A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur.HeartJ.* Vol 28; 2007:2539-2550.
78. Tschope C, Kasner M, Westermann D, Gaub R, Poller WC, Schultheiss H-P. The role of NT-proBNP in the diagnostics of isolated diastolic dysfunction: correlation with echocardiographic and invasive measurements. *Eur.HeartJ.* Vol 26; 2005:2277-2284.

79. Noutsias M. *Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Immunglobulin-Superfamilie, CAR, NCAM, Selektine,  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Integrine) und phänotypische Charakterisierung von immunkompetenten Infiltraten bei dilatativer Kardiomyopathie – Implikationen für die Pathogenese und immunhistologische Diagnose der inflammatorischen Kardiomyopathie* [Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin ]. Berlin: Kardiologie, Frei Universität Berlin; 2003.
80. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1987;1(1):3-14.
81. Escher F, Kuhl U, Lassner D, Suckau L, Kuhl U, Lassner D, Poller W, Schultheiss HP, Noutsias M. Immunohistological Detection of Parvovirus B19 Capsid Proteins in Endomyocardial Biopsies from Dilated Cardiomyopathy Patients. *MedSciMonit.* 2008;14(6):CR333-338.
82. Friedrich MG SU, Schulz-Menger J, et al. . Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: a JACC White Paper. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1475-87. 2009.
83. Klapholz M, Maurer M, Lowe AM, Messineo F, Meisner JS, Mitchell J, Kalman J, Phillips RA, Steingart R, Brown EJ, Jr., Berkowitz R, Moskowitz R, Soni A, Mancini D, Bijou R, Sehhat K, Varshneya N, Kukin M, Katz SD, Sleeper LA, Le Jemtel TH. Hospitalization for heart failure in the presence of a normal left ventricular ejection fraction: results of the New York Heart Failure Registry. *J Am Coll Cardiol.* Apr 21 2004;43(8):1432-1438.
84. Fischer M, Baessler A, Hense HW, Hengstenberg C, Muscholl M, Holmer S, Doring A, Broeckel U, Riegger G, Schunkert H. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community: Results from a Doppler echocardiographic-based survey of a population sample. *Eur.HeartJ.* Vol 24; 2003:320-328.
85. Tschöpe C, Kasner M, Westermann D, Walther T, Gaub R, Poller WC, Schultheiss H-P. Elevated NT-ProBNP Levels in Patients With Increased Left Ventricular Filling Pressure During Exercise Despite Preserved Systolic Function. *Journal of Cardiac Failure.* 2005;11(5, Supplement 1):S28-S33.
86. Watanabe S, Shite J, Takaoka H, Shinke T, Imuro Y, Ozawa T, Otake H, Matsumoto D, Ogasawara D, Paredes OL, Yokoyama M. Myocardial stiffness is an important determinant of the plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with both diastolic and systolic heart failure. *Eur.HeartJ.* Vol 27; 2006:832-838.

87. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. Jul 20 2006;355(3):251-259.
88. Vasani RS, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, clinical features and prognosis of diastolic heart failure: an epidemiologic perspective. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26(7):1565-1574.
89. Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, Gong Y, Liu PP. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med*. Jul 20 2006;355(3):260-269.
90. Schaefer A, Meyer GP, Fuchs M, Klein G, Kaplan M, Wollert KC, Drexler H. Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial. *Eur Heart J*. Vol 27; 2006:929-935.
91. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M. Predictors of Outcome in Patients With Suspected Myocarditis. *Circulation*. Vol 118; 2008:639-648.
92. Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM, McManus BM, Fischetti VA, Gauntt CJ. Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses, and human cardiac myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(4):1320-1324.
93. Huber S, Polgar J, Moraska A, Cunningham M, Schwimbeck P, Schultheiss P. T lymphocyte responses in CVB3-induced murine myocarditis. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1993;88:67-78.
94. Huber SA, Cunningham MW. Streptococcal M protein peptide with similarity to myosin induces CD4+ T cell-dependent myocarditis in MRL/++ mice and induces partial tolerance against coxsackieviral myocarditis. *J Immunol*. 1996;156(9):3528-3534.
95. Malkiel S, Liao L, Cunningham MW, Diamond B. T-Cell-dependent antibody response to the dominant epitope of streptococcal polysaccharide, N-acetyl-glucosamine, is cross-reactive with cardiac myosin [In Process Citation]. *Infect Immun*. 2000;68(10):5803-5808.
96. Penninger JM, Bachmaier K. Review of microbial infections and the immune response to cardiac antigens. *J Infect Dis*. 2000;181(Suppl 3):S498-504.
97. McKenna CJ, Codd MB, McCann HA, Sugrue DD. Idiopathic dilated cardiomyopathy: familial prevalence and HLA distribution. *Heart*. 1997;77(6):549-552.
98. Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, Tannhauser R, Kuhl U, Schultheiss HP. Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated

- cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. *Cardiovasc Res.* 1998;37(1):123-129.
- 99.** Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation.* 1996;94(11):2930-2937.
- 100.** Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res.* 1991;69(2):483-490.
- 101.** Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, Kallwellis-Opara A, Rutschow S, Swinnen M, Vanhoutte D, Gao F, Torpai R, Baker AH, Padalko E, Neyts J, Schultheiss HP, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis. *Circulation.* Aug 8 2006;114(6):565-573.
- 102.** Westermann D, Kasner M, Steendijk P, Spillmann F, Riad A, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss H-P, Tschope C. Role of Left Ventricular Stiffness in Heart Failure With Normal Ejection Fraction. *Circulation.* Vol 117; 2008:2051-2060.
- 103.** Zile MR, Brutsaert DL. New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure: Part II: Causal Mechanisms and Treatment. *Circulation.* Vol 105; 2002:1503-1508.
- 104.** van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JGF, Diamant M, Borbely A, van der Velden J, Stienen GJM, Laarman GJ, Niessen HWM, Paulus WJ. Diastolic Stiffness of the Failing Diabetic Heart: Importance of Fibrosis, Advanced Glycation End Products, and Myocyte Resting Tension. *Circulation.* Vol 117; 2008:43-51.

## 9. Anhang

### 9.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johannes Pronk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion im Langzeitverlauf der Akuten Myokarditis selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 9.2 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Johannes Pronk hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Escher F WD, Gaub R, Pronk J, Bock T, Al-Saadi N, Kühl U, Schultheiss HP, Tschöpe C. Charité-University Medicine Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany. Development of diastolic heart failure in a 6-year follow-up study in patients after acute myocarditis. *Heart*. 2010 Dec 5.2010.

Beitrag im Einzelnen:

Nachschau der Krankenakten, Patientenrekrutierung, Patientenbefragung/ Anamnese, Durchführung des Tissuedoppler mit Fachärztin und Auswertung des Tissuedoppler, Auswertungen der Ergebnisse, Mitarbeit bei der Anfertigung der Statistik, Literaturrecherche

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

### **9.3 Lebenslauf**

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



#### 9.4 Publikationsliste

Escher F WD, Gaub R, Pronk J, Bock T, Al-Saadi N, Kühl U, Schultheiss HP, Tschöpe C. Charité-University Medicine Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany. Development of diastolic heart failure in a 6-year follow-up study in patients after acute myocarditis. *Heart*. 2010 Dec 5.2010.

Pronk J, Jekat R, Scheller EE (Berlin). Case report eines vom Weichteilmanagements komplizierten Verlaufes eines Kompartmentsyndrom am Unterschenkel nach Knie-TEP. 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie – DGPW Leipzig 2010

Möbius B, Pronk J, Scheller EE. Grenzen der Weichteilrekonstruktion am Kniegelenk bei liegender Knie-TEP oder Arthrodeese M0159. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie (DGPW); Ulm; 20111006-20111008

Möbius B, Pronk J, Scheller EE. Erfahrungen mit der Einführung eines Screeningverfahrens zur Indikationsstellung für ein CCT bei Schädel-Hirn-Traumen in einem Haus der Grund- und Regelversorgung M0159; 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie (DGPW); Ulm; 20111006-20111008

Möbius B, Scheller EE, Pronk J. Die Ellenbogenprothese nach erfolgloser Osteosynthese bei distaler Humerustrümmerfraktur M0159; 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie (DGPW); Deutsche Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie; Ulm; 20111006-20111008

Pronk J, Möbius B, Scheller EE (Berlin). CCT bei Schädelhirntraume unter Berücksichtigung des CHIP-Scores in einem Haus der Grund- und Regelversorgung. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie – DGPW Berlin 2013

Pronk J, Möbius B, Scheller EE (Berlin). Case Report : Humerusersatzprothese mit Inverse-Shoulder-TEP und Ellenbogenprothesenwechsel bei Ellenbogenprothesenlockerung. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie – DGPW Berlin 2013

## **9.5 Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt hochachtungsvoll Herrn Prof. Dr. Carsten Tschöpe für die freundliche Überlassung des thematischen Promotionsrahmens.

Für die hervorragende Förderung und Unterstützung der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Tschöpe, Herrn Prof. Dr. Pauschinger, Frau Dr. Escher, Frau Dr. Gaub, Herrn Dr. Noutsias und allen anderen Mitarbeitern der Klinik mit denen ich bei dieser Forschung zusammengearbeitet habe.

Insbesondere danke ich meinen Eltern und meinen Großeltern, die es mir ermöglicht haben diesen Weg zu gehen. Nicht zuletzt danke ich meinem Bruder, der zu jeder Zeit für mich der beste Freund und Unterstützer ist.