

## **4. Diskussion**

### **4.1 Der methodische Ansatz**

Bisherige Befunde über Veränderungen der EZM wurden hauptsächlich in tierexperimentellen Studien erhoben. Studien an Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurden vornehmlich an explantierten Herzen gewonnen. Dadurch ist der Erkenntnisgewinn auf das Endstadium der Erkrankung beschränkt. Erst durch die Bearbeitung endomyokardialer Biopsien ist die Erfassung von Zwischenstadien der DCM möglich. Diese Ausdehnung des zeitlichen Fensters ermöglicht die exakte Erforschung der Ätiopathogenese der Erkrankung und bietet eine Grundlage für mögliche kausale Therapieansätze. Die Verwendung endomyokardialer Biopsien bringt allerdings eine Beschränkung in der Materialmenge mit sich, so dass nur eine begrenzte Anzahl von methodischen Ansätzen realisiert werden konnte.

Die Charakterisierung des Patientenkollektivs ist eine weit verbreitete Methode. In der vorliegenden Studie konnten neben den etablierten Größen zu Demographie, Anamnese, Klinik und Medikation auch auf weitere Parameter zurückgegriffen werden, die im Rahmen der invasiven Diagnostik routinemäßig erhoben wurden. So konnten die Studienergebnisse zu histologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Daten in Beziehung gesetzt und die Relevanz der Ergebnisse für die hämodynamische Gesamtsituation durch die Daten der Herzkatheteruntersuchungen eingeschätzt werden.

Für die Messung der Enzymexpression wurde die molekularbiologische Methode der RT-PCR verwendet, durch die sich die Menge an mRNA im Gewebe quantifizieren lässt. Die RT-PCR ist eine etablierte Methode zur Erfassung von Enzymregulationen (Carding, Lu & Bottomly, 1992) und wurde vielfach auch zur Messung der matrixregulierenden Enzyme verwendet (Li et al., 2002; Pauschinger et al., 1998; Li et al. 2002). Zur Reduktion der Störvarianz wurde die Menge des jeweilig gemessenen Enzyms an der Expression von  $\beta$ Actin relativiert. Einschränkend muss auf die Anfälligkeit der RT-PCR durch die Kontamination mit RNasen hingewiesen werden. Deshalb wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich RNase freie Reagenzien und Materialien benutzt. Durch die Verwendung endomyokardialer Biopsien ist die Messung der mRNA Menge nur an einer beschränkten Materialmenge

möglich. Als Alternative zur semiquantitativen RT-PCR ist die Methode der Real Time PCR zu nennen. Diese Methode könnte bedingt durch ihre höhere Spezifität und exaktere Messgenauigkeit eine stärkere Ausbeute der mRNA Menge zu lassen, wodurch eventuell Unterschiede zwischen den Gruppen noch deutlicher herausarbeiten werden könnten. Dies ist bei geringen Materialmengen besonders relevant.

Um die Bedeutung der Regulation der matrixdegradierenden Enzyme auf mRNA Ebene für die zelluläre Funktion und Integrität zu erfassen, könnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie durch Analysen auf Proteinebene ergänzt werden. So wäre es möglich, durch Western Blot Verfahren zu quantifizieren, wie sich die Dysregulation des MMP/TIMP-Systems auf transkriptioneller Ebene auf translationaler Ebene, also auf die tatsächlich in der Zelle vorhandenen Enzyme auswirkt.

Ein weiter Schritt für die Analyse des MMP/TIMP-Systems könnte in der Anwendung der Zymographie liegen. Mit dieser Methode kann die Aktivität der Proteasen bestimmt werden, so dass damit eine Aussage auf posttranslationaler Ebene über den Funktionszustand der Zelle möglich wäre (Lantz & Ciborowski, 1994).

## **4.2 Ergebnisse der Vorstudie**

### **4.2.1 Das Patientenkollektiv**

Die Vorstudie diente der Erfassung des Sampling Errors und damit der Validierung der angestrebten Methode. Dafür ist eine Vergleichbarkeit der Patientenkollektive der Vorstudie und der Studie unabdingbar. Die statistische Analyse der Daten zur Beschreibung der Patientenkollektive der Vorstudie und der Studie ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich demographischer, anamnestischer, funktioneller oder morphologischer Parameter. Zwar zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Virusnachweises, allerdings bei sonst nicht signifikanter Differenz der histomorphologischen und immunhistologischen Auswertung des endomyokardialen Gewebes. Demnach konnte eine relevante Unterschiedlichkeit bezüglich der histomorphologischer oder inflammatorischer Veränderung

beider Kollektive nicht festgestellt werden. So konnte das Patientenkollektiv der Vorstudie als repräsentativ für die in die Studie eingeschlossenen Patienten gewertet werden. Erkenntnisse aus der Vorstudie konnten damit bei bestehender Vergleichbarkeit der Patientenkollektive auf die Studie übertragen werden.

#### **4.2.2 Der Sampling Error**

Die explorative Analyse der Daten zur Erfassung des Sampling Errors durch die Messung der mRNA Menge von TIMP-4 relativiert an  $\beta$ Actin von sechs Gewebeproben eines Zeitpunktes pro Patienten ergab eine mittlere prozentuale Abweichung, die von 10,60% bis 30,64% streute. Die über alle Patienten der Vorstudie ermittelte mittlere prozentuale Abweichung lag bei 16,19%. Damit lag der Sampling Error für die hier vorgestellte Methode zur Messung der mRNA Menge von myokardialen Enzymen in endomyokardialen Gewebeproben in tolerablen Grenzen. Somit konnte die Messung der mRNA Menge an zwei Biopsien pro Patient in Hinblick auf die Repräsentativität dieser Biopsien für die myokardiale Funktionsstörung durch die Bestimmung des Sampling Errors abgesichert werden.

Einschränkend muss allerdings der große Range der Werte betrachtet werden. So streute die prozentuale Abweichung der Einzelwerte von 0,76% bis 48,53%. Insbesondere bei kleinen Gruppengrößen können sich bei einer solchen Streuung der Daten stichprobenbedingte Verzerrungen der beobachteten Werte ergeben.

### **4.3 Ergebnisse der Studie**

#### **4.3.1 Das Patientenkollektiv**

Das Patientenkollektiv wurde aufgrund einer Vielzahl von etablierten Parametern wie demographischen, anamnestischen, hämodynamischen, histologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Werten charakterisiert. Zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe DCM, bestehend aus den Gruppen idDCM und infDCM, zeigten sich einige relevante Differenzen. So wurden die Gruppen verschieden medikamentös therapiert, was sich aus den

bestehenden Unterschieden in der Ejektionsfraktion erklären lässt. Bei den Patienten der Gruppe DCM wurde demnach überwiegend eine Herzinsuffizienztherapie mit  $\beta$ -Blockern, Digitalis, Diuretika, ACE-Hemmern und Spironolacton durchgeführt. Die Behandlung der Kontrollgruppe mit  $\beta$ -Blockern und ACE-Hemmern erklärt sich aus der lokoregionalen linksventrikulären Funktionsstörung innerhalb dieser Gruppe. Entsprechend der Unterschiede in der Ejektionsfraktion differierten die Werte aus dem Echo und der RNV. Dies entsprach einer schlechten Pumpfunktion des linken Ventrikels einhergehend mit einer Kardiomegalie. Die übrigen hämodynamischen Parameter wie HZV oder CI zeigten keine relevanten Unterschiede, was durch die suffiziente Medikation der Gruppe DCM erklärt werden kann. Die Fibrose war bei den Patienten mit einer DCM stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Dies entspricht einer mit einer DCM einhergehenden Zunahme des Kollagengehaltes der myokardialen Textur. In den weiteren histologischen und immunhistologischen Parametern konnten allerdings keine Unterschiede verzeichnet werden, da die Gruppe DCM gleichermaßen Biopsien mit und ohne Inflammation subsumierte.

Für die Gruppen idDCM und infDCM lässt sich festhalten, dass sich diese beiden Gruppen weder bezüglich wichtiger demographischer noch anamnestischer oder hämodynamischer Parameter wesentlich unterschieden. Auch bezüglich der Pharmakotherapie und der Symptome konnten keine relevante Differenz festgestellt werden. Da diese Faktoren einen möglichen Einfluss auf die matrixregulierenden Enzyme haben, ist die Konstanthaltung dieser Faktoren unabdingbar. Da das RAAS-System einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der EZM hat (Brilla et al., 1995; Grimm et al., 1998), ist darauf hinzuweisen, dass auch die Therapie mit ACE-Hemmern und Spironolactonen zwischen den Gruppen keine statistisch bedeutsame Differenz aufzeigen konnte. Auch der mechanische Stretch ist an der Modulation der EZM beteiligt. Alle Parameter, die den mechanischen Stretch quantifizieren, zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Gruppen.

Auch histologisch konnte kein Unterschied in der Ausprägung der Fibrose festgestellt werden. Die einzig relevante Differenz zeigte sich in der Ausprägung der zellulär entzündlichen Infiltration mit einer verstärkten Inflammation in der Gruppe infDCM. Dies entspricht den vorher festgelegten Kriterien mit mehr als 2 CD3 T- Lymphozyten pro HPF für infDCM bzw. weniger als 2 CD3 T-Lymphozyten pro HPF für idDCM. Dieses Einteilungskriterium führte allerdings nicht nur zu einer signifikant erhöhten Anzahl von CD3 T-Lymphozyten,

sondern war von einer Erhöhung aller anderen erhobenen Parameter für die Inflammation, bis auf die Infiltration mit aktivierten Makrophagen, begleitet mit einer signifikant Erhöhung von CD4 und CD8 T-Lymphozyten pro HPF sowie der HLA 1- und HLA-DR-Expression pro HPF.

Unterschiede zwischen diesen Gruppen in der Menge an mRNA von Matrixmetalloproteinasen und ihren Inhibitoren zwischen den Gruppen idDCM und infDCM könnten damit alleine auf die Differenzen in der myokardialen Inflammation zurückgeführt werden. Unterschiede in der Symptombdauer, Medikation, Hämodynamik oder myokardialer Fibrosierung konnten als potentielle Ursachen im Vorfeld ausgeschlossen werden, so dass als einzig relevanter Unterschied zwischen diesen Gruppen der Grad der zellulär entzündlichen Infiltration bestehen bleibt.

#### **4.3.2 Resultate der RT-PCR**

Bei der zufallskritischen Absicherung der beobachteten Werte konnte mittels der MANOVA Prozedur je nach benutztem Kennwert ein signifikantes Ergebnis bzw. eine im Trend nachweisbare Unterschiedlichkeit innerhalb der Daten festgestellt werden ( $0.032 \leq p \leq 0.091$ ). Eine genauere Analyse der Varianz der beobachteten Werte zeigte, dass die Unterschiede auf statistisch bedeutsamen Gruppendifferenzen sowohl für MMP-3 ( $p=0.050$ ) als auch für TIMP-4 ( $p=0.057$ ) beruhen. Die Berechnung der Einzelvergleiche konnte diese Gruppenunterschiede nochmals genauer charakterisieren. Dabei zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte MMP-3 Expression in der Gruppe infDCM im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0.019$ ) bei umgekehrten Verhältnissen für TIMP-4, also eine statistisch signifikant erniedrigte TIMP-4 Expression in der Gruppe infDCM im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0.019$ ). Diese zufallskritisch abgesicherte Unterschiedlichkeit in der Varianz der Werte zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe infDCM könnte sowohl auf dem Unterschied in der Ejektionsfraktion als auch durch die Unterschiede in der chronisch entzündlichen Reaktion des Myokards bedingt sein, da diese Variablen in den Gruppen KG und infDCM konfundiert waren. Die Ergebnisse einiger weiterer Analysen haben allerdings einen separaten Einfluss der chronisch entzündlichen Reaktion des Myokards auf die abhängigen Variablen belegen können. So nahmen die Mittelwerte der mRNA Menge an MMP-3 kontinuierlich von der KG über die Gruppe idDCM bis zur Gruppe infDCM zu, bei

umgekehrtem Verlauf der Mittelwerte für die mRNA Menge an TIMP-4. Das Verfehlen der Signifikanzgrenze ist dabei vermutlich auf die kleine Gruppengröße und die dafür große Varianz der Werte zurückzuführen. Ein statistisch bedeutsame erhöhte MMP-3 Expression konnte weiterhin für die Gruppe infDCM im Vergleich zur Gruppe idDCM nachgewiesen werden ( $p=0.059$ ), was bei Vergleichbarkeit der Gruppen für einen separaten Einfluss der Inflammation auf die matrixregulierenden Enzyme spricht. Die korrelationsstatistische Auswertung der Daten unterstützt die Relevanz der Entzündung für die Regulation der Matrixmetalloproteinase, da mit zunehmender Inflammation des Myokards die MMP-3 Expression hochreguliert und die TIMP-4 Expression herunter reguliert wurde. Dieser Zusammenhang konnte zwischen der Ejektionsfraktion und der mRNA Menge von MMP-3 und TIMP-4 nicht festgestellt werden. Ein Mittelwertsvergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe DCM hat einen signifikanten Unterschied sowohl für die MMP-3 als auch für die TIMP-4 Expression belegt. Bei nicht signifikantem Unterschied in der Inflammation zwischen diesen Gruppen war dieser Mittelwertsunterschied wahrscheinlich allein durch die Unterschiede der Hämodynamik bedingt. Statistisch signifikante Differenzen, die zwischen der Gruppe infDCM und der Kontrollgruppe bestanden, weisen damit auf einen über die hämodynamischen Differenzen hinausgehenden Einfluss der Inflammation auf die matrixregulierenden Enzyme hin. Die Aufklärung der Gesamtvarianz der MMP-3 Expression durch die Inflammation betrug dabei 23%, der TIMP-4 Expression 12%. Demnach ist die Inflammation nur ein Faktor von vielen, der die Dysbalance der matrixregulierenden Enzyme verursacht und in einem komplexen Netzwerk verschiedenster Mechanismen wirksam wird. In der Literatur ist die Disparität der Aktivierung des MMP/TIMP-Systems durch eine inflammatorische Reaktion des Myokards in verschiedenen Studienansätzen beschrieben. So konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass eine Inflammation des Myokards von einer signifikanten Hochregulation von MMP-3 und MMP-9 sowie einer signifikanten Down-Regulation von TIMP-1 und TIMP-4 begleitet war (Li et al., 2002). Auch an endomyokardialen Biopsien von Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie konnte der Zusammenhang zwischen einer myokardialen Entzündungsreaktion und dem Umbau der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (Pauschinger et al., 1998; Pauschinger et al., 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zur Relevanz der Entzündung für die Regulation der matrixregulierenden Enzyme stehen damit im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Beobachtungen.

Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied der mRNA Menge von MMP-3 und TIMP-4 bei DCM ohne signifikante Infiltration mit T-Lymphozyten (idDCM) im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht nicht im Einklang mit der Literatur, da bei verschlechterter myokardialer linksventrikulärer Funktion eine Disparität in der Aktivierung von MMP und TIMP vielfach belegt wurde, welche in einer ständigen Aktivierung der proteolytisch wirksamen MMPs resultiert (Li et al., 2000; Spinale et al., 1999; Thomas et al., 1998). So konnten verschiedene Subtypen der MMPs im menschlichen Myokard identifiziert werden, die im Rahmen einer Herzinsuffizienz dysreguliert sind (Sackner-Bernstein, 2002). Bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie konnte neben einer gesteigerten myokardiale MMP-3 Expression eine verminderte TIMP-Expression und damit das Missverhältnis des Quotienten MMP/TIMP dokumentiert werden (Li et al., 2000; Thomas et al., 1998). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der myokardialen MMP Expression und dem linksventrikulären Remodeling Prozesses ließ sich in tierexperimentelle Studien (Coker et al., 1998; Spinale et al., 1998), in Knock-Out Versuchen (Roten et al., 2000) und durch Studien zu MMP-Inhibitoren (Peterson et al., 2001) nachgewiesen (Kim et al., 2000).

Bei den in der Literatur erfassten Patienten mit einer DCM wurde allerdings nicht wie in der vorliegenden Studie nach immunhistologischen Kriterien zwischen einer idDCM und einer infDCM unterschieden, obwohl bekannt ist, dass bei etwa 50% der Patienten mit einer DCM eine chronische myokardiale Reaktion vorliegt (Kühl et al., 1994; Noutsias et al., 2002). Daher wurde der bereits erwähnte Mittelwertsvergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe DCM angestrebt, der den Einfluss der Hämodynamik auf die matrixregulierenden Enzyme belegen konnte. Einschränkend ist allerdings eine zwischen den Gruppen differierende Pharmakotherapie zu erwähnen. Der nicht signifikante Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe idDCM bei bestehendem Trend in den Daten kann daher eventuell durch die kleine Gruppengröße erklärt werden. Durch diese Interpretation der Daten stehen die Ergebnisse im Einklang mit der Literatur und belegen den Zusammenhang zwischen einer verschlechterten myokardialen linksventrikulären Funktion und einer Dysbalance in der Aktivierung des MMP/TIMP-Systems.

Demnach bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die aufgestellten Hypothesen sowohl zu den Gruppenunterschieden als auch zu den korrelativen Zusammenhängen.

#### **4.4. Bedeutung der Ergebnisse**

Veränderungen von Struktur und Funktion der EZM führen zur Störung der Interaktion zwischen den Matrixproteinen und damit zu Veränderungen der Herzgeometrie und zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Myokardfunktion (Pauschinger et al, 2002; Spinale, 2002; Wilson & Spinale, 2001). Diese Veränderungen der extrazellulären Architektur erleichtern einen Umbau der Myozytengröße und -geometrie, was der strukturellen Basis der linksventrikulären Hypertrophie entspricht (Nagatomo et al., 2000). Die EZM hat somit eine herausragende Stellung für die linksventrikuläre Funktion. Erkenntnisse über die Regulation der matrixdegradierenden Enzyme sind daher für das Verständnis der Progredienz der DCM von eminenter Bedeutung.

Veränderungen der matrixregulierenden Enzyme sind für die dilatative Kardiomyopathie sowohl im Tiermodell als auch für den Menschen vielfach beschrieben worden (Coker et al., 1998; Kim et al., 2000; Li et al., 2000; Peterson et al., 2001; Roten et al., 2000; Spinale et al., 1998; Spinale et al., 1999; Thomas et al., 1998). Ebenso wurde der Einfluss einer entzündlichen Reaktion des Myokards auf die EZM dokumentiert (Li et al., 2002; Pauschinger et al., 1998; Pauschinger et al., 1999).

In der vorliegenden Studie wurde an endomyokardialen Biopsien erstmals die Relevanz der chronisch inflammatorischen Reaktion des Myokards für den Umbau der extrazellulären Matrix durch die matrixregulierenden Enzyme bei Patienten mit DCM untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Inflammation einen über die eingeschränkte linksventrikuläre Funktion hinausgehenden Einfluss auf das myokardiale Remodeling hat. Dies wurde durch die Disparität der Aktivierung des proteolytischen Systems der Matrixmetalloproteinasen vermittelt. Wegen der hohen Prävalenz der Inflammation bei Patienten mit DCM könnten die Erkenntnisse der vorliegenden Studie für die Entwicklung neuer kausaler Therapieansätze von herausragender Bedeutung sein.