

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
und Angiologie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Chronische Chagas-Erkrankung

Auto-Antikörper gegen den beta1-Adrenorezeptor, beta2-
Adrenorezeptor und muscarinergen Rezeptor M2
sowie Entzündungsmarker, Marker für
Oxidativen Stress und Herzmarker zur
Risikoabschätzung, Diagnostik
und zum Monitoring

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Silvia Gilka Muñoz Saravia

aus Sucre (Bolivien)

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Ingolf Schimke
 2. Prof. Dr. Volker Richter
 3. Prof. Dr. Erwin Schleicher

Datum der Promotion: 16.05.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHER TEIL	5
2.1. Ätiologie und Infektion der Chagas-Erkrankung	5
2.2. Immunantwort	7
2.3. Akute Phase	8
2.4. Chronische Phase.....	9
2.4.1. Asymptomatische Phase (Latenzphase, Indeterminate Phase).....	10
2.4.2. Symptomatische Phase	10
2.4.2.1. Chagas-assoziierte Herz-Erkrankung.....	11
2.4.2.2. Chagas-assoziiertes Megakolon	13
2.5. Pathogenese der chronischen Chagas-Erkrankung	14
2.5.1. Pathomechanismen der Herzschädigung.....	15
2.5.2. Auto-Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	21
2.6. Laboratoriumsmedizinische Diagnostik	24
2.6.1 Infektionsdiagnostik	24
2.6.2 Laboratoriumsdiagnostik zum Nachweis des Überganges von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase.....	24
2.6.2.1 Organunspezifische Marker	24
2.6.2.1.1. Entzündungsmarker - C-reaktives Protein (CRP) und Zytokine.....	25
2.6.2.1.2 Marker des Oxidativen Stress	27
2.6.2.2. Organspezifische Marker	28
2.6.2.2.1. B-Typ-natriuretisches Peptid	28
2.6.2.2.2. Kardiale Troponine.....	29
2.7. Therapie	30
2.8. Problemstellung	31
3. MATERIAL UND METHODEN	34
3.1. Patienteneinschluss und Klassifizierung	34
3.2. Blutabnahme und Serumpräparation	36
3.3. Bestimmung von beta1-AAK, beta2-AAK und M2-AAk.....	36
3.3.1. Immunglobulin-Preparation	36
3.3.2. Gewinnung und Kultivierung von neonatalen Kardiomyozyten.....	37
3.3.3. Messung der Pulsationsrate von neonatalen Kardiomyozyten	38
3.3.4. Assay-Standardisierung.....	38

3.3.5 Bestimmung der AAK-Aktivität und Differenzierung der AAK	38
3.4. Bestimmung der Entzündungsmarker	40
3.4.1. Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP)	40
3.4.2 Bestimmung von Interleukinen, löslichen Interleukinrezeptoren und TNF α	40
3.4.3. Bestimmung von Markern für Oxidativen Stress	41
3.5. Bestimmung der Herzmarker	42
3.6. Statistik	43
4. ERGEBNISSE	44
4.1. Charakteristik von Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung .	44
4.1.1. Subklassifizierung der Patienten mit Kardiomyopathie	47
4.1.2. Subklassifizierung von Kontrollen und Patienten hinsichtlich des Zeitpunktes der Blutabnahme	49
4.2. Auto-Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung	50
4.2.1. Auto-Antikörperaktivität	52
4.2.2. Vergleich der Auto-Antikörperaktivität bei Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung in der Latenz-Phase mit dem Risiko für Kardiomyopathie und mit Kardiomyopathie unterschiedlichen Schweregrades	55
4.3. Marker zur Charakterisierung der Entzündungen	58
4.3.1. CRP-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung	58
4.3.2. IL-2R-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung	62
4.3.3. IL-6-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung	64
4.3.4. IL-8-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung	68
4.3.5. IL-10-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung	73
4.3.6. TNF α -Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung	76
4.3.7. MPO-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung	79
4.4. Marker für Oxidativen Stress	80
4.4.1. MDA-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas- Erkrankung	80

4.4.2. Lipidperoxid-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung.....	82
4.5. Bestimmung der Herzmarker	84
4.5.1. NT-proBNP-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung.....	84
4.5.2. cTnT-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung.....	90
4.5.3. Klassifizierung von Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie basierend auf der Konzentration von NT-proBNP, kombiniert mit der Konzentration von cTnT.....	97
5. DISKUSSION	99
5.1. Material und Methoden	100
5.1.1. Patienteneinschluss und Klassifizierung	100
5.1.2. Auto-Antikörperquantifizierung.....	101
5.1.3. Laboratoriumsmedizinische Untersuchungen.....	102
5.2. Resultate	102
5.2.1. Charakteristik von Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung	102
5.2.2. Auto-Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	103
5.2.3. Marker zur Charakterisierung von Entzündungsprozessen	107
5.2.4 Marker zur Charakterisierung von Oxidativem Stress	110
5.2.5. Marker der Herz-Schädigung	111
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN	116
7. ZUSAMMENFASSUNG	117
7.1. Einleitung und theoretischer Teil.....	117
7.2. Problemstellung	118
7.3. Material und Methoden	119
7.4. Ergebnisse.....	120
7.5. Diskussion und Zusammenfassung	122
8. LITERATUR	125

1. EINLEITUNG

Die Chagas-Erkrankung ist eine endemisch primär in Lateinamerika vorkommende Infektionskrankheit, die von einzelligen Parasiten (Protozoen) verursacht wird. Sie ist nach dem brasilianischen Arzt Carlos Chagas (geb.1879 in Oliveira, gestorben 1934 in Rio de Janeiro) benannt. Im Jahre 1909 wurde Carlos Chagas in das Amazonasgebiet beordert, um dort Maßnahmen gegen einen vermeintlichen Malaria-Ausbruch unter Gleisbauarbeitern einzuleiten. Während dieses Aufenthaltes entdeckte er, dass die Unterkünfte stark durch blutsaugende Raubwanzen (Reduviidae), speziell der Unterfamilie Triatominae, kontaminiert waren. Im Intestinum dieser Raubwanzen fand er eine neue *Trypanosoma*-Art, die er nach seinem Mentor Oswaldo Cruz *Trypanosoma cruzi* nannte. Es gelang ihm, die Übertragung von *Trypanosoma cruzi* auf Krallenaffen als Folge von Raubwanzenbissen zu zeigen. Schließlich fand er *Trypanosoma cruzi* im Blut eines akut erkrankten dreijährigen Mädchens.

Von den Triatominae sind für die Chagas-Erkrankung epidemiologisch insbesondere *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis* und *Panstrongylus megistus* bedeutsam.

Sowohl weibliche als auch männliche Raubwanzen können lebenslang (bis zu zwei Jahre) den Erreger übertragen. Als Reservoir für den Parasiten sind neben dem Menschen mehr als 100 Arten von Säugetieren u.a. Hunde, Katzen, Ratten, Faultiere, Gürteltiere und Fledermäuse bekannt. Da Raubwanzen kannibalisch leben, kann *T. cruzi* sich auch auf diesem Wege in der Wanzenpopulation verbreiten. Vögel und Reptilien bilden kein Reservoir für den Parasiten.

Raubwanzen sind geografisch zwischen dem 42. nördlichen und dem 40. südlichen Breitengrad in einer Höhe von 300 bis 3000 Metern über dem Meeresspiegel verbreitet. Es besteht damit Infektionsgefahr vom Süden der USA bis zum Süden Argentinens.

Die Chagas-Erkrankung ist in Lateinamerika in mehr als zwanzig Ländern endemisch verbreitet (Abb. 1). Basierend auf Zusammenfassungen von Dias JCP et al.¹, Moncayo A² und Moncayo A und Ortiz Yanine³ wurde von der WHO für die 1980er Jahre angegeben, dass ca. 100 Millionen Einwohner bzw. 25 % der Gesamtbevölkerung Lateinamerikas in endemischen Gebieten leben und damit der Infektionsgefahr ausgesetzt sind. Es gibt 16-18 Millionen chronisch Infizierte. Wie in Tabelle 1 dargestellt ist, wurden für diesen Zeitraum jährlich 700000 Neuinfektionen und mehr als 45000 Todesfälle geschätzt. Nach verschiedenen multinationalen Initiativen zur Reduktion der

Prävalenz der Chagas-Erkrankung wurde für das Jahr 2000 eine Zahl von elf Millionen Infizierte angegeben, bei einer Inzidenz von 200000 und 21000 Todesfällen jährlich. Bolivien gehört dabei zu den Ländern, in denen der Überträger flächenmäßig am weitesten verbreitet ist. Das endemische Gebiet umfasst 60-80 % des Landes, es leben darin vier bis fünf Millionen Menschen. 1985 wurden mehr als eine Millionen Infizierte in Bolivien angegeben. Andere Schätzungen gehen von einer Prävalenz von 40 % der Bevölkerung aus.



Abb. 1 Verbreitung der Chagas-Erkrankung in Lateinamerika⁴

Die Übertragung der Trypanosomen auf den Menschen erfolgt durch den Wanzenkot, der während des Bisses abgesetzt und durch den Menschen selbst in die frische Bisswunde oder andere Wunden eingerieben wird. Der Erreger kann aus dem Kot auch über unverletzte Schleimhäute insbesondere über die Mundschleimhaut und über die Konjunktiven ins Blut des Menschen übertreten.⁵ Vermutlich bleibt der Kot langfristig infektiös.

Weitere Verbreitungsmöglichkeiten für die Chagas-Erkrankung ergeben sich aus dem diaplazentaren und/oder perinatalen Übergang von der Mutter auf den Fötus.⁶ Infektionen durch mit Kot verunreinigten Lebensmitteln bzw. Genussmitteln wurden ebenfalls beschrieben.⁷ Da symptomlose, jedoch infizierte Menschen potentielle Blutspender sind, kann davon ausgegangen werden, dass für weitere 100 Millionen Einwohner Infektionsgefahr besteht.^{8,9} Aufgrund der großen Zahl von Infizierten sind

große Bevölkerungs- und Berufsgruppen (Sozialwesen, Gesundheitswesen, Sport u.s.w.), die mit dem Blut Infizierter in Kontakt kommen können, potentiell gefährdet.

Tab. 1 zeigt, dass durch Unterbrechung der Erregertransmission die Erkrankungshäufigkeit und letztlich auch die Chagas-bedingten Todesfälle gesenkt werden können.

Tab. 1 Epidemiologische Daten für die Chagas-Erkrankung. Veränderungen zwischen 1990 und 2000 durch Unterbrechung der Erregertransmission²

	1990	2000
Todesfälle pro Jahr	> 45.000	21.000
Neuerkrankungen pro Jahr	700.000	200.000
endemische Staaten	18	15*

* Erregertransmission wurde in Uruguay im Jahr 1997 und in Chile im Jahr 1999 unterbrochen. Seit 2005 ist die Erregertransmission auch in Brasilien unterbrochen

Durch Migration und Tourismus finden sich auch vermehrt Infizierte auf anderen Kontinenten.¹⁰ In Spanien, wo über 200000 Einwanderer aus Lateinamerika leben, gibt es geschätzt ca. 6000 Infizierte. Auch in den USA fanden sich unter den Zugewanderten aus Zentral- bzw. Südamerika Infizierte. In den USA könnten deshalb mehrere 100000 Einwanderer infiziert sein,¹⁰ die durch Bluttransfusionen den Erreger weitergeben können. In den USA gibt es drei gesicherte Fälle von Chagas-Erkrankung nach Bluttransfusion. 2006 war bei Routinetests wie zum Beispiel Enzym-gekoppelter Immunsorbent-Assay (ELISA), indirekte Hämagglutination (IHA) oder Immunfluoreszenz von Blutkonserven in den USA eine von 4655 Proben positiv.¹¹ Es besteht darüber hinaus die Gefahr, dass die Chagas-Erkrankung durch Organtransplantation übertragen wird.^{9,12}

Bei allen *Trypanosoma cruzi* Infizierten folgt der akuten Krankheitsphase die chronische Chagas-Erkrankung, die durch die lebenslange Persistenz des Parasiten gekennzeichnet ist. Nach zum Teil jahrzehntelanger asymptomatischer Phase

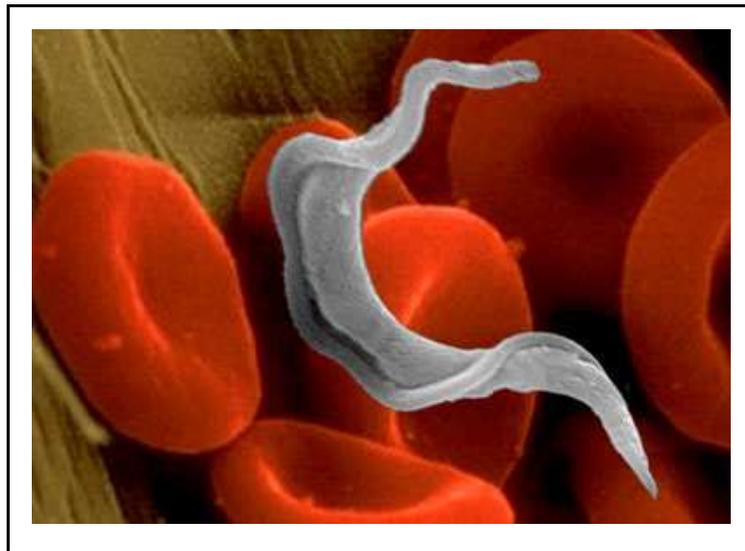
(Indeterminate Phase, Latenzphase) gehen ca. ein Drittel der Infizierten in eine symptomatische Phase über,¹³ die sich bei etwa 90-95 % als Chagas-Herzkrankheit, bei ca. 5-15% als Erkrankung des Intestinaltraktes manifestiert.^{5,7,14}

Daraus ergibt sich für die betroffenen Länder Lateinamerikas ein gewaltiges sozio-ökonomisches Problem. Beispielhaft soll dies für Brasilien dargestellt werden. Wie von Moncayo A.² zitiert wurde, ist 1987 publiziert worden, dass zur Therapie (Herzschrittmacherimplantation, Chirurgie) aller symptomatischen chronischen Chagas-Patienten pro Jahr 750 Millionen US Dollar notwendig wären. Für den Zeitraum zwischen 1979 und 1981 wurde aus der Zahl Chagas-bedingter Todesfälle ein auf 259152 Jahre geschätzter Lebensarbeitszeitverlust abgeleitet. Geht man als Rechengrundlage von unqualifizierten Landarbeitern mit einem täglichen Einkommen von 2,5 US Dollar aus, ergibt sich durch den vorgezogenen Tod ein ökonomischer Verlust von 237 Millionen US Dollar in der Bevölkerung. Derartige Rechnungen waren eine Grundlage für Initiativen und Kontrollprogramme, um die Infektion mit *Trypanosoma cruzi* einzudämmen. Diese umfangreichen Programme beinhalteten primär Maßnahmen zur Eliminierung des Überträgers (Einsatz von Insektiziden, Desinfektion) sowie der Identifizierung von Neubesiedelungen des Überträgers. Ergänzend wurde ein umfassendes Screening der Blutspenden eingeführt.

2. THEORETISCHER TEIL

2.1. Ätiologie und Infektion der Chagas-Erkrankung

Die Infektion des Menschen mit dem Protozoen *Trypanosoma cruzi* (Abb. 2) verursacht die amerikanische Trypanosomiasis oder Chagas-Erkrankung.



**Abb. 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Trypanosoma cruzi* im Blut¹⁵
(Reproduktion mit Erlaubnis von Rubem F. S. Menna-Barreto/IOC-Fiocruz)**

T. cruzi existiert entsprechend der verschiedenen Phasen seines Lebenszyklus morphologisch in drei Formen (Abb. 3). Die infektiöse Form (**trypomastigote Form**) existiert als frei zirkulierende extrazelluläre Geißel, die sich nicht in dem als Wirt fungierenden Säugetier multipliziert, jedoch kann dieser Erreger während der Blutaufnahme durch das Insekt Reduviidae (Vinchuca) importiert werden. Im Mitteldarm der Insekten wird die trypomastigote in die **epimastigote** Form umgewandelt. Diese repliziert sich dort mittels binärer Spaltung. Im Enddarm und Rektum des Insekts werden die Epimastigoten zur metazyklischen Trypomastigoten, der eigentlichen infektiösen Form, welche mit dem Kot des Insekts ausgeschieden wird. Die Trypomastigoten können nach dem Biss des Insekts durch Einreiben des Kots oder über Kotkontamination der Schleimhäute in den Körper des Menschen gelangen. In den befallenen Zellen verwandeln sich die Trypomastigoten in sphärische Formen,

bezeichnet als **Amastigoten**, die sich ebenfalls in binärer Spaltung vermehren. Nach vier bis fünf Tagen strecken sich die Körper der Amastigoten und verwandeln sich so in Trypomastigoten. Nach Zellyse gelangen die Trypomastigoten in die Blutzirkulation und können wiederum durch Raubwanzen auf weitere Personen übertragen werden. Es ist bekannt, dass verschiedenste menschliche Zellen befallen werden können. Allerdings existiert ein deutlicher Tropismus in Richtung muskulärer und neuronaler Zellen. Zu den betroffenen Muskelzellen zählen sowohl Zellen der quergestreiften (Herz, Skelett) als auch der glatten Muskulatur.¹⁶

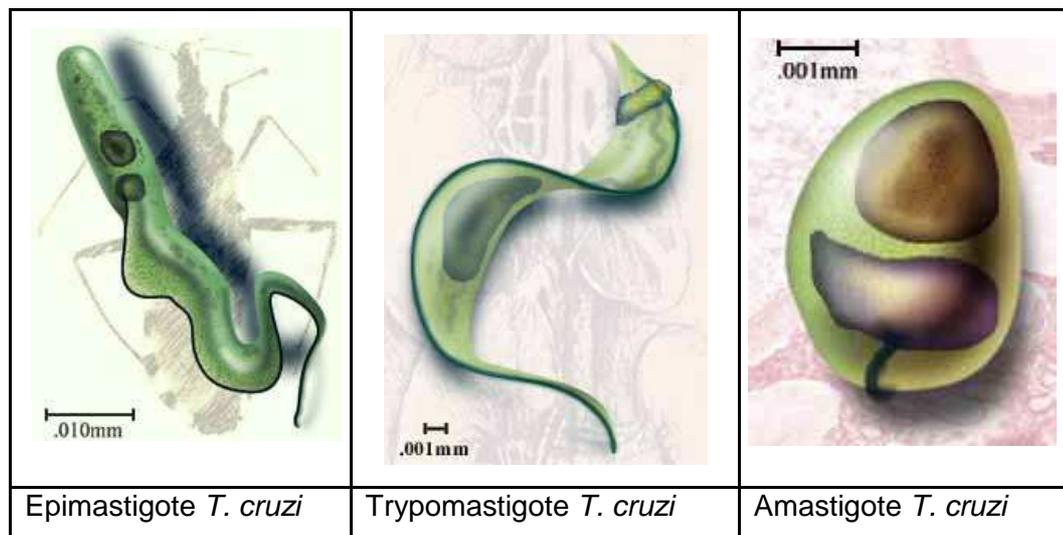


Abb. 3 Morphologische Formen von *T. cruzi*¹⁷ (Reproduktion mit Erlaubnis von J.W. Bastien, University of Texas, Arlington)

Nach der Infektion zeichnet sich die Chagas-Erkrankung durch einen variablen klinischen Verlauf aus. Dabei werden symptomlose Infektion, milde klinische Zeichen, die nur unmittelbar nach der Infektion sichtbar werden, aber auch schwerste lebensbedrohende Komplikationen manchmal in der frühen Phase nach der Infektion, besonders häufig aber nach Jahren der Symptomlosigkeit, beobachtet. Genetische Bedingungen, basierend sowohl auf der genetischen Variabilität des Erregers als auch des Infizierten, werden dafür verantwortlich gemacht.^{18,19} Regionale Unterschiede in der Inzidenz der Infektion, dem Schweregrad der Erkrankung und dem Spektrum der Komplikationen werden damit in Zusammenhang gebracht. Große Bedeutung wird dabei der Infektion mit *T. cruzi* folgenden Immunantwort zugeschrieben, wobei hier nicht nur genetische sondern auch erworbene Variabilitäten von Bedeutung sind. Die so genannte „protektive“ Immunantwort dient dabei der Kontrolle der *T. cruzi*-Infektion. Andererseits

werden über das Stadium der ineffektiven Kontrolle hinaus, sichtbar am Persistieren des Erregers, immunologische Bedingungen und Mechanismen als essentiell in der Genese der Spätschäden bei Chagas-Erkrankung angesehen.

Nach Infektion mit *T. cruzi* werden die akute Phase und die nachfolgende chronische Phase unterschieden. Letztere lässt sich in eine asymptomatische Phase (Latenzphase, Indeterminate Phase) und eine symptomatische Phase unterteilen.

Die akute Phase der Chagas-Erkrankung verläuft in der Regel nicht tödlich und dauert zwischen zwei und vier Monaten. Sie ist von einer starken Aktivierung des Immunsystems begleitet, die zu einer deutlichen Verminderung der Parasitenzahl im Blut führt. In der anschließenden chronischen Phase werden die Parasiten weiterhin durch das Immunsystem des Wirtes kontrolliert. Eine vollständige Beseitigung des Parasiten erfolgt dadurch jedoch nicht, so dass während des gesamten Lebens des Chagas-Patienten persistierende Antikörper gegen *T. cruzi* im Blut nachgewiesen werden können und in vielen Fällen der Parasitennachweis in Geweben positiv ausfällt.²⁰ Heute geht man davon aus, dass durch die Parasitenpersistenz in der chronischen Phase Autoimmunmechanismen induziert werden, die in die Pathogenese der wesentlichen Spätschäden der Chagas-Erkrankung wie Kardiomyopathie und Megakolon einfließen.

2.2. Immunantwort

Wie von Gironés et al.²¹ zusammenfassend dargestellt wurde, ist die Immunantwort gegen *T. cruzi* hoch komplex und weit davon entfernt, geklärt zu sein. Sowohl die humorale als auch zelluläre Immunantwort sind an der Kontrolle des *T. cruzi* beteiligt. Dies überrascht aufgrund der Komplexität des Lebenszyklus des Parasiten nicht. Obwohl in B-Zell defizienten Mäusen die Infektion begünstigt ist, was auf die Bedeutung des humoralen Immunsystems in der Immunantwort gegenüber *T. cruzi* hinweist, scheint der immunologische Schutz insbesondere durch CD4+, CD8+ T-Zellen, IFN- γ Sekretion und Makrophagen bedingt zu sein. Dabei soll die durch CD8+ T-Zellen kontrollierte Infektion auf der Perforin/Granzym- und/oder FAS-vermittelten Apoptose beruhen. Es gibt jedoch Hinweise, dass CD8+ T-Zellen nur unvollständig die Infektion kontrollieren, da sie ihre Reaktivität verlieren können.

Eine wichtige Funktion in der Regulation der Immunantwort - sowohl im Rahmen der generellen Induktion, der Art der Immunantwort, als auch der Parasitenreplikation im infizierten Wirt - spielen Zytokine. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Makrophagen zu. So induziert Interleukin (IL-12), das als Folge der Infektion von Makrophagen gebildet wird, Resistenz gegenüber *T. cruzi*. Als wichtigste antiparasitäre

Zytokine haben sich Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) erwiesen, wobei der Stickstoffmonoxid (NO) vermittelnden Toxizität eine besondere Bedeutung zukommen soll. Konsequenterweise führten monoklonale Anti-IFN- γ -Antikörper zu einem drastischen Anstieg der Parasitämie und Mortalität. Mäuse, die defizient für den IFN- γ -Rezeptor und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) waren, hatten eine erhöhte Infektanfälligkeit und Parasitämie. Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die gezeigt haben, dass iNOS defiziente Mäuse nicht von einer gesteigerten Infektanfälligkeit betroffen sind. Die protektive Wirkung von TNF- α konnte aus Versuchen abgeleitet werden, in denen gezeigt wurde, dass TNF-R1FcIgG3 transgene Mäuse sensitiver gegenüber *T. cruzi* sind.

Wie bereits beschrieben, erfolgt jedoch keine vollständige Parasiteneliminierung. Dazu beitragen könnten immunsuppressive Wirkungen, die von *Trypanosoma cruzi* ausgehen. Die nicht vollständige Eliminierung des Parasiten könnte aufgrund eines „molekularen Mimikry“ von *T. cruzi* und menschlichen Antigenen des Herz- und Intestinaltraktes eine Ursache für die Induktion von Autoimmunität sein, die zunehmend in der Pathogenese der symptomatischen chronischen Chagas-Erkrankung diskutiert wird.

2.3. Akute Phase

Nach der Inokulation der Trypanosomen kommt es an der Wanzenstichstelle zu einem Entzündungsherd, der mit der Bildung einer kutanen Eingangspforte, Chagom genannt einhergeht. Erfolgt die Infektion im Bereich der Bindehaut der Augen, zeigt sich das typische Romaña-Zeichen. Es besteht in der Regel aus einer einseitigen Konjunktivitis mit Oberlidschwellung (Abb. 4). Die akute Phase verläuft klinisch weitgehend asymptomatisch. Nur bei ca. 5-10 % der Patienten treten uncharakteristische Symptome wie Fieber, Luftnot, Ödeme, Durchfall, Bauchschmerzen, Lymphknotenschwellung, Splenomegalie, Krampfanfälle sowie Myokarditiden auf.^{3,7}



Abb. 4 Romaña-Zeichen.²² Lokale Bindehautreaktion (bis zu 8 Wochen andauernd) auf eine transkonjunktivale Infektion mit *Trypanosoma cruzi*. (Reproduktion mit Erlaubnis von F. Torrico, und M. Castro, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia)

Die dabei zu beobachtenden Symptome entsprechen denen, die auch bei Myokarditis anderer Genese gefunden werden. Die durch den Parasiten geförderte Depression des Immunsystems begünstigt die weitere Invasion und Reproduktion des Parasiten. In der akuten Phase ist der Parasit im Blut nachweisbar. Bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten, wird die akute Phase der Krankheit jedoch nicht sichtbar.^{7,14} Symptomatisch wird die akute Phase vorwiegend bei Kindern. Bei ihnen treten insbesondere Myokarditis oder Meningoenzephalitis als Komplikationen auf. Im Allgemeinen bilden sich auch bei Kindern, wie bei der Mehrheit der Patienten mit symptomatischer akuter Phase, die Symptome nach einigen Wochen spontan zurück.³ Die Todesrate in der akuten Phase ist allgemein gering. Für Kinder ist eine Mortalität in der akuten Phase von 2-6 %, insbesondere durch Myokarditis und Meningoenzephalitis verursacht, beschrieben.^{7,23}

2.4. Chronische Phase

Im Anschluss an die akute Phase kommt es zu einem deutlichen Rückgang der Parasitenzahl im Blut, ohne dass jedoch eine vollständige Eliminierung des Parasiten eintritt. Damit stellt der Infizierte lebenslang ein Parasitenreservoir dar. In dieser chronischen Phase lässt sich die Erkrankung schwierig parasitologisch nachweisen. Erfolgreich ist jedoch der serologische Nachweis von anti-*T. cruzi*-Antikörpern vom IgG-

Typ. Man unterscheidet in der chronischen Phase eine asymptomatische und eine symptomatische Phase.

2.4.1. Asymptomatische Phase (Latenzphase, Indeterminate Phase)

Die Patienten sind klinisch unauffällig. In dieser Phase - auch als Latenzphase (im lateinamerikanischen Sprachraum als Indeterminate Phase) bezeichnet - wird die Chagas-Erkrankung als Zufallsbefund bzw. bei gezielter Suche beispielsweise bei potentiellen Blutspendern entdeckt.

Die asymptomatische Phase kann Jahre dauern, ohne dass Zeichen für den Übergang in die symptomatische Phase sichtbar werden. Die meisten Patienten (zwei Drittel) verbleiben lebenslang in der asymptomatischen Phase.^{2,3} Allerdings können während der asymptomatischen Phase Episoden auftreten, die erneut durch die bereits in der akuten Phase beobachteten unspezifischen Zeichen gekennzeichnet sind. Derartige symptomatische Episoden werden insbesondere bei immunsupprimierten Personen (zum Beispiel HIV positive Patienten) beobachtet.^{3,7}

2.4.2. Symptomatische Phase

Etwa 30% der Patienten zeigen nach 10-20 Jahren der Symptomlosigkeit Zeichen einer Erkrankung des Herzens, des Intestinaltraktes und/oder des Nervensystems, wobei die Häufigkeit dieser Komplikationen in den Ländern Lateinamerikas unterschiedlich ist.

Unter den Nervenerkrankungen wird auch Demenz beobachtet. Typisch für die Erkrankungen des Intestinaltraktes sind Megakolon und Megaösophagus. Schluckbeschwerden sind erste Hinweise auf Veränderungen im Intestinaltrakt. In deren Konsequenz kann es zur Malnutrition kommen. Gewichtsverlust ist dann häufig das erste deutliche Zeichen für den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase. Etwa 8-10 % der symptomatisch werdenden chronischen Chagas-Patienten entwickeln eine intestinale Erkrankung, insbesondere ein Megakolon. Die wesentlich häufigere Komplikation der chronischen Chagas-Erkrankung ist eine Herzmanifestation vor allem die Kardiomyopathie. Von der Chagas-Kardiomyopathie sind etwa 90% der symptomatisch werdenden chronischen Chagas-Patienten betroffen.

2.4.2.1. Chagas-assoziierte Herz-Erkrankung

Die Chagas-bedingte Herz-Erkrankung manifestiert sich in Rhythmusstörungen, Thromboembolien, plötzlichem Herztod und Kardiomyopathie, der häufigsten Spätschädigung bei der Chagas-Erkrankung.

Mittels Elektro- und Echokardiografie lassen sich zum Teil bereits bei Chagas-Patienten, die nach klinischen Gesichtspunkten noch der Latenzphase zugeordnet werden, Zeichen für eine Herzschädigung nachweisen.²⁴ Typisch ist ein isolierter Rechtsschenkelblock. Manchmal ist der Rechtsschenkelblock mit einem linksanteriorem Hemiblock kombiniert. Im späteren Stadium kann ein umfassendes Spektrum von Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen im EKG nachgewiesen werden. Die häufigsten EKG-Anomalien sind: Rechtsschenkelblock, vorderer Linksschenkelblock, Ventrikuläre Extrasystolen, Sinus-Bradykardie, Vorhofflimmern, AV-Block Wenkebach IIa.²⁵

Als Ursprungsort für die Thromben werden apikale Aneurysmen angenommen. In etwa 30 % der Fälle von plötzlichem Herztod waren die Chagas-infizierten Patienten vorher der Latenzphase zugeordnet. Die hervorstechenden echokardiografischen und im späteren Verlauf radiologischen Zeichen der Herz-Erkrankung weisen auf die dilatative Kardiomyopathie (Abb. 5, 6), die mit Hypokinesien des Septums und der Hinterwand assoziiert ist, hin.

Bisher werden die spezifischen Mechanismen der Pathogenese noch nicht vollständig verstanden. Angenommen wird aber, dass sowohl Parasit als auch Wirt Einfluss auf die Pathogenese haben.²⁶



Abb. 5 Zunehmende Kardiomegalie bei der Chagas-Erkrankung²⁷ (Reproduktion mit Erlaubnis von E. van den Enden, Instituut voor Tropische Geneeskunde Antwerpen)



Abb. 6 Röntgenologische Darstellung der Kardiomegalie bei der Chagas-Erkrankung²⁸

Mikroskopisch lassen sich Entzündungsprozesse (Myokarditis) in allen Herzarealen nachweisen.

In den entzündlichen Infiltraten überwiegen T-Zellen mit einem variablen Anteil von B-Zellen und Makrophagen.¹⁶ Fokale und später dann diffuse Gewebedestruktion und interstitielle Fibrose sind typische mikroskopische Befunde bei Chagas-bedingter Kardiomyopathie.^{5,24}

Obwohl die Mechanismen der Pathogenese der Chagas-Kardiomyopathie noch nicht vollständig verstanden sind, müssen die Ursachen sicherlich sowohl beim Parasiten als auch in spezifischen Bedingungen des Wirtes gesucht werden. So lässt sich die Erreger-DNA zwar in Myokardbiopsien nachweisen, allerdings korrelieren Erreger-Nachweis im Myokardgewebe und Schweregrad der Herzschädigung häufig nicht. Dies lässt auf die Existenz anderer Mechanismen für die Kardiomyopathie-Entstehung schließen, vor allem auf solche, die sich aus einer spezifischen Disposition des Wirtes ergeben könnten. Auf die in diesem Zusammenhang diskutierten Autoimmunitäts-Phänomene als eine Ursache der Chagas-Kardiomyopathie wird ausführlicher in Kap. 2.5 eingegangen.

2.4.2.2. Chagas-assoziiertes Megakolon

Typisches radiologisches Zeichen des Megakolons wie auch des Megaösophagus ist deren Dilatation, bedingt durch die Zerstörung des intramuralen Plexus myentericus. Angenommen wird, dass diese Zerstörung auf die Wirkung von *T. cruzi* in der akuten Phase zurückgeht.²⁵ Berücksichtigt man die auch beim Megakolon sehr lange Latenzphase, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier Autoimmunitätsphänomene an der Pathogenese beteiligt sind.

Klinisches Zeichen für das Megakolon ist die chronische Obstipation als Folge der Darmhypokinesie. Begleitet wird die Obstipation von Bauchschmerzen. In der frühen Phase des Megakolons können Phasen von Verstopfung und Durchfall abwechseln. Die Obstipation kann über mehr als eine Woche anhalten, manchmal sogar zwei bis drei Monate dauern.²⁵ Eine Ursache für den Bauchschmerz kann im Meteorismus und dessen Wirkung auf den Darm gesucht werden. Zur frühen Diagnostik des Megakolons kann die radiologische Diagnostik unter Nutzung von Barium als Kontrastmittel (Barium-Einlauf) genutzt werden. Bei weit fortgeschrittenem Megakolon oder bei Komplikationen, wie eine Verdrehung des Sigmoides, genügt häufig bereits eine einfache radiologische Diagnostik. Verdrehungen und fäkale Verdichtungen des Sigmoides sind die häufigsten Komplikationen des Megakolons. Die Chagas-bedingte Kolonopathie ist die zeitlich von der Infektion aus gesehen, späteste Komplikation der chronischen Chagas-Erkrankung. Sie wird zum Teil erst 40 Jahre nach der Infektion klinisch manifest. Das Megakolon wurde in Brasilien, Chile und Bolivien bei 2 – 5 % der chronischen Chagas-Patienten beobachtet.²⁵ (Abb. 7, 8)



Abb. 7 Megakolon bei der Chagas-Erkrankung^{22,27} (Reproduktion mit Erlaubnis von F. Torrico, und M. Castro, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia)



Abb. 8 Röntgenologische Darstellung des Megakolons bei der Chagas-Erkrankung²⁸

2.5. Pathogenese der chronischen Chagas-Erkrankung

Da die akute Chagas-Erkrankung in der Regel symptomlos abläuft, gibt es, abgesehen vom Parasitennachweis, kaum Informationen über histopathologische Veränderungen unmittelbar nach der Infektion. Wie von Teixeira et al.²⁹ dargestellt wurde, stammen die histopathologischen Befunde zur akuten Chagas-Erkrankung aus der Sektion sehr weniger Patienten (Junge 18 Monate alt, Mädchen 4 Monate alt), die nach der Infektion starben. Gefunden wurden Amastigoten in Testes und Ovarien. Darüber hinaus wurde *T. cruzi* in mononukleären phagozytären Zellen gefunden, was Ausdruck der Kontrollfunktion dieser Zellen im Rahmen der akuten Infektion ist.

Für die Parasiten in Gewebezellen, insbesondere auch in den Zellen des Herz- und Skelettmuskels, wird angenommen, dass sie sich der immunologischen Kontrolle entziehen. Dies wird als eine Ursache der lebenslangen Parasitenpersistenz angesehen und könnte erklären, warum trotz positivem Parasitennachweis in Geweben Entzündungsherde nicht gefunden wurden. Andererseits wurden, ohne dass Parasiten mit den genutzten Methoden nachgewiesen werden konnten, typische entzündliche Infiltrate in Herz- und Skelettmuskel gefunden. Vergleichbare Befunde liegen für die glatte Muskulatur des Intestinaltraktes vor, wo Infiltrate insbesondere in der Nähe parasymphatischer Ganglien beobachtet wurden. Je nach Manifestation in Herz oder Gehirn werden bei dramatischem Verlauf der akuten Phase die typischen Zeichen von Myokarditis, Enzephalitis und Meningitis gesehen.

Daten für die Indeterminate Phase der Chagas-Erkrankung stammen hauptsächlich aus Material, das mittels Biopsie-Technik gewonnen wurde. So wurden in Myokardbiopsien kleine fokale Entzündungsherde gefunden. Vergleichbare Resultate wurden auch im Skelettmuskel entdeckt. Im Allgemeinen sind die entzündlichen Läsionen in Herz, Skelettmuskel und Gastrointestinaltrakt in der indeterminaten Phase vergleichbar dem mikroskopischen Bild, das in der chronischen Phase beobachtet wird, jedoch von erheblich geringerem Ausmaß.

Als mikroskopischer Hauptbefund in der chronischen Phase der Chagas-Erkrankung, insbesondere dann, wenn das Herz betroffen ist, werden entzündliche Infiltrate gefunden. Der mikroskopische Parasitennachweis gelingt allerdings nur bei 10-20 % der untersuchten Patienten. Moderne Amplifizierungstechniken zeigen dagegen parasitäre DNA in nahezu allen Patienten. Hinsichtlich der zugrunde liegenden Pathomechanismen liegt dabei insbesondere für die Herzschiädigung als häufigste Manifestationsform der chronischen Chagas-Erkrankung eine Vielzahl von Einzelbefunden vor, die zu einer Reihe von Hypothesen über die Pathogenese der Chagas-assoziierten Herzschiädigung zusammengefasst wurden und nachfolgend ausführlicher dargestellt werden. Prüft man diese Hypothesen im Hinblick auf ihre Verallgemeinerungsfähigkeit, so können grundlegende Aspekte in der Pathogenese der Chagas-assoziierten gastrointestinalen Schädigung, obwohl dafür erheblich weniger Einzelbefunde vorliegen, vermutlich auch mit diesen Hypothesen erklärt werden.

2.5.1. Pathomechanismen der Herzschiädigung

Typisch für die Chagas-Kardiomyopathie sind Arrhythmien, Myokarditis, Fibrose und Hypertrophie, die in hohem Prozentsatz in verstorbenen Patienten gefunden wurden. Histologisch lassen sich diffuse interstitielle Fibrosen, entzündliche Infiltrate parallel zu gestörter Myozytenmorphologie nachweisen. Vergleichbare histologische Veränderungen zeigen sich auch am Reizleitungssystem. Der histologische Parasitennachweis ist selten erfolgreich, lässt sich aber, wie in der indeterminaten Phase, über die Parasiten-DNA führen.

Für die der Chagas-Kardiomyopathie zugrunde liegenden Pathomechanismen existieren verschiedene Hypothesen. Wie von Gironés et al.²¹ und Engman et al.³⁰ zusammengefasst wurde, werden einerseits direkte Reaktionen des Immunsystems auf gewebeständige Parasiten verantwortlich gemacht, andererseits wird die Kardiomyopathie als Produkt aus dem Zusammenspiel von inflammatorischen,

immunologischen und autoimmunologischen Mechanismen gesehen. Davon ausgehend sind mehrere Hypothesen abgeleitet worden:

1. **Primäre neuronale Schädigung** führt zur Denervation des autonomen parasympathischen Systems im Herzen. Eine langsame Zunahme neuronaler Schäden im Verlauf der Pathogenese der Kardiomyopathie wurde nachgewiesen. Die primäre neuronale Schädigung wird heute als Epiphänomen in Folge von Entzündungsprozessen angesehen.
2. ***T. cruzi* und/oder *T. cruzi*-Produkte sind** nach intrazellulärer Infektion **kardio-toxisch**. Allerdings wird davon ausgegangen, dass dieser Mechanismus in der chronischen Chagas-Phase hauptsächlich bei hohem intrazellulärem Parasitentiter, beispielsweise bei immunsupprimierten Patienten, bedeutsam ist.
3. **Parasiten-induzierte mikrovaskuläre Veränderungen** führen zur Hypoperfusion und in der Folge zu hypoxisch/ischämischer Kardiomyozytenschädigung, die in eine chronisch-entzündliche Reaktion im Herz mündet.
4. **Polyklonale Aktivierung von B-Zellen** nach der Infektion greift in die Immunregulation ein und führt zu Immunsuppression und Autoimmunität.
5. **Persistierende *T. cruzi*-Antigene** induzieren T-Zell vermittelte Reaktionen vom Typ der verzögerten Überempfindlichkeit (*delayed-hypersensitivity*, DTH), was mit Schädigung des Wirtsgewebes einhergeht.
6. **Autoimmunität, induziert durch *T. cruzi*-spezifische Antigene**, die sich gegen kreuz-reagierende Wirtsantigene richtet (**Molekulares Mimikry**).
7. **Autoimmunität, induziert durch Antigene des Wirtes**, die im Verlauf der Parasiten-induzierten Gewebeschädigung dem Immunsystem zugänglich werden (**Bystander-Aktivierung**).

Gegenwärtig kann nicht davon ausgegangen werden, dass einer der angeführten Mechanismen Exklusivität beanspruchen kann. Dennoch sind in den vergangenen Jahren immer mehr Hinweise auf eine zentrale Stellung der Autoimmunität gesammelt worden. Unterstützt wird die Autoimmunitätshypothese durch die in der Regel geringe Anzahl von Parasiten, die im Myokard bei der Chagas-Kardiomyopathie gefunden werden.

Gironés et al.²¹ haben verallgemeinernd Molekulares Mimikry, Bystander-Aktivierung und deren wechselseitige Interaktionen im Rahmen der *T. cruzi*-induzierten Autoimmunität dargestellt (Abb. 9).

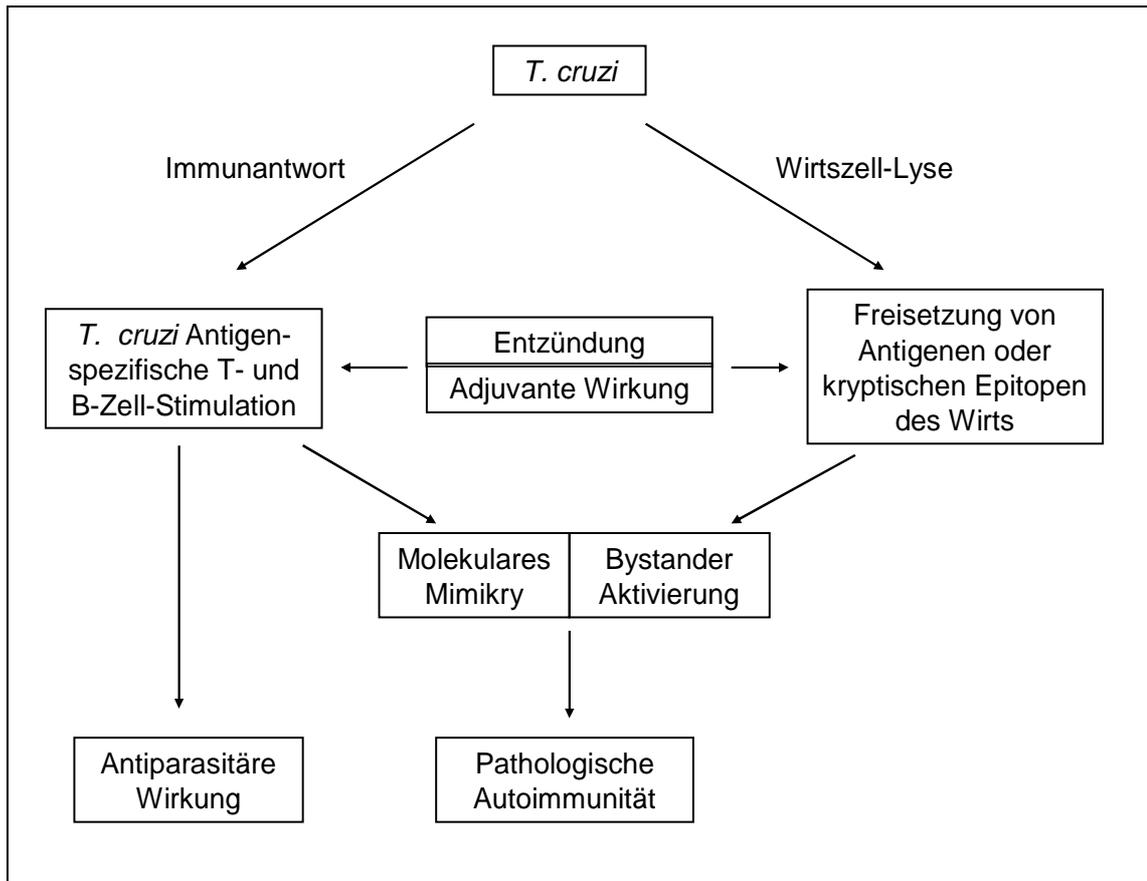


Abb. 9 Verschiedene Mechanismen der Induktion der Pathogenität von *T. cruzi*.

Die durch Bystander-Aktivierung ausgelöste Autoimmunität geht davon aus, dass die primäre Infektion mit *T. cruzi* myokardiale Strukturen des Infizierten schädigt, wodurch normalerweise der Immunantwort entzogene Antigene präsentiert werden. Es wird angenommen, dass der Parasit proinflammatorische Bedingungen im Gewebe schafft, die durch Freisetzung von Zytokinen, NO und Chemokinen gekennzeichnet sind. Dies führt zur Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen, die anschließend in Gegenwart der durch die Myozytolyse immunogen gewordenen Wirtsantigene proliferieren.

Intensiver als die Bystander-Aktivierung wird jedoch Molekulare Mimikry als Ursache von Autoimmunität in Chagas-Patienten diskutiert und damit für die Pathogenese der Chagas-Kardiomyopathie verantwortlich gemacht. Dies beruht darauf, dass in den vergangenen Jahren für verschiedenste *T. cruzi*-Antigene und Wirtsantigene Kreuzreaktivität nachgewiesen wurden. Tab. 2 zeigt - basierend auf Cunha-Neto et al.¹⁴ - kreuzreagierende *T. cruzi*- und Wirtsantigene mit vermuteter pathogener Funktion in der Chagas-Kardiomyopathie.

Tab. 2 Molekulares Mimikry: Kreuzreaktivität von *T. cruzi*-Antigenen und Wirtsantigenen

Wirtsantigene	<i>T. cruzi</i>-Antigen	Wirt
1. Neuronen, Leber, Nieren, Testis	Unbekannt	M, R
2. Neuronen	sulfatierte Glykolipide	H, R
3. Neuronales 47 kDa Protein	FL-160	H
4. Herz- und Skelettmuskel	mikrosomale Fraktion	H, M
5. Glatter und quergestreifter Muskel	150 kDa Protein	H, M
6. Schwere Kette des humanen Herz-Myosins	B13 Protein, Cruzipain	H, M
7. 95kDa Myosin-Peptid	<i>T. cruzi</i> -Zytoskelett	M
8. Ca ⁺⁺ sensitives Skelettmuskel sarcoplasmatisches Reticulum-Antigen	sarcoplasmatisches Reticulum-Antigen	H, Rb
9. Glykosphingolipide	Glycosphingolipide	H, M
10. Microtubuli-assoziiertes Protein (MAP) (Gehirn)	MAP	H, M
11. Basisches Myelin-Protein	<i>T. cruzi</i> -löslicher Extrakt	M
12. 28 kDa Lymphozytenmembran-Protein	55 kDa Membran-Protein	H, M
13. 23 kDa ribosomales Protein	23 kDa ribosomales Protein	H
14. Ribosomales P-Protein	Ribosomales P-Protein	H
15. 38-kDa Herz-Antigen	R13 Peptid des ribosomalen Protein P1, Protein P2	M
16. beta1-Adrenorezeptor, M2-muscarinerge Rezeptor	Ribosomale P0- und P2beta-Protein	H
17. beta1-Adrenorezeptor, M2 cholinerge Rezeptor	150 kDa Protein	H, M
18. Kardialer muscarinerge Acetylcholin-Rezeptor	Unbekannt	H
19. Kardialer muscarinerge Acetylcholin-Rezeptor	Cruzipain	M
20. Cha-Antigen	shed acute phase antigen (SAPA), 36 kDa Protein	M

H, Mensch; M, Maus; Rb, Kaninchen; R, Ratte.

Nach Immunisierung mit den oben aufgeführten *T. cruzi*-Antigenen und/oder Übertragung von *T. cruzi*-aktivierten T-Zellen, zeigten sich die auch für die Chagas-Kardiomyopathie typischen strukturellen und funktionellen Störungen im Herz wie fokale Myokarditis, Demyelinisierung, Reizleitungsdefekte, Bildung funktioneller agonistischer Rezeptor-Autoantikörper, Kontraktilitätsminderung und gestörte Ca-abhängige Funktionen.

Gestützt wird die Autoimmunhypothese der chronischen Chagas-Herzkrankheit durch Befunde, die darauf hinweisen, dass nach der akuten *T. cruzi*-Infektion Antigene vorliegen bzw. T-Zellklone induziert werden, die langfristig im Wirt persistieren können.³¹ Unter den in der Tab. 3 aufgeführten humanen Antigenen, für die mit *T. cruzi*-Antigenen starke molekulare Ähnlichkeiten gezeigt wurden, befinden sich mit dem beta1-Adrenorezeptor und dem muscarinergen Acetylcholinrezeptor G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Bedeutung im Rahmen der Autoimmunhypothese der Chagas-Herzkrankheit zunehmend deutlicher wird. Insbesondere für die nach *T. cruzi*-Infektion gebildeten beta1-Adrenorezeptor-Autoantikörper lassen sich aufgrund ihrer Vergleichbarkeit mit den beta1-Adrenorezeptor-Autoantikörpern von Patienten mit Idiopathischer Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) vielfältige pathogene Funktionen postulieren. Hobecke et al. sprechen von einem „cross talk“ der beta1-Adrenorezeptor-Autoantikörper von Chagas-Patienten und Patienten mit DCM.³² Besonders schwer wiegen dabei Studien, in denen gezeigt wurde, dass einerseits der Transfer von beta1-Adrenorezeptor-Autoantikörpern im Rattenmodell zu kardiomyopathie-typischen Veränderungen führt³³ und dass andererseits DCM-Patienten von therapeutischen Maßnahmen (Immunadsorption), die zur Eliminierung der beta1-Adrenorezeptor-Autoantikörper führen, profitieren.^{34,35}

Tab. 3 Beispiele für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und funktionelle Auto-Antikörper

Rezeptor	Erkrankung	AAK Effekt	Epitop
α 1-R	Hypertonie	Agonist	Loop 1,2
β 1-R	Dilatative Kardiomyopathie	Agonist	Loop 1,2
β 1-R	Myokarditis	Agonist	Loop 1,2
β 1-R	Chagas-Erkrankung	Agonist	Loop 2
β 2-R	Chagas-Erkrankung	Agonist	Loop 2
β 2-R	Allergisches Asthma	Inhibitor	Loop 3
AT1-R	Präeklampsie	Agonist	Loop 2
AT1-R	Maligne Hypertonie	Agonist	Loop 2
AT1-R	Akzelerierte vaskuläre Nierenabstoßung	Agonist	Loop 2
Muscarin M2-R	Chagas-Erkrankung	Agonist	Loop 2
Muscarin M2-R	Dilatative Kardiomyopathie	Agonist	Loop 2
5HT4-R	Systemischer Lupus erythematodes	Agonist	Loop 2
Nikotin AcCh-R	Myasthenie gravis	Inhibitor	N-Terminal extrazelläre Domäne (aa 183-200)
Glutamate Rezeptor (GluR3)	Rasmussen Enzephalitis, Nicht Entzündliche fokale Epilepsie, Katastrophe Epilepsie	Agonist	aa 372-386
TSH-R	Graves-Krankheit	Agonist	Extrazellulär Domäne, konformational Epitope

5HT4-R, Serotonin-Rezeptor; α -R, α -Adrenerger- Rezeptor; β -R, β -Adrenerger-Rezeptor; AT1-R, Angiotensin II-Rezeptor 1; M2-R, M2-Rezeptor; TSH, Thyroidea stimulierendes Hormon; aa, Aminosäure; AAK, Auto-Antikörper

2.5.2. Auto-Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) gehören zur Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine. Ca 80 % aller Rezeptoren gehören zu dieser Familie. Sie sind sowohl in Pflanzen als auch im Tierreich verbreitet. Im Tierreich sind sie an der Verarbeitung von Sinnesreizen, bei Entzündungsprozessen, Chemotaxie, Endo- und Exozytose, Zellwachstum und -differenzierung sowie an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt. Die Wirkung von glandulären Hormonen, Gewebshormonen und Neurotransmittern wie Katecholaminen, Glukagon, Endothelin, Angiotensin, Acetylcholin, Serotonin u.a. werden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Die Funktion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht in der transmembranösen Signalübertragung. Dazu werden nach Bindung eines Liganden an eine der extrazellulären Domänen des Rezeptors und nachfolgender Konformationsänderung heterotrimere GTP-bindende Proteine (G-Proteine) aktiviert. Im inaktiven Zustand ist das G-Protein mit GDP beladen und an intrazellulären Domänen des Rezeptors assoziiert. Im Verlauf der durch die Ligandenbindung induzierten Aktivierung des G-Proteins wird GDP durch GTP ausgetauscht. Dies führt zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins, dessen so aktivierte Untereinheiten nun die Aktivität weiterer Proteine modulieren, die über die Bildung von „Second Messengers“ die Signale zu den Zielstrukturen weiterleiten. Nach Spaltung von GTP zu GDP und Phosphat durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit reassoziert das G-Protein zum inaktiven Zustand.

Ausgehend von der zentralen Stellung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der Stoffwechselregulation ist es nicht verwunderlich, dass Störungen in diesem System der Signalübertragung pathogenetische Konsequenzen nach sich ziehen. Bereits seit längerem stehen gegenüber G-Protein-gekoppelten Rezeptoren agonistisch wirkende Auto-Antikörper im Verdacht, bei verschiedensten Erkrankungen pathogenetisch wirksam zu sein. Tab. 3 zeigt, basierend auf Wallukat et al., derartige Erkrankungen und die in entsprechenden Patienten gefundenen Auto-Antikörper. Für die chronische Chagas-Erkrankung mit Herz- bzw. Darmmanifestation sind dies insbesondere Auto-Antikörper gegen den beta1- und beta2-Adrenorezeptor sowie den muscarinergen M2-Rezeptor, deren agonistische Wirkungen (positiv chronotrop für beta1- und beta2-Rezeptor-Autoantikörper, negativ chronotrop für M2-Rezeptor-Autoantikörper) an neonatalen Rattenherz-Kardiomyozyten gezeigt wurde.

Es wurde nachgewiesen, dass chronisch infizierte Chagas-Patienten zu 29 % positiv für beta1-Rezeptor-Autoantikörper, zu 12 % positiv für beta2-Rezeptor-Autoantikörper und zu 77 % positiv für muscarinerge M2-Rezeptor-Autoantikörper waren.^{36,37,38} Ein Subtyp

der Auto-Antikörper von Chagas-Patienten bindet sich sowohl am muscarinergen M2- als auch am beta1-Rezeptor.³⁹

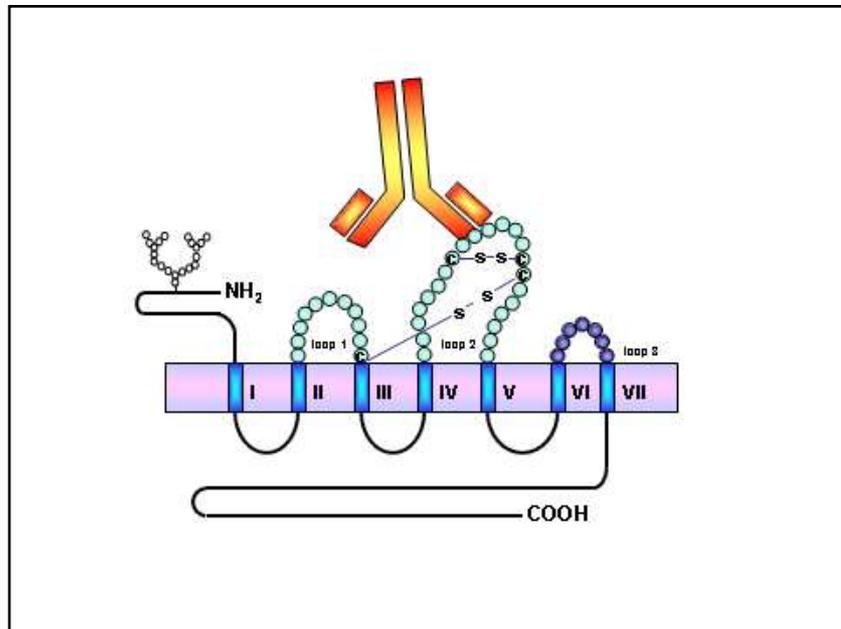


Abb. 10 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Antikörper. (Reproduktion mit Erlaubnis von R. Kunze, Berlin)

Abb. 10 zeigt schematisch den Aufbau G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und ihre Interaktion mit Auto-Antikörpern.³⁹ Während der N-Terminus in seiner Länge relativ ähnlich für die drei Rezeptoren ist, variiert die Länge des C-Terminus innerhalb der drei Rezeptoren. Die helikalen Transmembranregionen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind stark konserviert. Die Auto-Antikörper binden an den extrazellulären Loops bzw. an äußeren Bereichen der transmembranösen Strukturen. Für die bei der Chagas-Erkrankung gefundenen Auto-Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde gezeigt, dass sich diese an negativ geladenen Regionen des zweiten extrazellulären Loops binden.⁴⁰ Durch die Auto-Antikörperbindung an Rezeptoren kommt es zur Rezeptor-Dimerisierung, was zu einer Stabilisierung der aktiven Konformation des Rezeptors führt. Dies wurde insbesondere für den muscarinergen M2-Rezeptor und für den beta1-Rezeptor gezeigt.^{41,42} In Gegenwart von entsprechenden monovalenten F_{ab} -Fragmenten ist dagegen diese Stabilisierung nicht möglich, kann aber erreicht werden, wenn die Rezeptor-gebundenen monovalenten F_{ab} -Fragmente nachfolgend mit anti- F_{ab} -Antikörpern verbunden werden. Entsprechend der beobachteten positiven Chronotropie der beta-Rezeptor-Autoantikörper und der negativen Chronotropie der muscarinergen

M2-Rezeptor-Autoantikörper sollten Aktivierung bzw. Hemmung der Adenylatcyclase ein zentrales Ereignis der Autoantikörper-induzierten Rezeptor-Dimerisierung und Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation sein. Damit in Übereinstimmung steht, dass Inkubation von Herzzellmembranen mit IgG von Patienten mit Chagas-Erkrankung zur Stimulation der Adenylatcyclase führte. Parallel dazu konnte am isolierten Atriumgewebe und an Herzzellen eine gesteigerte Kontraktilität nach Inkubation mit dem Chagas-Patienten-IgG beobachtet werden.^{43,44} Inkubation von Herz- bzw. Milzzellen mit beta1- bzw. beta2-Rezeptor-Autoantikörpern von Chagas-Patienten führte darüber hinaus zur Zunahme der cAMP-Konzentration.^{45,44} Damit einhergehend wurde eine Aktivierung der Proteinkinase A beobachtet.⁴⁶ Von anderen Autoren wird dagegen darauf hingewiesen, dass die Zunahmen der cAMP-Konzentration nur gering sind. In diesen Untersuchungen wurden allerdings beta1-Rezeptor-Autoantikörper untersucht, die aus Patienten mit Idiopathischer Dilatativer Kardiomyopathie stammten.^{47,48} Als eine weitere typische Reaktion in Gegenwart von beta1-Rezeptor-Autoantikörpern wurde die Aktivierung des L-Typ Calciumkanals^{49,50} in Kardiomyozyten beschrieben. Dies kann einerseits als Ergebnis der Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierung des Kanals betrachtet werden, andererseits auch aus einer direkten Interaktion der aktivierten G-Protein-Untereinheiten mit den Kanalproteinen resultieren.^{51,52} Bei der Myokarditis und der Dilatativen Kardiomyopathie geht man heute vor allem davon aus, dass die Autoantikörper-abhängigen Veränderungen im Kalziumfluss eine wichtige pathogenetische Komponente darstellen.⁵³

Wie bereits dargestellt, wird die Schädigung des parasympathischen Systems als eine Komponente in der Pathogenese der Chagas-Kardiomyopathie angesehen. An Rattenatrium wurde gezeigt, dass muscarinerge M2-Autoantikörper die Kontraktilität vermindern, cGMP erhöhen und die cAMP-Bildung vermindern.⁵⁴ Darüber hinaus wird vermutet, dass insbesondere die gastrointestinale Manifestation sichtbar am typischen Megakolon bzw. Megaösophagus durch muscarinerge M2-Autoantikörper-abhängige Pathomechanismen begünstigt wird. M2-Autoantikörper erhöhen an Colon- und Ösophagussteifen den Basaltonus und vermindern die cAMP-Konzentration.^{55,56}

Man geht davon aus, dass - nach Bindung muscarinerner M2-Rezeptor-Autoantikörper an den Rezeptor - Pertussistoxin-sensitive G-Proteine den hemmenden Effekt auf die Adenylatcyclase vermitteln. Zusätzlich wird diskutiert, dass den agonistischen Effekten der muscarinergen M2-Autoantikörper Rezeptordesensibilisierung und -sequestrierung folgen, was die Disautonomie von Colon und Ösophagus verstärken kann.⁵⁷

2.6. Laboratoriumsmedizinische Diagnostik

2.6.1. Infektionsdiagnostik

Der direkte Nachweis von *T. cruzi* im peripheren Blut, insbesondere bei ausreichender Erregerzahl, wie sie in der akuten Phase beobachtet wird, kann mittels Ausstrich oder mit Hilfe des sog. „Dicken Tropfens“ erfolgen. Diese Verfahren sind in der chronischen Phase nur bedingt einsetzbar, da die Erregerzahl aufgrund ihrer intrazellulären Vermehrung in dieser Phase im Blut sehr gering ist. Die empfindlichste Nachweismethode scheint die Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Detektion parasitenspezifischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu sein, die auch bei der Aufarbeitung von Gewebeproben gut einsetzbar ist.^{3,58,59,60} Im chronischen Stadium lassen sich mit Hilfe konventioneller serologischer Tests wie Indirekte Immunfluoreszenz (IIF), Indirekte Hämagglutination (IHA), Enzymegekoppelter Immunoassay (ELISA)^{3,61} bei über 95 % der Patienten anti-*T. cruzi*-Antikörper vom IgG-Typ detektieren. Im akuten Stadium sind IgM-Antikörper nachweisbar.³

2.6.2. Laboratoriumsdiagnostik zum Nachweis des Überganges von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase

Bisher existieren keine, in den Routinebetrieb der Laboratoriumsmedizin übernommene kommerziell verfügbaren Marker, die, im Vergleich zu den üblichen Untersuchungstechniken (EKG, Echokardiografie, Radiologie), frühzeitiger oder wenigstens (da die konventionellen Techniken kostenintensiv sind) zeitlich parallel zu diesen Hinweise auf beginnende kardiale bzw. intestinale Manifestation der chronischen Chagas-Erkrankung zulassen. Prinzipiell denkbar erscheint der Einsatz von organunspezifischen Markern, die sich aus den Pathomechanismen ableiten sowie spezifische Marker, die gezielt die kardiale bzw. intestinale Schädigung anzeigen.

2.6.2.1. Organunspezifische Marker

Ausgehend von der generellen Bedeutung, die entzündlichen Prozessen in der Genese der Chagas-Spätschäden zukommt, könnten Entzündungsmarker potentiell geeignet sein, frühzeitig Hinweise auf die beginnende Organmanifestation bei der Chagas-

Erkrankung zu geben. Da der Entzündungsprozess eng mit der Bildung von Oxidativem Stress verbunden ist, bieten Marker zur Quantifizierung von Oxidativem Stress eine weitere potentielle Möglichkeit, den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase anzuzeigen.

2.6.2.1.1. Entzündungsmarker - C-reaktives Protein (CRP) und Zytokine

CRP wird in der Leber gebildet und gehört zu den Akut-Phase-Proteinen. Im Verlauf einer infektiösen oder nicht-infektiösen Entzündung werden von Leukozyten Zytokine freigesetzt. Insbesondere IL-6 stimuliert die CRP-Synthese in der Leber. Akute Entzündungen sind in der Regel mit mehr als 20-facher CRP-Erhöhung verbunden. Bakterielle Infektionen führen im Vergleich zu viralen Infektionen zu höheren CRP-Konzentrationen. Bei konventionellen Autoimmunkrankheiten (Rheumatoide Arthritis) werden Werte über dem Referenzbereich gefunden. Neue Testverfahren (Hochsensitiver-Test, hsCRP) ermöglichen die Quantifizierung von CRP im Referenzbereich. Bereits innerhalb des Referenzbereiches erhöht sich bei steigendem CRP-Wert das kardiovaskuläre Risiko.⁶² Bei Chagas-Patienten wurden CRP-Erhöhlungen in der akuten Phase der Erkrankung,⁶³ aber auch nach Manifestation einer Herzinsuffizienz beschrieben.⁶⁴ Auch ein erhöhtes IL-6 wurde bei Chagas-Patienten gefunden. Aus der beobachteten Korrelation der IL-6-Konzentration im Blut und dem Schweregrad der Herzkrankheit wurde ein prognostischer Wert dieses Markers postuliert. In vitro ließen sich im Kulturmedium von *T. cruzi*-infizierten Endothelzellen erhöhte IL-6-Konzentrationen nachweisen.⁶⁵

Auch für andere Zytokine (siehe Tabelle 4) wie $TNF\alpha$, IL-2, IL-8, IL-12, und lösliche Rezeptoren wie sIL-2R, sCD8 und sCD4 wurde eine Zunahme im Blut insbesondere in der akuten Phase postuliert, jedoch ohne statistische Signifikanz.^{66,67}

Vergleichbare Postulate wurden auch für sIL-2R aus anderen Untersuchungen abgeleitet.^{68,69}

Tab. 4 Zytokine und Zytokinrezeptoren, die in Studien an Chagas-Patienten untersucht wurden

Zytokin	Herkunft	Zielzellen	Immunologische Effekte
IL-2	T- Zellen	T-, B- und NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten	Funktion: T-Zellaktivierung; klonale Expansion; Induktion von Apoptose; Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen; Aktivierung von NK- und B-Zellen; Monozyten und Granulozyten
IL-6	T- und B-Zellen, Monozyten,	B-, T- und NK-Zellen, Thymozyten	Klassisches proinflammatorisches Zytokin; Akutphasereaktion; Effekte auf Zellwachstum, Differenzierung und Aktivierung; Osteoklastenaktivierung
IL-8	T-Zellen, Monozyten, Granulozyten	T- und B-Zellen, Mastzellen und Thymozyten	Mediator einer akuten Entzündung; Leukozytenaktivierung -chemotaxis und -adhäsion
IL-10	T-Zellen und Mastzellen, Keratinozyten Monozyten,	T-, NK- und B-Zellen, Mastzellen und Monozyten	Begrenzung der Entzündung durch Effekte auf Monozyten; inhibiert Interleukin 12; reguliert Wachstum und Differenzierung von B-, T- und NK Zellen, Mastzellen und Granulozyten
TNF- α und TNF- β	Monozyten, T- Zellen NK- Zellen,	Monozyten, Granulozyten, Gefäßendothel	Proinflammatorisches Zytokin, Antitumoreffekte
sIL-2R	T-Zellen		Rezeptor für IL-2
sCD8	T-Zellen		Rezeptor für MHC-I- Komplex
CD4	T-Zellen, Makrophagen, Momozyten		Rezeptor für MHCII-Komplex

2.6.2.1.2. Marker des Oxidativen Stress

Leukozyten, vor allem Granulozyten und Makrophagen sind wichtigen Quellen für reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*, ROS). Aufgrund ihrer Reaktionsfähigkeit reagieren ROS mit verschiedensten Biomolekülen. Solche Reaktionen sind für viele Stoffwechsellleistungen essentiell. So ist die Phagozytose von Parasiten unabdingbar an die Bildung von ROS gebunden. Es wurde gezeigt, dass neutrophile Granulozyten die Fähigkeit zur Amastigoten-Phagozytose verlieren, wenn sie mit Natriumazid (NaN_3), Kaliumcyanid (KCN) (Inhibitoren der Myeloperoxidase-Aktivität) oder dem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) abbauenden Enzym Katalase inkubiert werden.⁷⁰

Bei einer überschießenden Aktivierung von Makrophagen (akute Entzündung) oder Dauerstimulation bei chronischer Entzündung, aber auch im Zuge chronisch ischämischer bzw. hypoxischer Zustände, wie sie bei Herzinsuffizienz vorkommen können, übersteigt die Bildung von ROS den physiologischen Bedarf. Die Folge sind unspezifische, in der Regel zytotoxische Reaktionen, die allgemein als Oxidativer Stress bezeichnet werden.^{71,72}

Wie für die Herzinsuffizienz allgemein, wird auch für die Chagas-Kardiomyopathie Oxidativer Stress als ein pathogenetisches Element angesehen.⁷³

Dies hat Studien initiiert, in denen die protektive Wirkung von Antioxidantien geprüft wurde.⁷⁴

Ein Bindeglied zwischen Parasitenabwehr und überschießender Produktion von ROS und damit von Oxidativem Stress ist die Myeloperoxidase, die in neutrophilen Granulozyten, Monozyten, diversen Gewebsmakrophagen wie etwa Kupfferschen Sternzellen und Zellen der Mikroglia exprimiert wird und für die Produktion des toxischen Hypochlorides verantwortlich ist. Die Myeloperoxidase wurde bisher hauptsächlich als Prognosemarker beim akuten Koronarsyndrom und bei Herzinsuffizienz eingesetzt.⁷⁵ Bisher liegen keine Untersuchungen vor, in denen die Myeloperoxidase in klinischen Studien an Chagas-Patienten als Marker für den Oxidativen Stress genutzt wurde.

Andere Marker zur Charakterisierung von Oxidativem Stress in Patientenstudien resultieren aus der Oxidation von polyungesättigten Fettsäuren durch ROS. Dazu gehören Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (Malondialdehyd, MDA) und Lipidperoxide.

Studien zeigen, dass MDA als Marker in der akuten Phase der Chagas-Erkrankung benutzt werden kann.^{76,77,78} Lipidperoxid-Bestimmungen wurden bisher in klinischen Studien nicht eingesetzt.

2.6.2.2. Organspezifische Marker

Bisher ist kein laboratoriumsmedizinischer Marker bekannt, der erfolgreich zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung der gastrointestinalen Manifestation der chronischen Chagas-Erkrankung eingesetzt werden kann. Ob ein Marker wie intestinales Fettsäure-bindendes Protein, für den ein kommerziell verfügbarer Test vorhanden ist und der in klinischen Studien bei Ischämien und massiven Entzündungen im Darm erhöht gefunden wurde,^{79,80} bei der intestinalen Manifestation der Chagas-Erkrankung zur Diagnose und Verlaufsbeobachtung eingesetzt werden kann, ist bisher nicht untersucht.

Im Gegensatz dazu sind kardiale Troponine wie Troponin T und I (cTnT, cTnI) und B-Typ-natriuretisches Peptid (BNP) etablierte Marker in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Herzkrankheit wie Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz.^{81,82,83,84}

Im Hinblick auf die Chagas-Kardiomyopathie existiert bereits eine Reihe von Studien, die den Stellenwert von BNP als Marker insbesondere in der Verlaufskontrolle belegen.

Ausgehend von den fokalen Entzündungsherden im Chagas-Herz und den damit einhergehenden Mikroläsionen, erscheint es prinzipiell denkbar, dass die Bestimmung von kardialen Troponinen (cTn) Hinweise auf den Übergang von der asymptomatischen Chagas-Erkrankung zur Chagas-Erkrankung mit Herzmanifestation liefern kann.

2.6.2.2.1. B-Typ-natriuretisches Peptid

Das B-Typ-natriuretische Peptid (*Brain natriuretic peptide*, BNP)^{85,86} (nach seiner Entdeckung im Schweinegehirn früher als Brain-natriuretisches Peptid bezeichnet) gehört neben dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP) zu den natriuretischen Peptiden (ANP, CNP). BNP wird in den Ventrikeln synthetisiert. Bei Herzinsuffizienz wird es verstärkt im Herz gebildet und anschließend ins Blut sezerniert. Nach der Synthese von proBNP wird dieses im Kardiomyozyten prozessiert, wobei das biologisch inaktive NT-proBNP und das aktive Hormon BNP entstehen. Für beide Metabolite sind kommerzielle Tests verfügbar. Stimulus für die BNP-Synthese ist die Wanddehnung (Drucküberlastung, Volumenüberlastung). Darüber hinaus sind verschiedenste andere Stressoren u.a. Ischämie und Oxidativer Stress bekannt, die zu gesteigerter BNP-Sekretion führen. Die Funktion des BNP besteht in der Regelung des Wasserhaushalts und des Blutdrucks über die Steigerung von Natriurese und Vasodilatation.

Inzwischen liegen umfangreiche Daten zum Einsatz sowohl von NT-proBNP als auch von BNP zur Diagnostik, Verlaufsbeurteilung und Therapiekontrolle bei Herzinsuffizienz vor.⁸⁷

Bei der Chagas-Erkrankung wurden im Vergleich zu asymptomatischen Patienten bei Patienten mit manifester Kardiomyopathie wiederholt erhöhte BNP- bzw. NT-proBNP-Werte im Blut gemessen. Dabei waren Korrelationen zum Schweregrad nachweisbar.^{88,89,90,91,92}

Widersprüchlich sind die Ergebnisse hinsichtlich der BNP-Konzentration in der frühen Phase der Herzmanifestation. Einerseits unterschieden sich Patienten, die sich nach klinischen Gesichtspunkten in der asymptomatischen Phase befanden, jedoch bereits in unterschiedlichem Ausmaß durch Ventrikellarrhythmie und Ventrikeldysfunktion gekennzeichnet waren, nicht in ihrer BNP-Konzentration.⁹³ Andererseits wurde gezeigt, dass BNP bereits in Chagas-Patienten erhöht ist, obwohl keine Ventrikeldysfunktion nachweisbar war.⁹⁴ Die BNP-Konzentration konnte dabei als prognostischer Marker im Hinblick auf die Mortalität ausgewiesen werden.⁹⁵

2.6.2.2.2. Kardiale Troponine

Die kardialen Troponine (cTn), von denen diagnostisch cTnT und cTnI genutzt werden können, sind integrale Bestandteile des kontraktilen Apparates. Ein geringer (< 10%) Anteil der Troponine liegt zytosolisch vor. Neben der Funktion als Nekrosemarker, werden zunehmend physiologische Stressoren und milde Herzpathologien, darunter entzündliche Zustände, beschrieben, die zu Troponin-Erhöhungen im Blut führen. Es wird vermutet, dass dies aus der Freisetzung des zytosolischen cTn-Anteils resultiert.^{96,97}

Für die Chagas-Kardiomyopathie liegen bisher drei Untersuchungen vor, in denen Troponin im Serum untersucht wurde.

Es wurde über einen männlichen Chagas-Patienten berichtet, bei dem nach angiographischem Ausschluss einer koronaren Herzkrankheit eine cTnT-Erhöhung nachweisbar war.⁹⁸ In zwei andere Studien zeigten sich Troponin-Erhöhungen überhaupt nicht oder nur bei einigen Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie.^{99,100}

Möglicherweise eröffnen sich zukünftig durch den Einsatz neuer sogenannter „hochsensitiver Troponin-Assays“ bessere Möglichkeiten mit Hilfe von Troponin-Bestimmungen einen Beitrag zur Diagnose, Verlaufskontrolle und Prognose der Chagas-Herzkrankheit zu leisten. Die Überlegenheit der hochsensitiven Assays gegenüber den bisher genutzten Troponin-Assays ist bereits belegt worden.^{101,102}

2.7. Therapie

In der akuten Phase werden bevorzugt zwei Präparate zur Elimination der Parasiten eingesetzt, Nifurtimox und Benznidazol.^{5,9,103} Sie unterscheiden sich in ihrer Anwendungsdauer (Nifurtimox: 50-120 Tage; Benznidazol: ca. 60 Tage). Bei einigen *T. cruzi*-Stämmen konnten inzwischen Resistenzen gegen die genannten Mittel aufgezeigt werden. Die Wirkung der Chemotherapeutika in der chronischen Phase ist begrenzt, da die morphologischen Schäden bereits eingetreten sind. Daher steht bei der chronischen Erkrankung eine symptomatische Behandlung im Vordergrund. Allgemein wird die Chemotherapie bei der Chagas-Erkrankung als problematisch angesehen, denn die bisher im klinischen Einsatz befindlichen Medikamente besitzen erhebliche toxische Nebenwirkungen, die u.a. auf den langen Zeitraum der Verabreichung zurückzuführen sind und insbesondere an der Leber beobachtet bzw. als allergische Reaktion sichtbar werden. Außerdem sind die Präparate in einigen endemischen Ländern nicht in genügendem Ausmaß erhältlich oder sehr teuer. Insgesamt wird beschrieben, dass die Präparate nur bei 50 % der Patienten wirken.

Nach Manifestation der Chagas-Herzkrankheit steht ein breites Spektrum therapeutischer Möglichkeiten zur Verfügung, das sich von der allgemein üblichen Therapie der Herzinsuffizienz ableitet und von der medikamentösen Therapie über Schrittmacher- und Defibrillatorimplantation bis zur Herztransplantation reicht.^{104,105}

Im Mittelpunkt der Therapie der gastrointestinalen Manifestation der chronischen Chagas-Erkrankung insbesondere beim Megakolon, - steht neben der Verabreichung von Abführmitteln (Kolektomie) noch immer die chirurgische Intervention.

2.8. Problemstellung

Trotz der - in Tabelle 1 dargestellten - deutlichen Reduktion der Erkrankungshäufigkeit stellt die chronische Chagas-Erkrankung noch immer eine der führenden Ursachen für den vorzeitigen Tod in den Ländern Lateinamerikas dar und erfordert auch in Zukunft größte Anstrengungen des Gesundheitswesens. Insbesondere die Chemotherapie zur Erregerelimination hat bisher nicht den erhofften Erfolg gebracht. Darüberhinaus sind Nebenwirkungen für den Patienten und eine mögliche Induktion von Erregerresistenz nicht zu vernachlässigen. Neue Medikamentenentwicklungen leiden zunehmend daran, dass sich die Entwicklungskosten unter den gegenwärtigen sozio-ökonomischen Bedingungen in weiten Teilen Lateinamerikas nicht oder nur sehr langfristig amortisieren werden. Möglicherweise ist darin auch ein Grund zu suchen, dass die Entwicklung vielversprechender Substanzen im Tierexperiment abgebrochen wurde.³

Wenn gegenwärtig kein therapeutisches Konzept existiert, um den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase der Chagas-Erkrankung zu verhindern, so erscheint es umso wichtiger,

1. die Patienten herauszufinden, die ein hohes Risiko für die Entwicklung von Chagas-Herzkrankheit und intestinaler Krankheit besitzen und
2. frühzeitig den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen chronischen Chagas-Erkrankung zu erkennen, um diese Patienten, wenn möglich früher als bisher, den etablierten Therapieverfahren für Kardiomyopathie und Megakolon zuzuführen.

Geht man davon aus, dass trotz lebenslanger Persistenz von *Trypanosoma cruzi* "nur" ca. ein Drittel der Patienten von der asymptomatischen Phase (Indeterminate Phase) in die symptomatische chronische Chagas-Erkrankung mit der Manifestation als Chagas-Herzkrankheit bzw. intestinale Chagas-Erkrankung übergeht, würden sich erhebliche Kosteneinsparungen für das Gesundheitswesen ergeben, wenn es möglich wäre, dieses eine Drittel der Patienten, die ein hohes Risiko für den Übergang in die symptomatische Phase besitzen, bereits in der asymptomatischen Phase zu erkennen.

Unter Berücksichtigung der Autoimmunhypothese der chronischen Chagas-Erkrankung mit Herzmanifestation bzw. intestinaler Manifestation und der in diesem Rahmen diskutierten Funktion von Auto-Antikörpern gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren postulieren wir, dass sich Chagas-Herzkrankheit und intestinale Krankheit durch ein unterschiedliches Auto-Antikörpermuster unterscheiden könnten. Dies würde die Autoimmunhypothese der chronischen Chagas-Erkrankung stützen. Der Nachweis von

spezifischen Auto-Antikörpermustern bereits in der asymptomatischen Phase könnte das Risiko der Patienten dokumentieren, zur Gruppe der Patienten zu gehören, die von der asymptomatischen in die symptomatische chronische Chagas-Erkrankung übergehen. In Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb das Muster von Auto-Antikörpern gegen beta1- und beta2-Adrenorezeptoren und muscarinergen M2-Rezeptoren in einem Bioassay in asymptomatischen chronischen Chagas-Patienten (Indeterminate Phase) und symptomatischen Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie und Megakolon bestimmt. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Verlaufsuntersuchungen durchgeführt wurden, wird der Nachweis spezifischer Auto-Antikörpermuster in der asymptomatischen Phase zur Abschätzung des Risikos für die Entwicklung von Chagas-Spätschäden aus dem Vergleich mit epidemiologischen Daten zur Häufigkeit der Spätschäden postuliert.

Im Hinblick auf die frühzeitige Diagnose des Überganges von der asymptomatischen zur symptomatischen chronischen Chagas-Erkrankung wird geprüft, ob die gegenwärtig eingesetzte elektrophysiologische und radiologische Diagnostik zum Nachweis von Chagas-Herzkrankheit und intestinaler Chagas-Erkrankung durch kostengünstigere, möglicherweise die Erkrankungen frühzeitiger anzeigende Untersuchungsverfahren ergänzt oder ersetzt werden kann.

Erfolgversprechend erscheinen uns dabei Methoden der biochemischen Analytik insbesondere in ihrer standardisierten und automatisierten Form, wie sie im Rahmen der Laboratoriumsmedizin entwickelt und eingesetzt werden. Die Laboratoriumsmedizin bietet den Vorteil hochsensitiver Nachweismethoden bei im Vergleich zur elektrophysiologischen und radiologischen Diagnostik geringeren Kosten. Zusätzlich sind Elektrophysiologie und Radiologie zeitaufwendig. Sie erfordern hoch qualifiziertes Fachpersonal und sind nur in speziellen Einrichtungen durchzuführen. Vom Patienten erfordert dies insbesondere unter den geografischen Bedingungen in Lateinamerika eine sehr zeit- und kostenintensive Anreise. Im Gegensatz dazu kann die Blutprobengewinnung für die laboratoriumsmedizinische Diagnostik Zeit und Kosten sparend beim Patienten vor Ort erfolgen. Nach Transport des Probenmaterials in eine zentralisierte laboratoriumsmedizinische Einrichtung können die Patientenproben kostengünstig und mit höchster analytischer Qualität bearbeitet werden.

Davon ausgehend wird im Rahmen dieser Arbeit geprüft, ob laboratoriumsmedizinische Marker für die Schädigung von Herz (B-Typ-natriuretisches Peptid; Troponin) und Intestinum (intestinales Fatty Acid-Binding Protein) sowie Marker zur Charakterisierung von Entzündung (CRP, Interleukine, TNF α , Myeloperoxidase) und Oxidativem Stress (Myeloperoxidase, Malondialdehyd, Lipidperoxide) Hinweise für den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase bei Chagas-Erkrankung liefern bzw. mit

diesen Markern frühe Stadien der symptomatischen Phase diagnostiziert werden können.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patienteneinschluss und Klassifizierung

Es wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die sich zwischen 2005 und 2007 in drei verschiedenen Krankenhäusern in Sucre/ Bolivien (Santa-Bárbara-Hospital, Instituto Gastroenterológico Boliviano-Japonés und Cristo-de-las-Américas-Hospital) vorgestellt hatten und mindestens in zwei unabhängigen Tests (indirekte Hämagglutination (IHA); enzymgekoppelter Immunoassay (ELISA)) positiv für die Chagas-Erkrankung waren. Alle Patienten und Kontrollprobanden erklärten schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Die Studie wurde durch die Krankenhausleitungen der beteiligten Einrichtungen genehmigt.

Insgesamt wurden 228 Patienten und zusätzlich 29 gesunde Probanden als Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen. Von den 228 Patienten wurden bei 116 erstmals die Chagas-Erkrankung diagnostiziert. Bei den übrigen 112 Patienten war eine symptomatische chronische Chagas-Erkrankung bekannt.

Die Patienten mit Chagas-Erstdiagnose wurden nach Anamnese und Langzeit-EKG (Holter EKG) klassifiziert. Die mit Chagas-Kardiomyopathie assoziierten EKG-Veränderungen bestehen in der Regel aus ventrikulären, seltener in supraventrikulären Arrhythmien. Wie von Wunderlich und Burchard¹⁰⁶ zusammengefasst wurde, liegt bei ca. 10 % der Patienten ein kompletter atroventrikulärer Block (AV-Block) vor. Generell typisch ist der Rechtsschenkelblock (R-Block) zusammen mit anderen Veränderungen. Häufig sind linksanteriorer Hemiblock (LAH) plus R-Block und die Kombination von R-Block/T-Wellen-Veränderungen/polymorphe ventr. Extrasystolen (VES). Einschränkend muss angemerkt werden, dass pathologische Befunde - wenn auch selten - erst im Belastungs-EKG auftreten, das jedoch zur Klassifizierung der hier eingeschlossenen Patienten nicht zur Verfügung stand. Bei Angabe von typischen Symptomen für Obstipation wurde eine radiologische Kolonuntersuchung vorgenommen.

Nachfolgend wurden die Patienten folgenden Gruppen zu geordnet:

- 1. Chagas-Patient in der Latenz- (indeterminaten) Phase (L):** IHA positiv, ELISA positiv, keine Obstipation, EKG normal
- 2. Chagas-Patient mit Kardiomyopathie (K):** IHA positiv, ELISA positiv, keine Obstipation, EKG pathologisch
- 3. Chagas-Patient mit Megakolon (M):** IHA positiv, ELISA positiv, Obstipation, radiologischer Nachweis von Megakolon, EKG normal
- 4. Chagas-Patient mit Megakolon und Kardiomyopathie (M+K):** IHA positiv, ELISA positiv, Obstipation, radiologischer Nachweis von Megakolon, EKG pathologisch
- 5. Gesunde Probanden (C):** IHA negativ, ELISA negativ, keine Obstipation, EKG normal

Die Patienten mit Kardiomyopathie (Gruppe K, M+K) wurden zusätzlich im Hinblick auf den Schweregrad der Kardiomyopathie klassifiziert.

Dazu wurden nachfolgende Kriterien genutzt.

- 1. Milde Kardiomyopathie**

Milde elektrokardiografische Veränderungen der ventrikulären Repolarisation, Sinusbradycardie.

- 2. Moderate Kardiomyopathie**

Linksanteriorer Hemiblock, inkompletter Linksschenkelblock, Rechtsschenkelblock, atrioventrikulärer Block (Mobitz Typ I), Vorhofflimmern bei > 50 Jahre

- 3. Schwere Kardiomyopathie**

Kardiomegalie, dilatative Kardiomyopathie, kompletter Linksschenkelblock, atroventrikulärer Block II (Mobitz Typ II), Vorhofflimmern < 50 Jahre

3.2. Blutabnahme und Serumpräparation

Um präanalytische Fehler zu vermeiden, wurden die Modalitäten der Blutentnahme definiert. Die venösen Blutentnahmen erfolgten mit einer weitleumigen 19-gauge Kanüle (bezogen durch Sarstedt, Nümbrecht) unter moderater Aspiration nach maximal 30 Sekunden venöser Stauung aus der Ellenbeuge. Die ersten drei Milliliter Blut wurden verworfen. Insgesamt wurden 10 ml Blut durch Venenpunktion gewonnen, 30 min bei Zimmertemperatur aufbewahrt und anschließend bei 3000 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum jedes Patienten in Eppendorf-Röhrchen portioniert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

3.3. Bestimmung von beta1-AAK, beta2-AAK und M2-AAK

Die Quantifizierung von beta1-, beta2-, und M2-AAK, erfolgte in einem Bioassay, dessen Aufbau die grundlegenden Untersuchungen von Wallukat und Wollenberger¹⁰⁷ aus dem Jahre 1987 zugrunde liegen.

Zur Durchführung des Bioassays wurde aus dem Serum zur Anreicherung der Autoantikörper IgG präpariert. Nach Gewinnung und Kultivierung von spontan schlagenden neonatale Rattenkardiomyozyten wurden diese mit dem präparierten IgG inkubiert und die Änderung der Schlagfrequenz der Kardiomyozyten als Maß für die Aktivität der IgG-Präparation bestimmt. Zur Differenzierung der Autoantikörper hinsichtlich des durch sie aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors kann der Assay in Gegenwart spezifischer Antagonisten durchgeführt werden.

3.3.1. Immunglobulin-Präparation

In einem 2 ml fassenden Reaktionsgefäß wurden zu 1 ml Serum unter Schütteln tropfenweise 660 µl einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 40 % erreicht war. Nach 18-stündiger Inkubation bei 4°C folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 6.000 x g ebenfalls bei 4°C. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 750 µl Dialysepuffer (phosphate buffered saline, PBS) aufgenommen und mit Hilfe eines Vortex-Gerätes gemischt. Anschließend wurden unter Schütteln tropfenweise 750 µl einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (Endkonzentration: 50 %) zugegeben. Dieser Resuspendierungsschritt wurde nach

erneuter Zentrifugation noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 700 µl PBS-Dialysepuffer gelöst und gegen einen PBS-Dialysepuffer drei Tage lang dialysiert. Das Volumenverhältnis von Probe zu Puffer betrug 1:100. Die Dialyse erfolgte bei 4°C bei täglich zweimaligem Pufferwechsel. Die erhaltene IgG-Fraktion wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.3.2. Gewinnung und Kultivierung von neonatalen Kardiomyozyten

Zur Gewinnung einer neonatalen Kardiomyozyten-Zellkultur wurden bis zu zehn 1-3 Tage alte Ratten dekapitiert. Der Brustkorb wurde mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und mit einer Schere geöffnet, das Herz freipräpariert und in eine Petrischale mit PBS und Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) überführt. Nach Entfernen der Atrien wurden die Ventrikel separiert und in 4-6 Stücke geteilt. Die Ventrikelstücke wurden zweimal mit PBS und Antibiotikum und abschließend nur mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Ventrikelstücke in 15 ml PBS, dem Trypsin (Endkonzentration 0.2 %) zugesetzt wurde, suspendiert. Nach Inkubation der Suspension bei 37°C für 3 min wurde der Überstand verworfen und die Ventrikelstücke in 30 PBS/Trypsin (Endkonzentration 2 %) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde die Trypsinisierung mit 10 ml eiskaltem hitzeinaktiviertem neonatalem Kälberserum (NKS) gestoppt. Die überstehende Zellsuspension wurde abgehoben und die übriggebliebenen Ventrikelreste erneut wie vorstehend beschrieben trypsinisiert. Die Zellsuspensionen wurden anschließend vereinigt, in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 130 x g für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml SM 20-I Medium aufgenommen.

Nach Vermischen von 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung wurden Zellzahl und Zellvitalität mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Pro Herz wurden 1-2 x 10⁶ Kardiomyozyten gewonnen.

Für die Zellkultur wurden 2,4 x 10⁶ in 2,5 ml SM 20-I (6 mM Glukose, 10 % neonatales Kälberserum (NKS), 2 mM Glutamin, 2 µM 2 5'-Fluor-2'desoxyuridin, 0,1 mU Insulin) suspendiert und in 12,5 cm² Falcon-Kulturflaschen überführt. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde am Tag nach der Isolierung und dann jeden zweiten Tag erneuert. Alle diese Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.3.3. Messung der Pulsationsrate von neonatalen Kardiomyozyten

Es wurden neonatale Ratten-Kardiomyozyten vom 3. oder 4. Tag der Kultivierung verwendet. Dazu wurde das Kulturmedium durch 2 ml SM20-I Medium mit 10 % NKS ersetzt und die Zellkultur erneut für 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kulturflaschen auf den auf 37° C temperierten Objektisch eines Invertmikroskops transferiert. 10 Messfelder mit synchron kontrahierenden Zellaggregaten wurden mit Hilfe einer gelochten Metallschablone auf dem Objektisch ausgewählt. Mittels computergestützter Messung (Programm Imagoquant Fourieranalyse 100) wurde die Pulsationsrate pro 15 Sekunden in jedem Feld bestimmt und gemittelt. Die so ermittelte Pulsationsrate entspricht der basalen Pulsationsrate der Kardiomyozytenkultur.

3.3.4. Assay-Standardisierung

Es wurden nur Zellkulturen genutzt, deren basale Pulsationsrate 120 und 160 Schläge pro Minute betrug. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 10 µM Isoprenalin stimuliert. Nach 5 min musste sich die Schlagfrequenz um mehr als 45 Schläge pro Minute erhöhen. Da die Chagas assoziierten AAK gegen den zweiten extrazellulären Loop der Rezeptoren gerichtet sind, war die Neutralisation der AAK induzierten Schlagfrequenzerhöhung durch Peptide, die gegen den zweiten extrazellulären Loop gerichtet sind, eine weitere Voraussetzung für die Nutzung der Zellkulturen. Als zweite Positivkontrolle diente ein kommerziell verfügbarer polyklonaler Antikörper (Goat anti ADRB1; EBO7133; Everest Biotech Ltd, Oxfordshire, UK) gegen den zweiten Loop des beta1-Rezeptors. Nach einstündiger Inkubation mit diesem Antikörper (Verdünnung 1:100) musste die Schlagfrequenzzunahme mehr als 20 Schläge pro Minute betragen und vollständig durch Propranolol blockierbar sein. In so selektierten Zellkulturen betrug die von-Tag-zu-Tag-Streuung für die Differenz zwischen stimulierter und basaler Schlagfrequenz weniger als 15 %, ermittelt nach Stimulation mit Isoprenalin bzw. dem kommerziellen Antikörper.

3.3.5. Bestimmung der AAK-Aktivität und Differenzierung der AAK

Zuerst wurde die basale Schlagfrequenz wie vorstehend beschrieben ermittelt. Anschließend wurden Atropin und die Patientenprobe (IgG-Präparation 1: 20 verdünnt) zugesetzt. Durch Atropin (Endkonzentration 10 µM) wurden die M2-Rezeptoren des

Bioassays blockiert. Damit wird verhindert, dass negativ chronotrope (M2-AAK) und positiv chronotrope AAK des Patientenserums interferieren. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Schlagfrequenzzunahme in den gleichen Feldern, in denen die Basalrate bestimmt wurde, gemessen. Die Frequenzzunahme weist auf die Existenz von chonotropen beta-AAK. Zur Differenzierung von beta1- und beta2-AAK wurde der beta2-Rezeptor-spezifische Antagonist ICI 118.551 (0,1 uM) zugesetzt. Die danach ermittelte Schlagfrequenz resultiert aus der Anwesenheit von beta1-AAK. Die beta2-AAK-Aktivität des Patienten ergibt sich folglich aus der Schlagfrequenzzunahme in Vergleich zur Basalrate vor ICI 118.551-Zugabe minus Schlagfrequenzzunahme nach ICI 118.551-Zugabe. Als 1 U AAK-Aktivität wurde eine Schagfrequenzzunahme von einem Schlag pro Minute definiert.

In einer separaten Bestimmung wurde der Assay, wie zuvor beschrieben, in Gegenwart von Propranolol (1 uM) an Stelle von Atropin durchgeführt. Dadurch wurden die beta-Rezeptoren blockiert und die negativ inotrope Aktivität der Patienten-M2-AAK konnte gemessen werden. Abb. 11 zeigt repräsentativ für einen Patienten mit beta1-, beta2- und M2-AAK die im Bioassay genutzte Strategie zur Bestimmung der AAK-Aktivität.

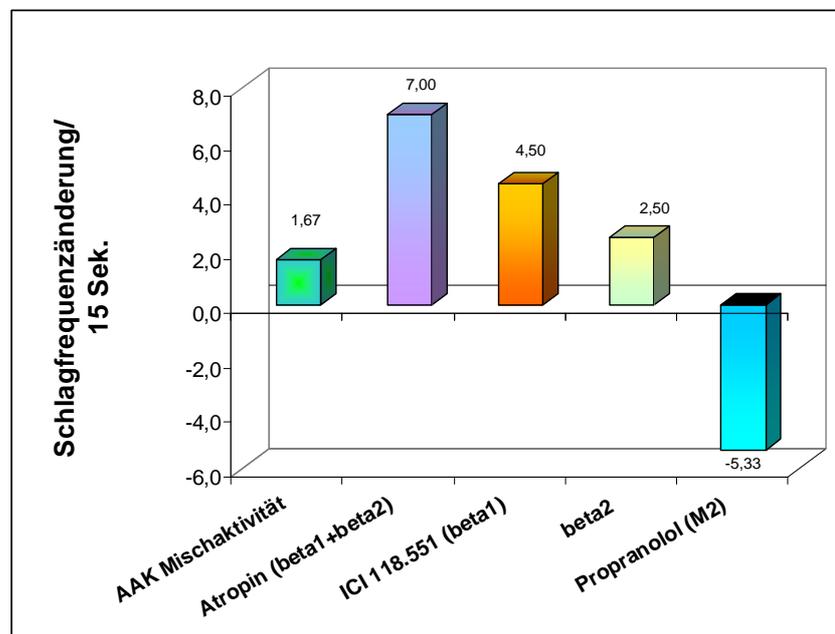


Abb. 11 Beispiel für die Quantifizierung und Differenzierung von beta1-, beta2- und M2-AAK im Serum eines Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie durch selektive Zugabe von Antagonisten. In Klammern: resultierende AAK-Aktivität

3.4. Bestimmung der Entzündungsmarker

3.4.1. Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP)

Die CRP-Bestimmung erfolgte automatisiert am Modular P800 unter Verwendung von Tina-quant® CRP HS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Es handelt sich dabei um einen immunturbidimetrischen Test, der auf der „Dual-Radius-Enhanced Latex Technology“ beruht und eine hohe Präzision insbesondere auch im niedrigen Konzentrationsbereich (< 5 mg/l) garantiert. Die Test-spezifischen Angaben zur Präzision und zum Referenzbereich sind in Tab. 5 aufgeführt.

3.4.2. Bestimmung von Interleukinen, löslichen Interleukinrezeptoren und TNF α

Die Bestimmungen von IL-6, IL-8, IL-10, IL-2R und TNF α erfolgten automatisiert am Immulite 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH). Dabei bilden spezifische polyklonale Antikörper, die an Polystyrolkugeln gekoppelt sind (Festphase), Antigen des Probenmaterials und einem zweiten mit Phosphatase-markierten Antikörpern einen Sandwich-Komplex. Nach Trennung von ungebundenen Probenbestandteilen und Zugabe eines entsprechenden Phosphatase-Substrates wird die Chemilumineszenz detektiert. Die Test-spezifischen Angaben zur Sensitivität und zum Referenzbereich sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5 Referenzbereich der klinisch-chemischen Marker

Marker	UNG	Referenzbereich/Cut off
C-RP	1 mg/l	< 5 mg/l
IL-2R	5 U/ml	223-710 U/ml
IL-6	2 pg/ml	< 3,4 pg/ml
IL-8	2 pg/ml	< 62 pg/ml
IL-10	1 pg/ml	< 9,1 pg/ml
TNF α	1,7 pg/ml	< 8,1 pg/ml
MPO	2 μ g/l	< 654 μ g/l
LPO	7 μ mol/l	< 180 μ mol/l
TBARS	0,15 μ mol/l	< 2 μ mol/l
NT-proBNP	5 ng/l	< 125 ng/l
cTnT	10 ng/l	< 10 ng/l
hs cTnT	3 ng/l	< 13 ng/l

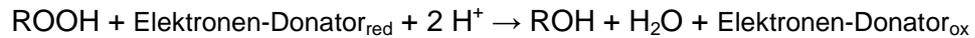
UNG, Untere Nachweisgrenze; C-RP, C-Reaktive Protein; IL-2R, Interleukin-2 Rezeptor; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; TNF α , Tumornekrosefaktor α ; MPO, Myeloperoxidase; LPO, Lipidperoxide; TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen; NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretische Peptid; cTnT, kardiales Troponin T (4. Generation); hs cTnT, hochsensitives kardiales Troponin T.

3.4.3. Bestimmung von Markern für Oxidativen Stress

Die Bestimmung der Serum-Myeloperoxidase (MPO) erfolgte mittels MPO ELISA Kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland). Der Test basiert auf der Reaktion von polyklonalen anti-humanen MPO-Antikörpern. Das Konjugat wurde mit einem Peroxidase-markierten zweiten polyklonalen anti-MPO-Antikörper umgesetzt. Die Quantifizierung des so gebildeten Konjugates (MPO-AK1---MPO---MPO-AK2_{Peroxidase}) erfolgte durch Zugabe des Peroxidase-Substrates TMB bei 450 nm.

Zur Bestimmung der Lipidperoxide (LPO) wurde der Per-Ox Assay (Immundiagnostik, AG, Bensheim, Deutschland) eingesetzt. Es handelt sich dabei um einen

photometrischen Assay, bei dem die Lipidperoxide des Serums mittels Peroxidase entsprechend der Reaktionsgleichung



umgesetzt werden. Als Elektronen-Donator dient 3,3',5,5' Tetramethyl-benzidin (TMB), dessen Oxidationsprodukt (Chromogen) bei 450 nm photometrisch gemessen wird.

Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (Malondialdehyd, MDA) wurden mit dem Malondialdehyd HPLC Kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) bestimmt. Im ersten Schritt werden Präformen von Malondialdehyd (Lipidperoxide von dreifach-ungesättigten Fettsäuren) bzw. Malondialdehyd im Serum mit Thiobarbitursäure in saurer Lösung bei ca. 90°C zu einem roten Farbkomplex umgesetzt. Da verschiedene andere Produkte des Serums (z.B. andere Aldehyde, Glukose, Bilirubin) ebenfalls mit Thiobarbitursäure reagieren und ähnlich gefärbte Verbindungen ergeben, folgt der Primärreaktion eine Trennung mittels HPLC und anschließender fluorimetrischer Detektion.

Die Test-spezifischen Angaben zur Sensitivität und zum Referenzbereich sind in Tab. 5 aufgeführt.

3.5. Bestimmung der Herzmarker

Die Bestimmung von NT-proBNP, cTnT und hs cTnT erfolgte automatisiert mittels Immunoanalyzer Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Dabei wird die Elektro-Chemi-Lumineszenz-Technologie (ECL) mit der Steptavidin-Biotin-Technologie verknüpft. Dazu wird die Serumprobe mit einem biotynilierten und einem zweiten, mit einem Ruthenium-Komplex (Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-Komplex) markierten polyklonalen Antikörper zu einem Sandwich-Komplex umgesetzt. Durch Zugabe von Streptavidin-beschichteten magnetischen Mikropartikeln werden die Sandwich-Komplexe über die biotinylierten Antikörper an die Mikropartikel gebunden. Nach Überführung der Sandwich-Komplexe in die Messkammer werden die Mikropartikel in der Messzelle magnetisch an der Messelektrode fixiert und nach elektrisch induzierter Chemilumineszenz durch einen Photomultiplier detektiert.

Die Test-spezifischen Angaben zur Sensitivität und zum Referenzbereich sind in Tab. 5 aufgeführt.

3.6. Statistik

Die qualitativen Daten sind in Tabellen bzw. in Säulendiagrammen unter Angabe entweder der Anzahl an Probanden, die mit dem jeweiligen Merkmal behaftet waren oder des Anteils in Prozent der mit dem Merkmal behafteten Probanden dargestellt. Die quantitativen Daten sind als Boxplots mit Median, 25. und 75. Perzentile und 5. und 95. Perzentile unter Aufführung der Ausreißer dargestellt. Konzentrationen bzw. Aktivitäten, die vom entsprechenden Assay als kleiner „untere Nachweisgrenze (UNG)“ bzw. „Null“ ausgegeben wurden, sind entsprechend einer gebräuchlichen Konvention auf den Wert des halben Bereiches unterhalb der UNG festgesetzt worden und mit diesem Wert in die statistischen Analysen eingegangen.

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SPSS 15.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, US).

Die Analyse der qualitativen Daten erfolgte mit dem Pearson Chi-Quadrat-Test und anschließend dem Exakten Test nach Fisher. Zur Analyse der quantitativen Daten wurden der nichtparametrische Test nach Kruskal-Wallis (nichtparametrische ANOVA) und anschließend der U-Test nach Mann-Whitney eingesetzt.

Mittels der Analyse der linearen Regression wurden Beziehungen zwischen den untersuchten quantitativen Daten analysiert.

Diagnostische Sensitivität und Spezifität von Markern zur Gruppendifferenzierung wurden in „receiver operating characteristics“ (ROC) unter Angabe der cut offs mit höchster diagnostischer Effizienz dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakteristik von Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Die Studie schloss insgesamt 228 Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung und 29 gesunde Probanden als Kontrollen (**C**) ein. Die Chagas-Patienten wurden den folgenden Gruppen zugeordnet: 96 asymptotische Patienten (Latenz-Gruppe, Indeterminate Gruppe = **L**), 57 mit Herzkrankheit (Kardiomyopathie-Gruppe = **K**), 30 mit Megakolon (Megakolon-Gruppe = **M**) und 45 mit Kardiomyopathie kombiniert mit Megakolon (**M+K**). (Abb.12)

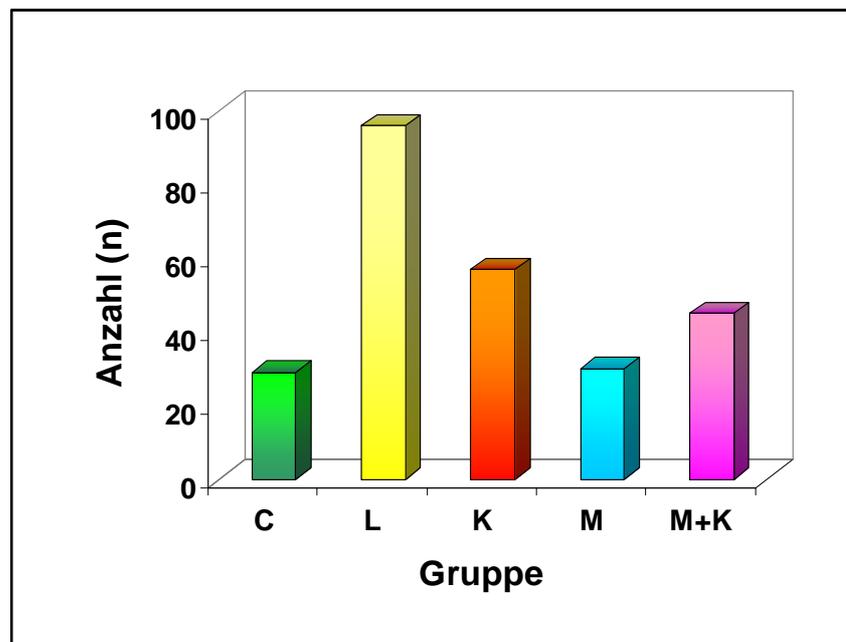


Abb. 12 Anzahl der gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung, die in die Studie eingeschlossen wurden.

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie.

Unter den Studienteilnehmern waren 156 Frauen und 101 Männer. In der Kontrollgruppe, der Latenz-Gruppe und in der Gruppe mit Megakolon überwog die Anzahl der Frauen die der Männer. Im Gegensatz dazu bestand die Kardiomyopathie-

Gruppe aus mehr männlichen als weiblichen Patienten. In der Gruppe mit Kardiomyopathie und Megakolon war das Verhältnis von männlichen und weiblichen Patienten nahezu ausgeglichen. Damit unterscheidet sich das Geschlechterverhältnis in den Gruppen **C** ($p < 0.02$), **L** ($p < 0.001$) **M** ($p < 0.05$) und **M+K** ($p < 0.05$) signifikant von dem in Gruppe **K**. Die Gruppe **M+K** zeigte zu **C** und **M** keinen und zu **L** ($p < 0.05$) einen signifikanten Unterschied (Abb. 13).

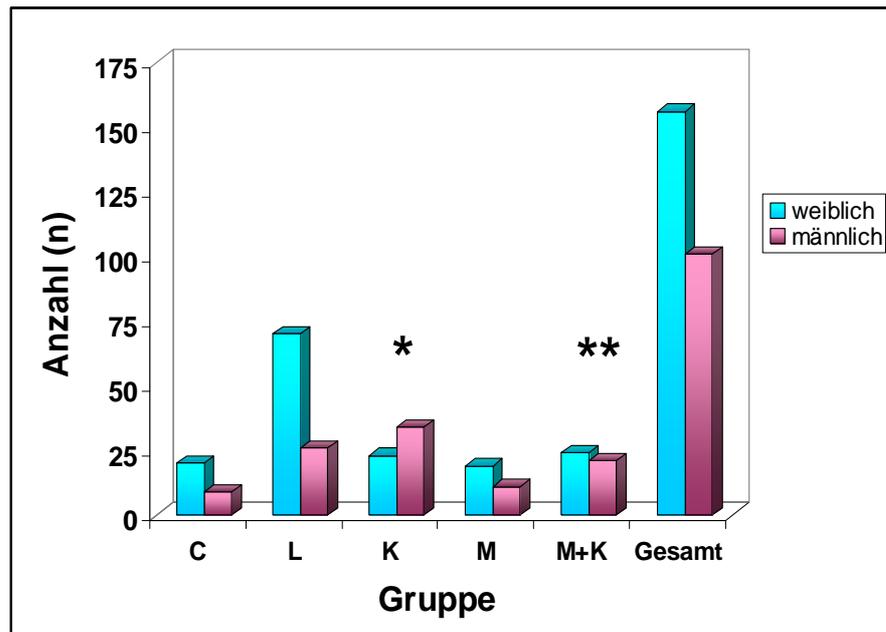


Abb. 13 Geschlechtsverteilung von gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; (*), sign. Unterschied vs. C, L, M, M+K; (**), sign. Unterschied vs. L.

Von den Patienten waren 161 in ländlichen und 96 in städtischen Regionen geboren. Zum Zeitpunkt der Studie lebten nur noch 46 in ländlichen Regionen, während 211 in städtischen Regionen wohnten. Dies resultierte aus dem Umzug von 117 Personen von der ländlichen in die städtische Region, während nur 2 Personen in die umgekehrte Richtung wechselten. Bei 138 Personen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung Geburtsregion und Wohnregion identisch. Zusammengefasst ergab sich eine signifikante

($p < 0.001$) Bewegung aus den ländlichen Regionen zu den städtischen Regionen hin (Abb. 14).

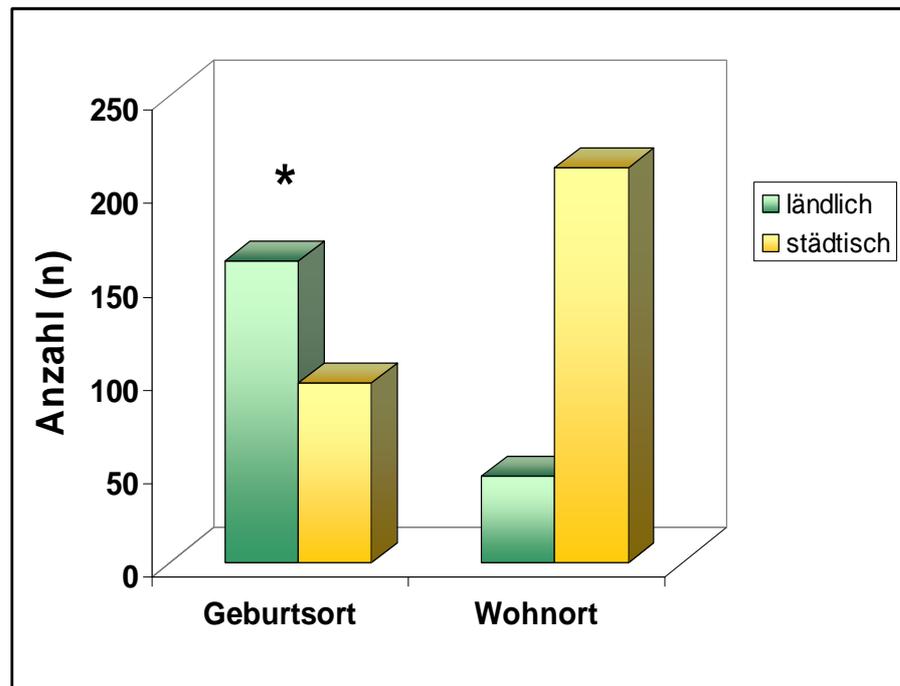


Abb. 14 Geburtsort und Wohnort von gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

(*), sign. Unterschied vs. Wohnort.

Nach Analyse des Lebensalters der in die Studie eingeschlossenen Kontrollen und Patienten sieht man einen statistischen Unterschied zwischen den Gruppen. Während sich die Gruppen **C** und **L** nicht unterscheiden, sind die Probanden in diesen beiden Gruppen signifikant ($p < 0.001$) jünger als die Patienten in **K**, **M** und **M+K**. **K** und **M** unterscheiden sich im Alter nicht. Die Patienten in **M+K** sind dagegen signifikant älter als die Patienten in **K** ($p < 0.01$), und **M** ($p < 0.01$) (Abb. 15).

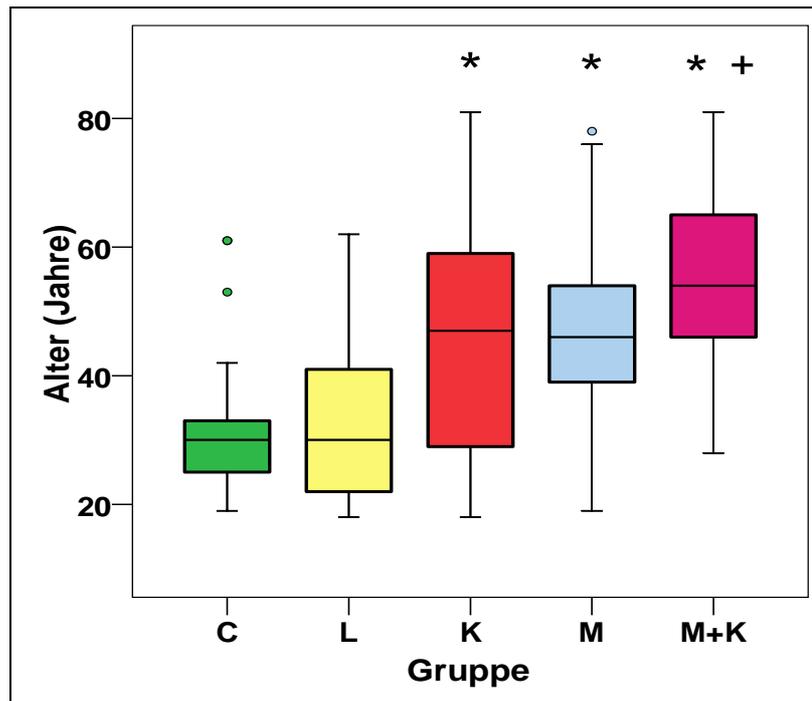


Abb. 15 Alter von gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; (*), sign. Unterschied vs. C, L; (+), sign. Unterschied vs. K, M.

4.1.1. Subklassifizierung der Patienten mit Kardiomyopathie

Von den 102 Patienten mit Kardiomyopathie (**K**, **M+K**) wurden bei 31 im Rahmen der Studie erstmals Zeichen für eine Herzkrankheit beobachtet (Abb. 16). Bei 71 war die Herzkrankheit bekannt. Nach der Klassifizierung der Patienten im Hinblick auf den Schweregrad der Kardiomyopathie fanden sich insgesamt 8 Patienten in der Gruppe mit milder Kardiomyopathie, 52 Patienten in der Gruppe mit moderater Kardiomyopathie und 42 Patienten in der Gruppe mit schwerer Kardiomyopathie. Aufgeteilt auf die Gruppen **K** und **M+K** fanden sich 3 Patienten, 25 Patienten und 29 Patienten bzw. 5 Patienten, 27 Patienten und 13 Patienten mit milder, moderater bzw. schwerer Kardiomyopathie. Danach befanden sich in der Gruppe **K** signifikant mehr Patienten mit schwerer Kardiomyopathie als in **M+K** ($p < 0.01$) (Abb. 17).

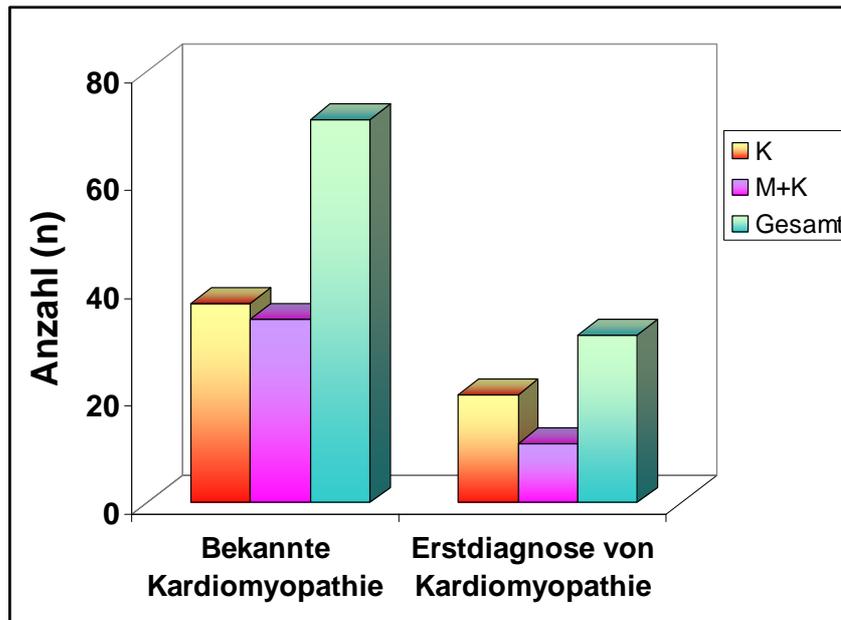


Abb. 16 Anzahl der Patienten mit bekannter Kardiomyopathie bzw. der Erstdiagnose Kardiomyopathie

K, Kardiomyopathie; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie.

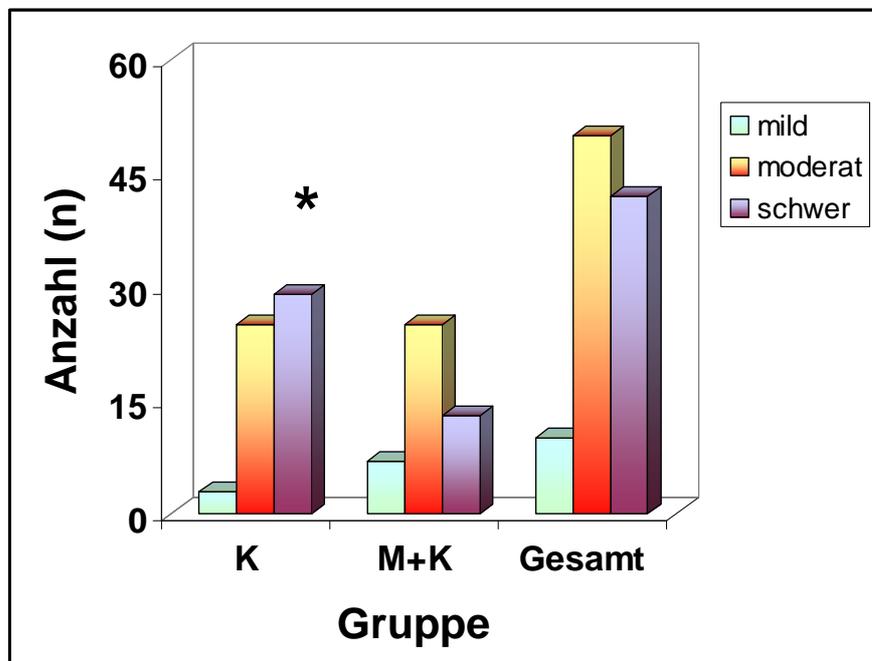


Abb. 17 Schweregrad der Kardiomyopathie

K, Kardiomyopathie; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; (*), sign. Unterschied vs. M+K.

4.1.2. Subklassifizierung von Kontrollen und Patienten hinsichtlich des Zeitpunktes der Blutabnahme

Je nach Aufnahmeerdiagnose und daraus resultierendem klinischen Management (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen der Zeitpunkt der Blutabnahme zwar nicht unmittelbar, jedoch innerhalb der ersten 15 Tage nach der chirurgischen Intervention lag und damit nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die zeitliche Nähe der Blutabnahme nach der chirurgischen Intervention Einfluss auf die zu untersuchenden Parameter haben könnte. Dies müsste dann in den nachfolgenden Analysen berücksichtigt werden.

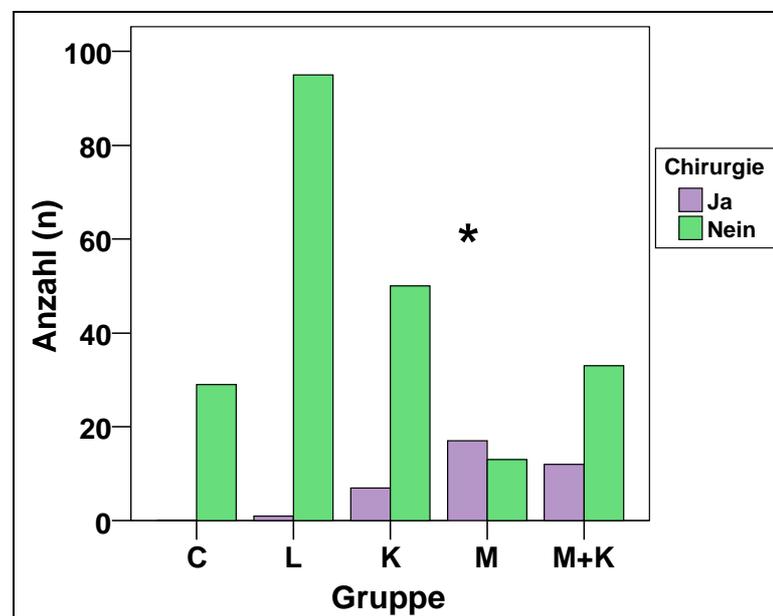


Abb. 18 Anzahl der Patienten, bei denen die Blutabnahme unabhängig von einer chirurgischen Intervention bzw. ≥ 1 Tage < 15 Tage nach chirurgischer Intervention erfolgte.

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; (*), sign. Unterschied vs. K.

Abb. 18 weist für die Untersuchungsgruppen jeweils die Anzahl der Patienten aus, bei denen eine Assoziation von Blutabnahme und chirurgischer Intervention nicht ausgeschlossen werden kann. Danach erfolgte in der Latenz-Gruppe (Gallenblasenoperation) bei nur einem Patient (1 %) und in der Gruppe mit

Kardiomyopathie (Schrittmacherimplantation) bei 12 % die Blutabnahme nach einer chirurgischen Intervention. Im Vergleich dazu erfolgte die Blutabnahme nach der chirurgischen Intervention in der Megakolon-Gruppe bei 56 % der Patienten (Kolonchirurgie) und in der Gruppe **M+K** (Kolonchirurgie oder Schrittmacherimplantation) bei 27 % der Patienten. In Gruppe **M** war danach der Anteil an Patienten, bei denen die Blutabnahme nach der chirurgischen Intervention erfolgte, signifikant größer als in Gruppe **K** ($p < 0,001$), nicht jedoch im Vergleich zu Gruppe **M+K**. Die Gruppen **K** und **M+K** unterschieden sich nicht.

4.2. Auto-Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Nach Analyse von mehr als 100 Gesunden ergab sich in Vorversuchen für die Frequenzänderung der neonatalen Kardiomyozyten nach Zugabe der IgG-Präparation ein cut off von 4,0 U ($x \pm 3SD$) für beta1- und beta2-AAK sowie -4,0 U ($x \pm 3SD$) für M2-AAK. In den Patientengruppen fand sich weder ein Einfluss des Blutabnahmezeitpunktes (nach chirurgischer Intervention) auf die Auto-Antikörperpositivität bzw. -negativität noch auf die Auto-Antikörperaktivität. In die nachfolgenden Analysen wurden deshalb alle Studienteilnehmer eingeschlossen. Abb. 19 zeigt den Anteil (%) der jeweils für die Antikörper positiven Studienteilnehmer. Für die Kontrollgruppe bedeutete dies, dass sie positiv zu 0 % für beta1- und M2-AAK sowie zu 3 % für beta2-AAK war. Im Hinblick auf beta2-AAK bedeutete dieses, dass ein Kontrollproband positiv war.

Die Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung und Kardiomyopathie waren zu 100 % positiv für beta1-AAK, zu 89 % für beta2-AAK und zu 98 % für M2-AAK.

Die Chagas-Patienten mit Megakolon zeigten zu 97 % Positivität für beta2-AAK, zu 100 % für M2-AAK aber nur zu 38 % für beta1-AAK. Damit bestand ein signifikanter Unterschied im Auftreten von beta1-AAK bei den Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon ($p \leq 0.001$).

Verständlich ist, dass beim Vorliegen sowohl von Megakolon als auch Kardiomyopathie (Gruppe **M+K**) alle 3 Auto-Antikörper in nahezu allen Patienten vorkamen (beta1-AAK = 96 %, beta2-AAK = 98 %, M2-AAK = 100 %). Für beta1-AAK ergab sich dadurch zwischen der Gruppe **M+K**, **K** und den Patienten mit Megakolon (Gruppe **M**) ein signifikanter Unterschied ($p < 0.001$).

Das typische Zeichen für Patienten mit Kardiomyopathie war damit das Auftreten von beta1-AAK gemeinsam mit M2-AAK, für die Patienten der Megakolon-Gruppe der Nachweis von beta2-AAK gemeinsam mit M2-AAK. Damit ergaben sich als

charakteristische AAK-Muster die Kombination von beta1-/M2-AAK bei Chagas-Kardiomyopathie und beta2-/M2-AAK bei Chagas-Megakolon.

In der Latenz-Gruppe sind 34 % für beta1-AAK, 33 % für beta2-AAK und 42 für M2-AAK positiv. Damit bestand ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von beta1- ($p < 0.001$), beta2- ($p < 0.001$) und M2-AAK ($p < 0.001$) in den latenten Patienten, verglichen mit denen in der Kardiomyopathie- und Kardiomyopathie/Megakolon-Gruppe. Vergleichbar stellte sich die Situation für beta2- und M2-AAK, jedoch nicht für beta1-AAK beim Vergleich von Latenz-Gruppe und Megakolon-Gruppe dar (Abb. 19).

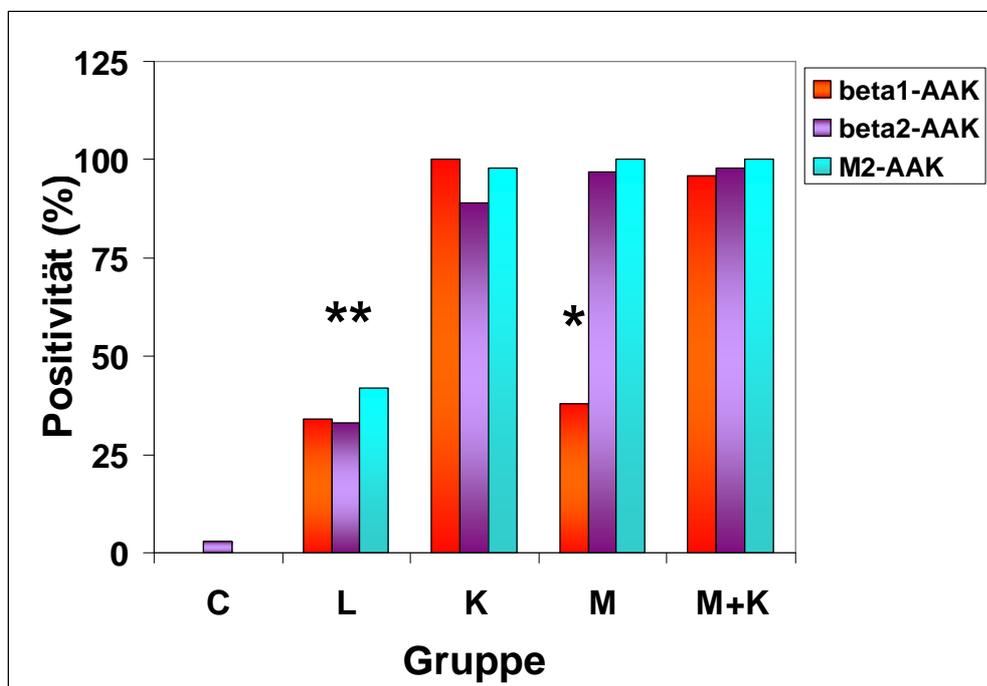


Abb. 19 Auto-Antikörpermuster in gesunden Probanden und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; beta1-AAK, Auto-Antikörper gegen beta-1 Adrenorezeptor; beta2-AAK, Auto-Antikörper gegen beta-2 Adrenorezeptor; M2- AAK, Auto-Antikörper gegen Muscarinerge-2 Acetylcholinrezeptoren; (*), beta1-AAK von M < beta1-AAK von K und M+K; (**), beta1-, beta2- und M2-AAK von L < K und M+K.

Nach Analyse der Latenz-Gruppe im Hinblick auf das Auftreten der Kombinationen beta1-/M2-AAK bzw. beta2-/M2-AAK fanden sich in 34 % der latenten Patienten entweder die Kombination beta1-/M2-AAK oder beta2-/M2-AAK oder aber beide Kombinationen (Abb. 20).

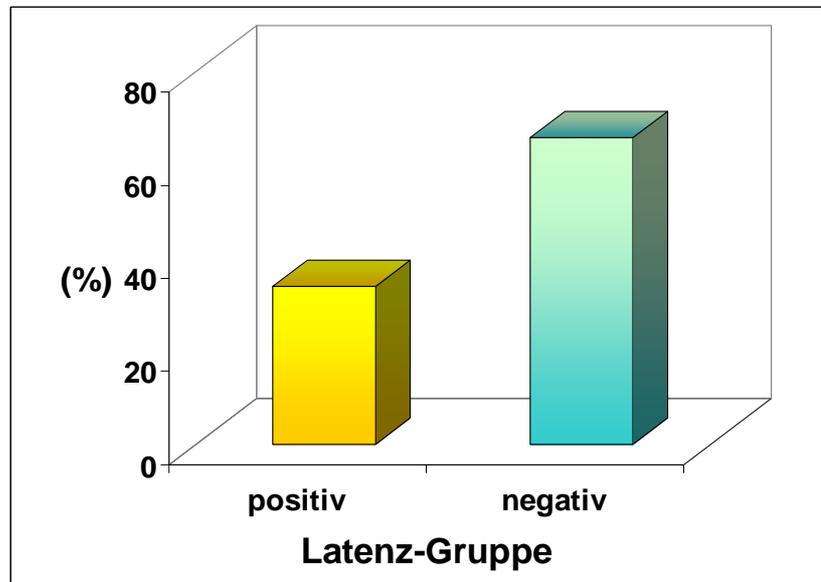


Abb. 20 Häufigkeit der Latenz-Gruppe mit Positivität für beta1-/M2-AAK oder beta2- /M2-AAK oder für beide Kombinationen

4.2.1. Auto-Antikörperaktivität

Schaut man nicht nur auf die Verteilung der Auto-Antikörper hinsichtlich Positivität und Negativität, sondern auch auf die Höhe des Auto-Antikörper-Levels, zeigte sich ein deutlicher Unterschied bei Vergleich der Patientengruppen (Abb. 21). Dabei wurden nur die Patienten in die Analyse eingeschlossen, die Positivität für die entsprechenden Auto-Antikörper zeigten. Bei den Kardiomyopathie-Patienten lagen beta1-AAK- und M2-AAK-Aktivität signifikant höher als in den Patienten der Latenz-Gruppe, die positiv für diese AAK waren ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Auch gegenüber den beta1-AAK und M2-AAK positiven Patienten mit Megakolon fanden sich in der Kardiomyopathie-Gruppe signifikant höhere Werte für beta1-AAK und M2-AAK ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Zusätzlich wiesen die Patienten in der Latenz-Gruppe im Vergleich zur Megakolon-Gruppe signifikant höhere Werte für beta1-AAK und M2-AAK auf ($p < 0,001$; $p = 0,003$). Im

Gegensatz dazu war die beta2-AAK-Aktivität in den Megakolon-Patienten signifikant höher als bei den Patienten in der Latenz-Gruppe bzw. bei denen mit Kardiomyopathie ($p < 0,01$; $p < 0,01$). Zusätzlich war die beta2-AAK-Aktivität in den Patienten der Latenz-Gruppe signifikant höher als in den Patienten mit Kardiomyopathie.

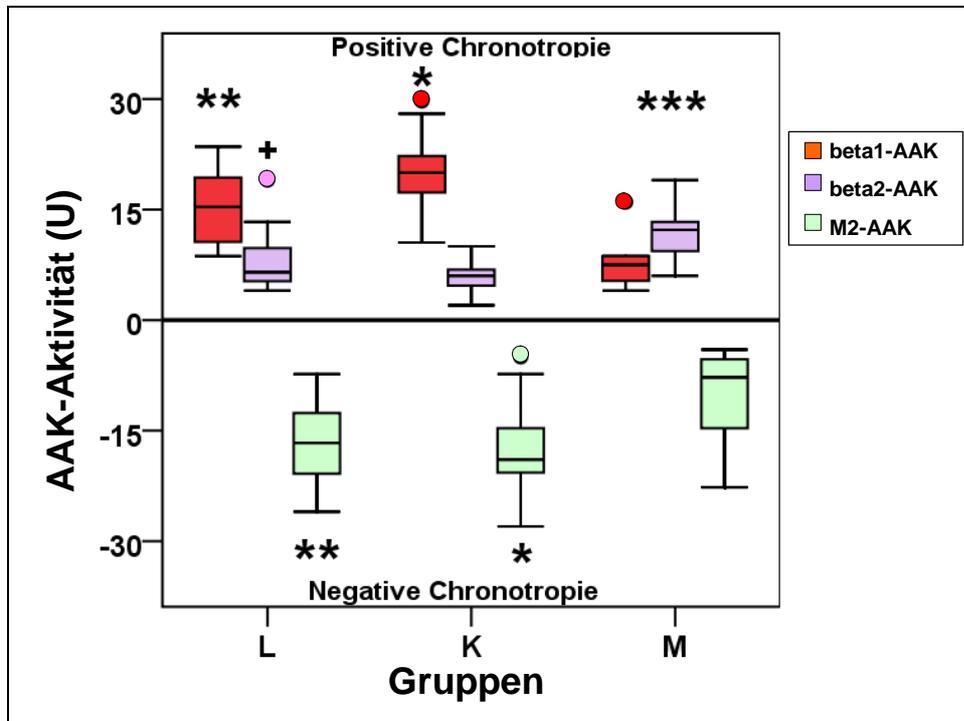


Abb. 21 Beta1-AAK-, beta2-AAK- und M2-AAK-Aktivität in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung und Positivität für die entsprechenden Antikörper in der Latenz-Phase und mit Manifestation als Kardiomyopathie bzw. Megakolon.

L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; beta1-AAK, Auto-Antikörper gegen beta-1Adrenorezeptor; beta2-AAK, Auto-Antikörper gegen beta-2 Adrenorezeptor; M2- AAK, Auto-Antikörper gegen Muscarinerge-2 Acetylcholinrezeptoren; (*), beta1-, M2-AAK von K > beta1, M2-AAK von L, M; (**), beta1-,M2-AAK von L > beta1, M2-AAK von M; (***), beta2-AAK von M > beta2-AAK von L, K; (+), beta2-AAK von L > beta2 AAK von K.

Analsiert man nun die unterschiedlichen AAK-Level der Kardiomyopathie- und Megakolon-Gruppe, zeigte sich entsprechend der ROC-Charakteristik für beta1-AAK, dass bei einem cut off von 9,6 U (Sensitivität 0,96; Spezifität 1,0) Patienten mit

Kardiomyopathie bzw. Megakolon mit höchster Effizienz voneinander unterschieden werden können (Abb. 22). Die Abb. 23 und 24 zeigen die ROC-Charakteristiken für beta2-AAK und M2-AAK, die entsprechend ihrer Sensitivität und Spezifität den beta1-AAK in der Differenzierung von Chagas-Kardiomyopathie und –Megakolon unterlegen waren.

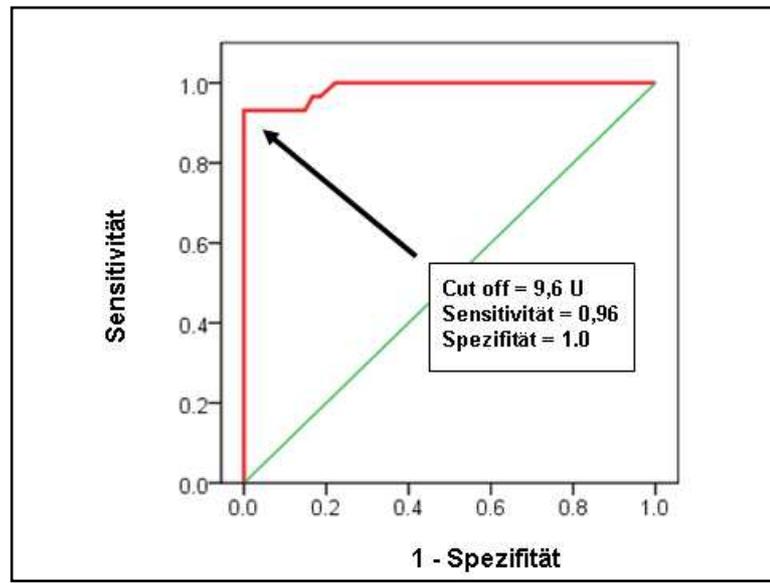


Abb. 22 Receiver Operating Characteristics (ROC) für beta1-AAK basierend auf Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon.

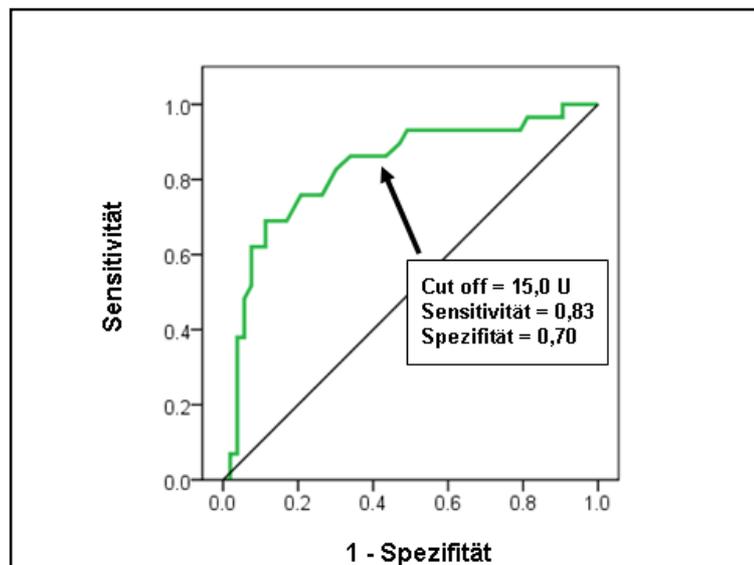


Abb. 23 Receiver Operating Characteristics (ROC) für M2-AAK basierend auf Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon.

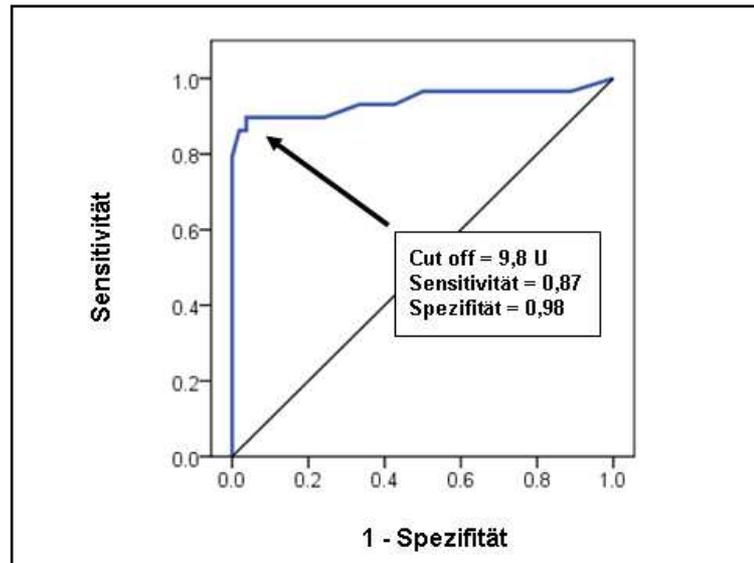


Abb. 24 Receiver Operating Characteristics (ROC) für beta2-AAK basierend auf Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon.

Wendet man für beta1-AAK den cut off von 9,6 U zur Unterscheidung von Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon nun auf die 34 % der Patienten der Latenz-Gruppe an, für die wir aufgrund ihres AAK-Musters ein Risiko für die Entwicklung von Spätschäden postuliert haben, lassen sich 85 % dieser Risiko-Patienten dem Kardiomyopathie-Muster und 15 % dem Megakolonmuster zuordnen.

4.2.2. Vergleich der Auto-Antikörperaktivität bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung in der Latenz-Phase mit dem Risiko für Kardiomyopathie und mit Kardiomyopathie unterschiedlichen Schweregrades

Die hypothetische Funktion der beta1-AAK und M2-AAK in der Pathogenese der Chagas-Kardiomyopathie sollte sich manifestieren lassen, wenn es gelänge unter Einschluss der Patienten mit dem Risiko für Kardiomyopathie eine Korrelation zwischen den verschiedenen Schweregraden der Kardiomyopathie und dem Level insbesondere von beta1-AAK bzw. M2-AAK nachzuweisen. Als Patienten der Latenz-Gruppe mit Kardiomyopathie-Risiko wurden, wie zuvor dargestellt, solche mit beta1-/M2-AAK-Positivität und einer beta1-AAK-Aktivität > 9,6 U angesehen. Wie in Abb. 25 dargestellt ist, ließ sich ein signifikanter Anstieg ($p < 0,02$) der beta1-AAK-Aktivität ausgehend von den Patienten in der Latenz-Phase mit typischen AAK-Muster (beta1-/M2-AAK-

Positivität, beta1-AAK-Aktivität > 9,6 U) zu den Patienten mit schwerer Kardiomyopathie nachweisen. Für M2-AAK wurde keine signifikante Korrelation gefunden (Abb.26).

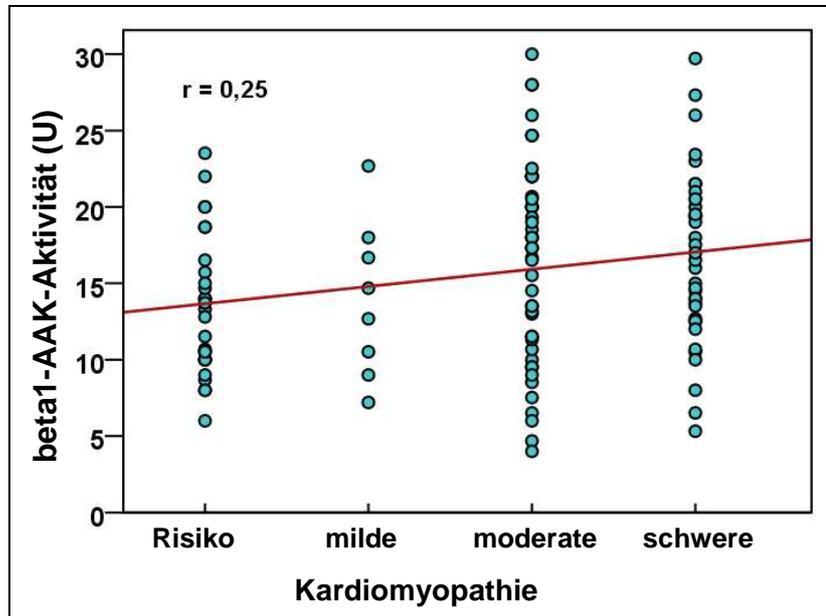


Abb. 25 Korrelation von beta1-AAK-Aktivität und Schweregrad der Kardiomyopathie bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung.

Eingeschlossen wurden Patienten der Latenz-Gruppe mit Positivität für beta1-/M2-AAK (Risiko) und Patienten mit Kardiomyopathie (Gruppe K und M+K). ($p < 0,02$); beta1-AAK-Aktivität, Auto-Antikörper-Aktivität gegen beta1 Adrenorezeptor; r, Korrelationskoeffizient.

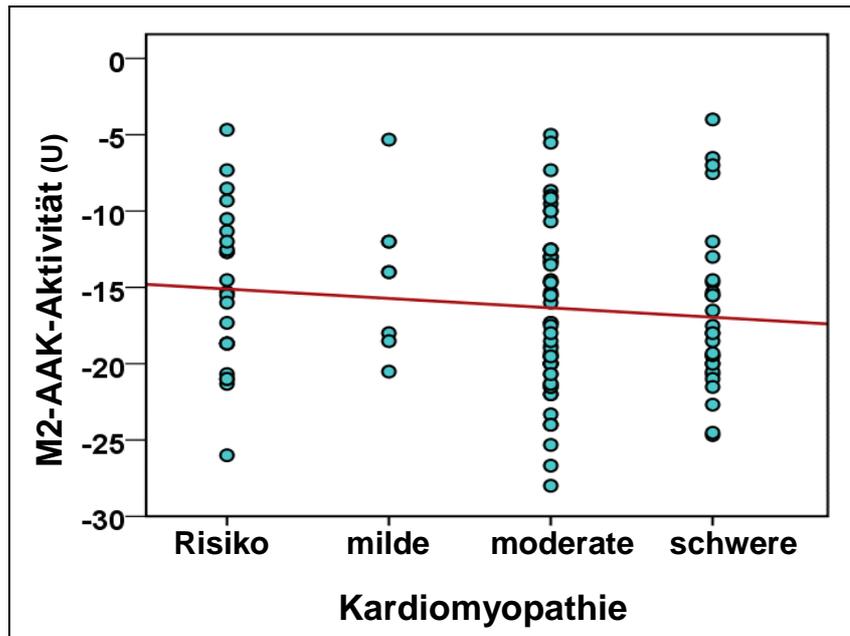


Abb. 26 Korrelation von M2-AAK-Aktivität und Schweregrad der Kardiomyopathie bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung.

Eingeschlossen wurden latente Patienten der Latenz-Gruppe mit Positivität für beta1-/M2-AAK (Risiko) und Patienten mit Kardiomyopathie (Gruppe K und M+K); M2-AAK-Aktivität, Auto-Antikörper-Aktivität gegen Muscarinerge-2 Acetylcholinrezeptoren; r, Korrelationskoeffizient.

Wurden aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit milder Kardiomyopathie diese mit den Patienten mit moderater Kardiomyopathie zusammengefasst, wird die Beziehung von beta1-AAK-Aktivität und Kardiomyopathie-Schweregrad weiter manifestiert. So zeigte sich eine signifikante Zunahme der beta1-AAK-Aktivität beim Vergleich von Risiko-Patienten und Patienten mit schwerer Kardiomyopathie ($p < 0,01$). Basierend auf den Medianen der beta1-AAK-Aktivität kann auch eine Zunahme der beta1-AAK-Aktivität ausgehend von den Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie zu den Patienten mit schwerer Kardiomyopathie angenommen werden ($p < 0,1$). Als nahezu signifikant stellte sich die Zunahme der beta1-AAK-Aktivität von der Risiko-Gruppe zur Gruppe mit milder/moderater Kardiomyopathie dar ($p = 0,07$). Durch die Zusammenfassung der Patienten mit milder und moderater Kardiomyopathie wurde darüber hinaus auch für M2-AAK ein Anstieg von den Risiko-Patienten zu den Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie ($p < 0,02$) bzw. schwerer Kardiomyopathie ($p = 0,07$) sichtbar (Abb. 27).

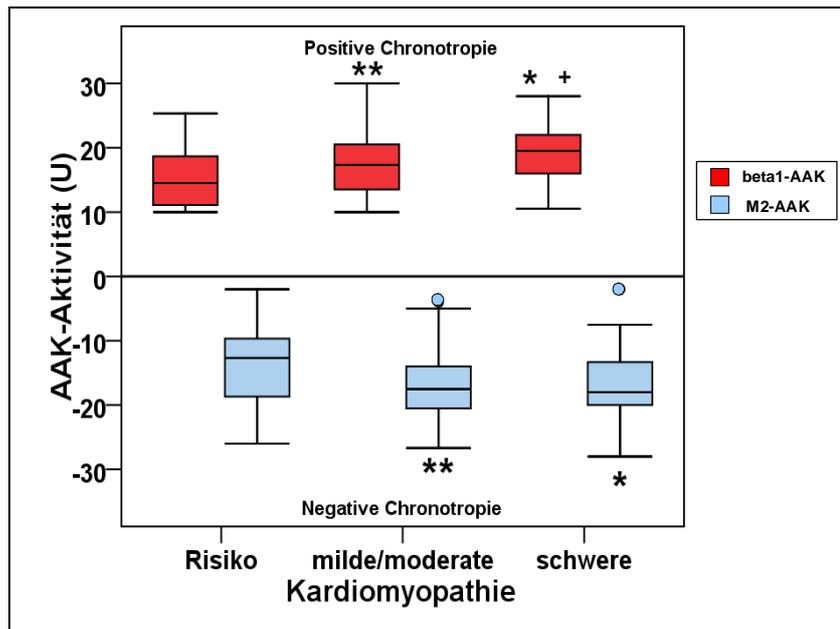


Abb. 27 Beta1-AAK- und M2-AAK-Aktivität in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung und typischem AAK-Muster für Kardiomyopathie (beta1-AAK-Aktivität < 9,6 U; beta1-/M2-AAK-Positivität) in der Latenz-Gruppe (Risiko) und mit Kardiomyopathie (Gruppe K, M+K).

(*), beta1-, M2-AAK von schwere > beta1, M2-AAK von Risiko Kardiomyopathie;
 (**), beta1-,M2-AAK von milde/moderate > beta1, M2-AAK von Risiko Kardiomyopathie; (+), beta1-AAK von milde/moderate < beta1-AAK von schwere Kardiomyopathie.

4.3. Marker zur Charakterisierung der Entzündungen

4.3.1. CRP-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Da die Blutabnahme bei einer Reihe von Patienten zeitlich nach einer chirurgischen Intervention (Schrittmacherimplantation, chirurgische Kolonintervention) erfolgte, wurde der Einfluss dieser Intervention auf die CRP-Konzentration geprüft. In Abb. 28 ist der Anteil der Patienten mit chirurgischer Intervention in den Patientengruppen ausgewiesen und die CRP-Konzentration der Patienten mit und ohne chirurgische Intervention dargestellt. Patienten mit chirurgischer Intervention wiesen im Vergleich zu denen ohne Intervention signifikant höhere CRP-Konzentrationen auf ($p < 0,001$). Dies resultierte

insbesondere aus den höheren CRP-Werten der Patienten mit Kolonchirurgie. (Gruppe **M**: $p = 0,03$; Gruppe **M+K**: $p = 0,02$). Bei den Patienten mit Schrittmacherimplantation wurden keine signifikanten Unterschiede in der CRP-Konzentration beobachtet. Damit waren die CRP-Konzentrationen der Patienten mit Schrittmacherimplantation signifikant niedriger als die CRP-Konzentrationen der Patienten mit Kolonchirurgie (Gruppe **M**, **M+K**) ($p < 0,05$). Für die nachfolgende Betrachtung der CRP-Konzentrationen in der Kontroll- und Latenz-Gruppe sowie in den Patientengruppen wurden ausgehend von dem vorstehend gezeigten Einfluss der chirurgischen Maßnahmen, insbesondere der Kolonchirurgie auf die CRP-Konzentration, nur die Patienten ohne chirurgische Intervention in die Analyse eingeschlossen.

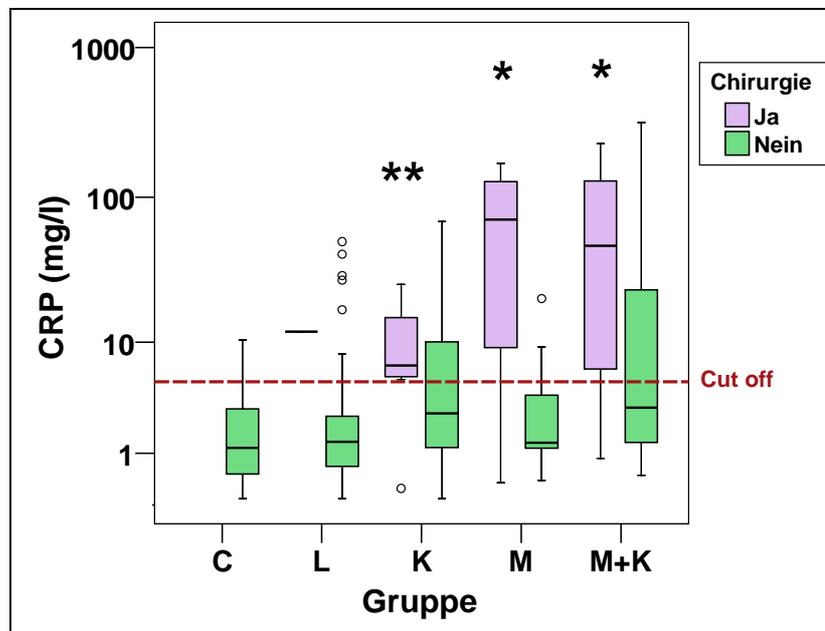


Abb. 28 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die CRP-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; CRP, C-reaktives Protein; (*), > Chirurgie nein; (**), < M, M+K.

Unter den Studienteilnehmern ohne chirurgische Intervention hatten in der Kontrollgruppe 7 %, in der Latenz-Gruppe 12 %, in der Kardiomyopathie-Gruppe 35 %, in der Megakolon-Gruppe 23 % und in der Megakolon/Kardiomyopathie-Gruppe 47 %

CRP-Werte über dem cut off von 5 mg/l. Der Anteil der Patienten in der Latenz-Gruppe mit CRP-Werten über dem cut off war signifikant geringer als in den Gruppen mit Kardiomyopathie, mit Megakolon und beiden Chagas-Manifestationsformen (jeweils $p < 0,001$).

Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Organmanifestationen existierten nicht. Wie in Abb. 29 dargestellt, zeigte sich hinsichtlich der CRP-Level, dass sich Kontroll- und Latenz-Gruppe sowie die Patienten der Megakolon-Gruppe nicht in der CRP-Konzentration unterschieden. Signifikant höhere CRP-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe und Latenz-Gruppe finden sich jedoch in der Kardiomyopathie-Gruppe ($p < 0,01$) und in der Megakolon/Kardiomyopathie-Gruppe ($p < 0,001$). Zwischen Kardiomyopathie-Gruppe und Megakolon-Gruppe sowie Gruppe **M+K** ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

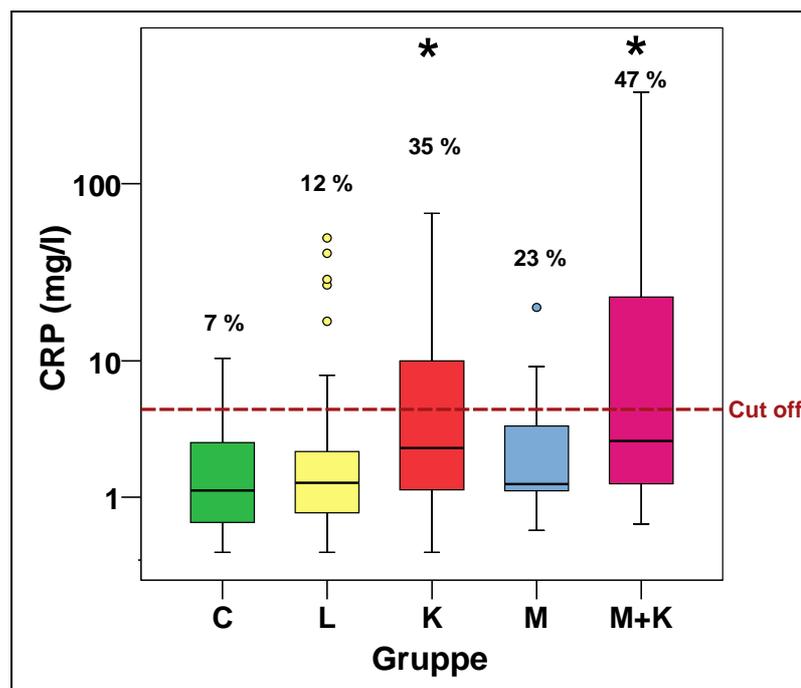


Abb. 29 CRP-Konzentration und Anteil an Werten > cut off in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; CRP, C-reaktives Protein; (*), > C, L.

Wurde bei den Chagas-Patienten die CRP-Konzentration im Vergleich zum Schweregrad der Herzschädigung analysiert, zeigte sich, wie in Abb. 30 dargestellt ist, ein Anstieg der CRP-Konzentration von den Patienten der Latenz-Gruppe mit dem Risiko für Kardiomyopathie über die Patienten mit milder/moderater Schädigung hin zu den Patienten mit schwerer Herzschädigung (ohne Kardiomyopathie vs. schwere Kardiomyopathie $p = 0,002$). Dies resultierte aus einer Zunahme des Anteils an Patienten mit CRP-Konzentrationen über dem cut off = 5 mg/l von 13 % in der Gruppe mit Kardiomyopathierisiko über 36 % bei den Patienten mit milder bzw. moderater Kardiomyopathie hin zu 48 % bei den Patienten mit schwerer Kardiomyopathie (Kardiomyopathierisiko vs. mit milder/moderater bzw. schwerer Kardiomyopathie $p < 0,01$).

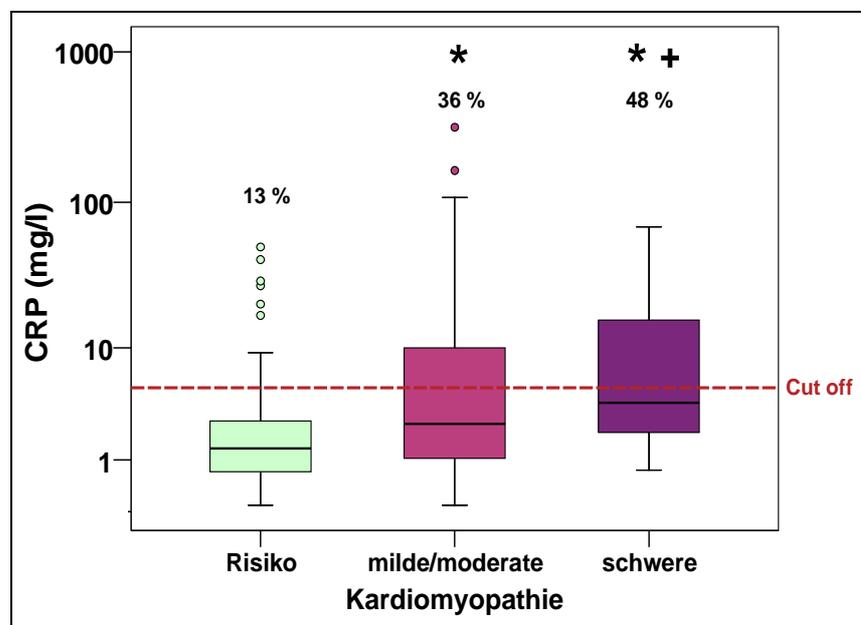


Abb .30 CRP-Konzentration und Anteil an Werten > cut off in Abhängigkeit vom Schweregrad der Kardiomyopathie bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

CRP, C-reaktives Protein; (+), > ohne Kardiomyopathie, (*), Anteil CRP-Werte über cut off > ohne Kardiomyopathie

Beim Vergleich der Patienten der Latenz-Gruppe, die entweder Auto-Antikörper positiv oder negativ waren, ließen sich keine unterschiedlichen CRP-Konzentrationen nachweisen.

4.3.2. IL-2R-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Wie in Abb. 31 dargestellt ist, lagen bei allen Kontrollen die IL-2R-Konzentrationen unterhalb der oberen Grenze des Referenzbereiches. In den Patientengruppen fanden sich erhöhte Werte bei ca. 10 % (Gruppe L, K, M) bzw. 22 % (Gruppe M+K). Die erhöhten IL-2R-Konzentrationen wurden dabei sowohl bei Patienten mit und ohne chirurgische Intervention gefunden. Es zeigte sich, dass die chirurgische Intervention nur in der Gruppe M+K mit einer signifikanten Zunahme der IL-2R-Konzentration verbunden war ($p < 0,05$).

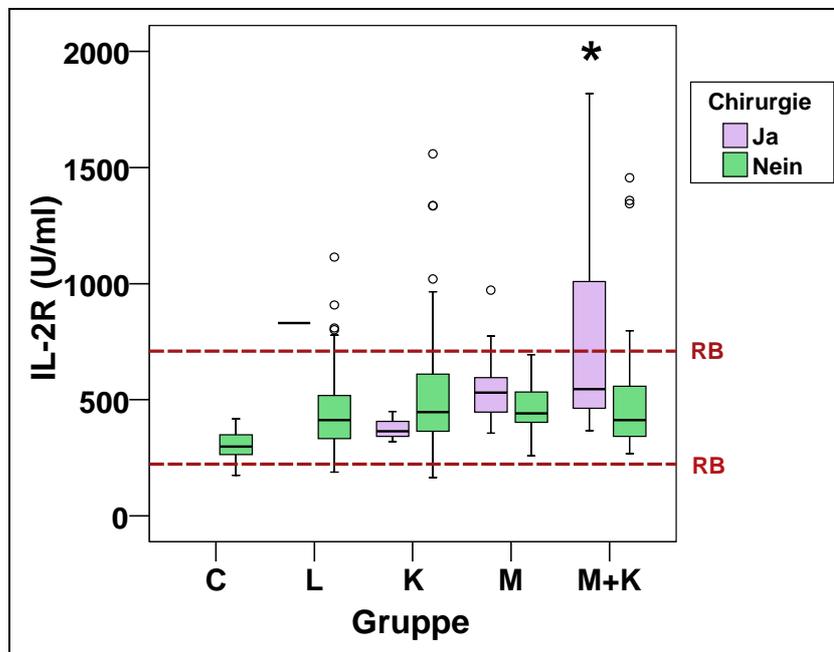


Abb. 31 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die IL-2R-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; IL-2R, löslicher Interleukin 2 Rezeptor; RB, Referenzbereich; (*), > Chirurgie nein.

Wurden nur die nicht chirurgisch versorgten Patienten analysiert (Abb. 32), zeigte sich, dass IL-2R in allen Patientengruppen signifikant höher war als in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Zwischen den verschiedenen Gruppen der chronisch Erkrankten gab es jedoch

keinen statistischen Unterschied. Allerdings fanden sich im Vergleich zur den Patienten mit Megakolon, wo keine IL-2R-Werte außerhalb des Referenzbereiches gefunden wurden, bei den Gruppen **L**, **K** und **M+K** signifikant mehr Werte über dem Referenzbereich. ($p < 0,01$).

Bei den Patienten mit Kardiomyopathie fand sich keine Beziehung zwischen IL-2R-Konzentration und Schweregrad der Herzschädigung. Zwischen der CRP- und IL-2R-Konzentration bestand eine schwache, jedoch signifikante Korrelation ($p < 0.001$) (Abb. 33). Wurden die IL-2R-Konzentrationen der Latenz-Gruppe analysiert, zeigte sich zwischen den Patienten mit Autoantikörper-Positivität und -Negativität kein Unterschied.

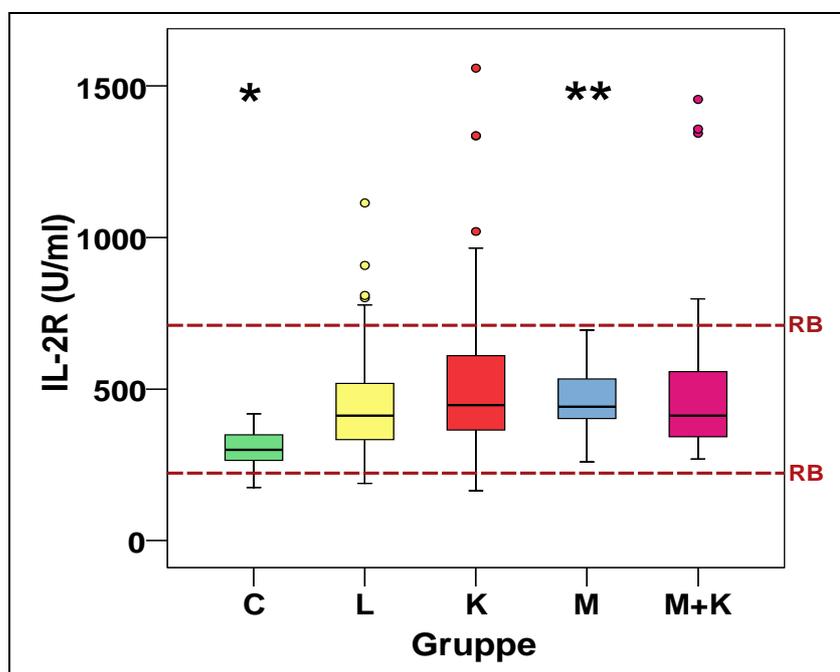


Abb. 32 IL-2R-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; IL-2R, löslicher Interleukin 2 Rezeptor; RB, Referenzbereich; (*), $p < 0,01$; (**), Prozent IL-2R-Werte außerhalb des Referenzbereiches $p < 0,01$.

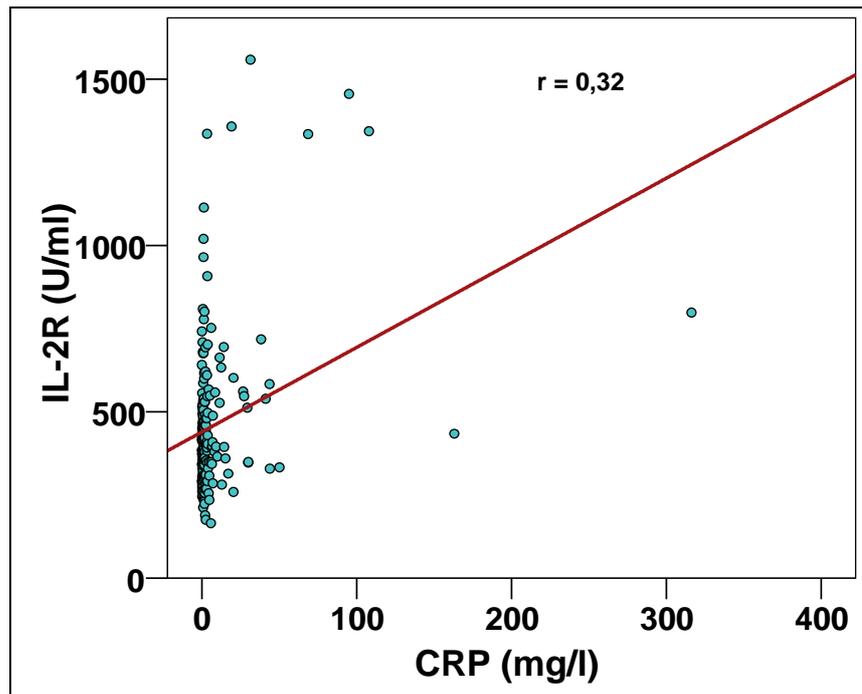


Abb. 33 Korrelation von CRP- und IL-2R-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

CRP, C-reaktives Protein, IL-2R, löslicher Interleukin-2-Rezeptor; r, Korrelationskoeffizient.

4.3.3. IL-6-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

In Abb. 34 ist dargestellt, dass sich in allen Untersuchungsgruppen ein größerer Anteil an IL-6-Konzentrationen über dem cut off befand. In der Kontrollgruppe lagen 23 %, in der Gruppe **L** 40 %, in Gruppe **K** 71 %, in Gruppe **M** 75 % und in Gruppe **M+K** 77 % der Werte über dem cut off von 3,4 pg/ml. Die erhöhten IL-6-Konzentrationen wurden dabei sowohl bei Patienten mit und ohne chirurgische Intervention gefunden, jedoch deutlicher ausgeprägt in den chirurgisch versorgten Patienten. In den Gruppen mit Kolonchirurgie hatten alle Patienten IL-6-Konzentrationen über dem cut off.

Bei Gruppe **M** ($p < 0,001$) und **M+K** ($p = 0,03$) lagen dabei die IL-6-Konzentrationen in den chirurgisch versorgten Patienten signifikant über den Werten der Patienten ohne chirurgische Intervention. Obwohl auch im Median die Patienten mit Schrittmacherimplantation in ihrer IL-6-Konzentration über den Patienten ohne Schrittmacherimplantation lagen, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen

beiden Gruppen gesichert werden. Die IL-6-Konzentration der chirurgisch versorgten Patienten in Gruppe **M** ($p < 0,01$) und **M+K** ($p < 0,05$) lag signifikant über der IL-6-Konzentration der chirurgisch versorgten Patienten der Gruppe **K** mit Schrittmacherimplantation.

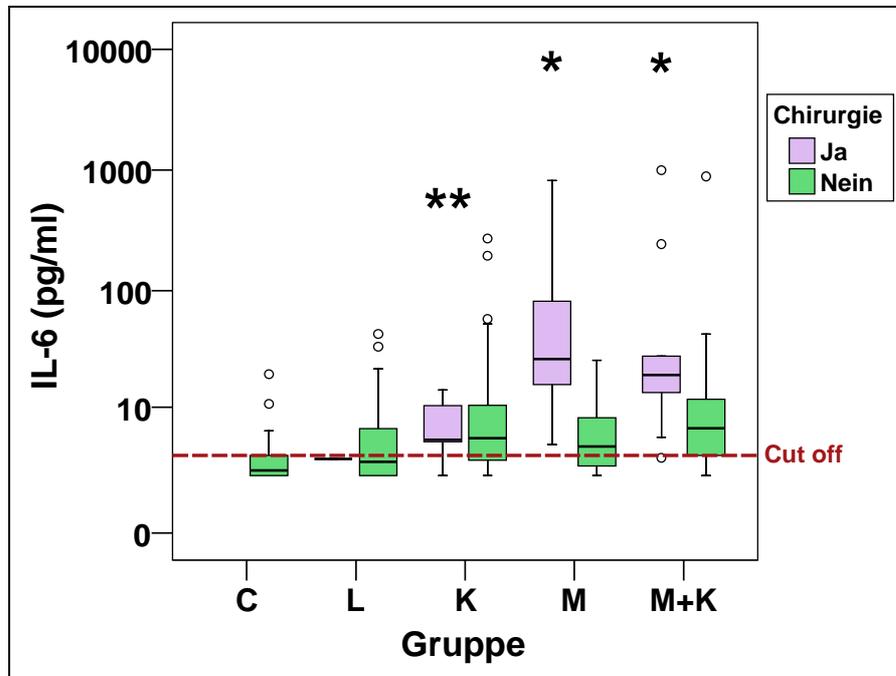


Abb. 34 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die IL-6-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; IL-6, Interleukin 6; (*), > ohne Chirurgie; (**), < M, M+K

Bei der Analyse der nicht chirurgisch versorgten Patienten (Abb. 35) fanden sich vergleichbare IL-6-Konzentrationen in der Kontroll- und Latenz-Gruppe. Gruppe **K** ($p < 0,001$), **M** ($p = 0,03$) und **M+K** ($0,001$) hatten im Vergleich zu Gruppe **C** signifikant erhöhte IL-6-Werte. Im Vergleich zu Gruppe **L** fanden sich in Gruppe **K** ($p < 0,001$) und **M+K** ($p = 0,002$) erhöhte IL-6-Konzentrationen. Zwischen Gruppe **L** und **M** konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Parallel dazu war auch der Anteil der Patienten mit IL-6-Werten über dem cut off im Vergleich zu Gruppe **C** und **L** signifikant größer in den Gruppe **K** ($p < 0,001$) und **M+K** ($p < 0,001$).

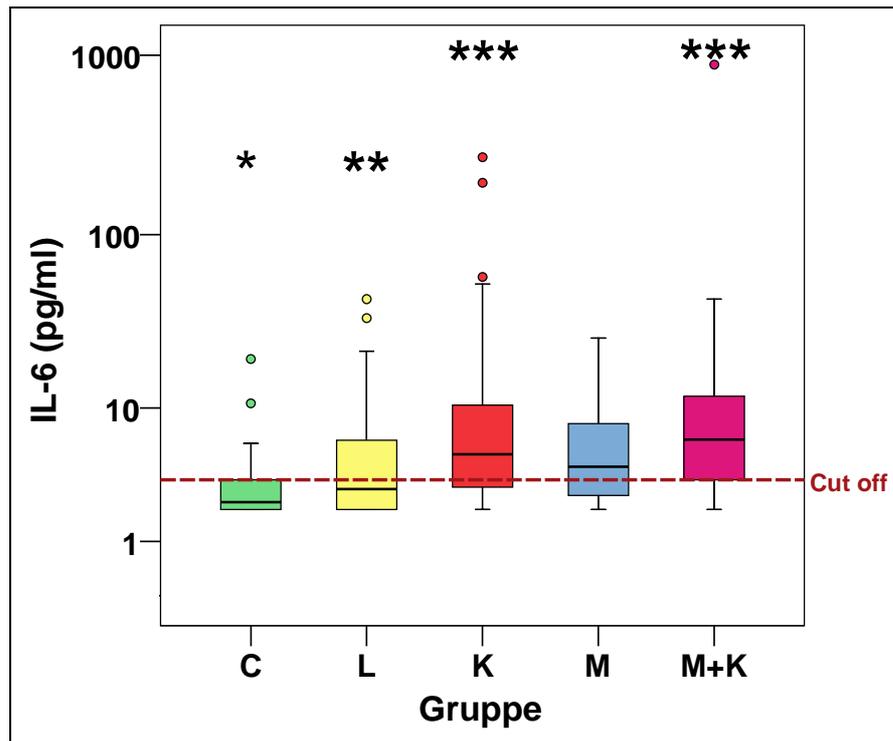


Abb. 35 IL-6-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; IL-6, Interleukin 6; (*), < K, M, M+K; (**), < K, M+K; (***), Prozent IL-6-Werte über cut off > C, L.

Bei den Patienten mit Kardiomyopathie fanden sich signifikant höhere IL-6-Konzentrationen (milde/moderate Kardiomyopathie $p < 0,001$; schwere Kardiomyopathie $p < 0,001$) als bei den Patienten der Latenz-Gruppe mit dem Risiko für Kardiomyopathie (Abb. 36).

Wurden die IL-6-Konzentrationen der Latenz-Gruppe analysiert, zeigte sich zwischen den Patienten mit Autoantikörper-Positivität und Negativität kein Unterschied (Abb. 37). Zwischen den Konzentrationen von IL-6 und CRP ($p < 0,001$) bzw. IL-2R ($p < 0,001$) bestanden schwache, jedoch signifikante Korrelationen (Abb. 38).

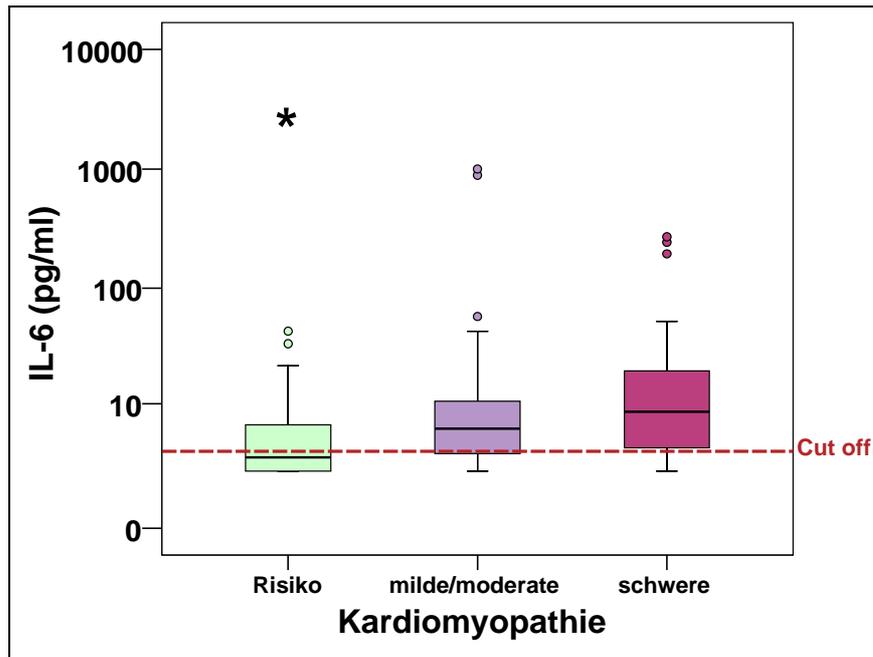


Abb. 36 IL-6-Konzentration in Abhängigkeit vom Schweregrad der Kardiomyopathie bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung
 IL-6, Interleukin 6; (*), < milde/moderate, schwere Kardiomyopathie.

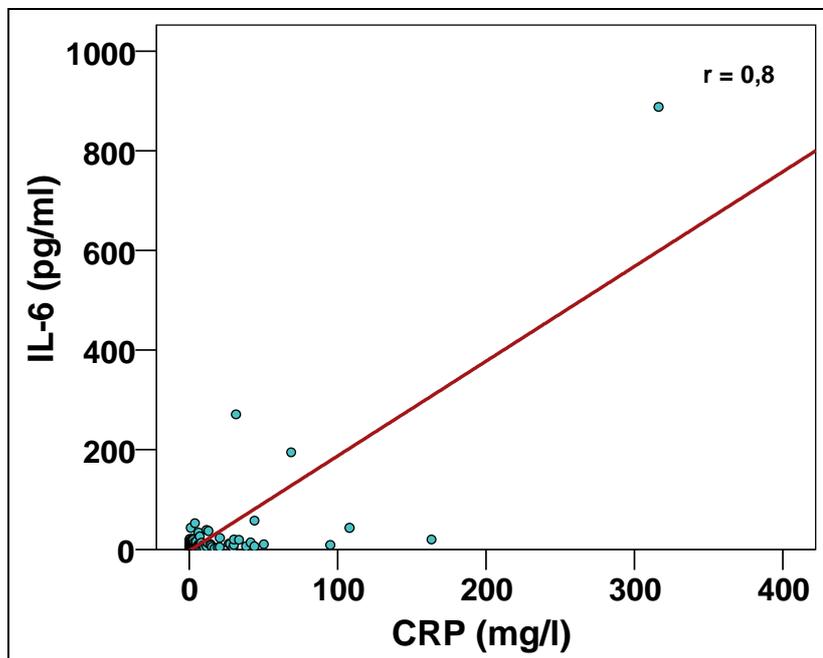


Abb. 37 Korrelation von CRP- und IL-6-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)
 CRP, C-reaktives Protein; IL-6, Interleukin 6; r, Korrelationskoeffizient.

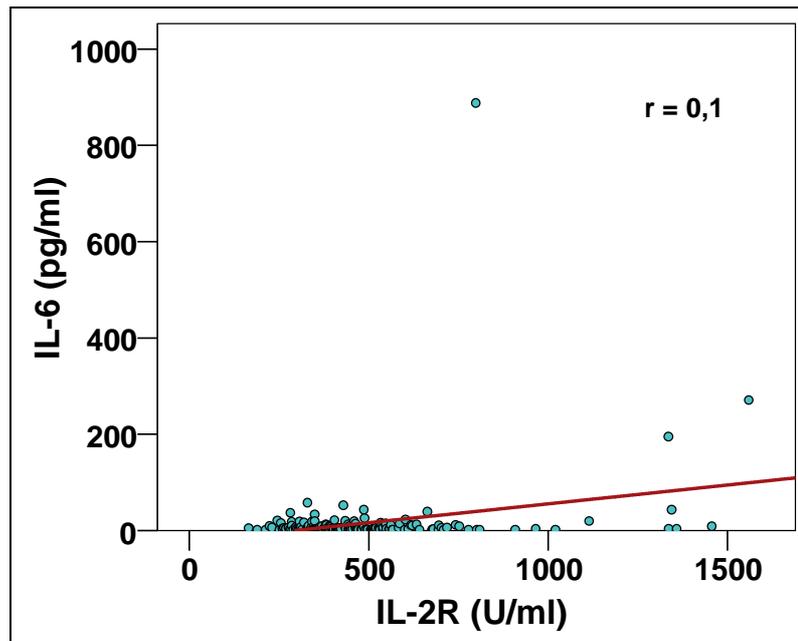


Abb. 38 Korrelation von IL-2R und IL-6-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

IL-2R, löslicher Interleukin 2 Rezeptor; IL-6, Interleukin 6; r, Korrelationskoeffizient.

4.3.4. IL-8-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Bei der Analyse der IL-8-Konzentration fiel auf, dass alle IL-8-Werte (ausgenommen die Werte eines Patienten in Gruppe **K** und von drei Patienten in Gruppe **M+K**) unterhalb des cut off von 64 pg/ml lagen. Die Werte oberhalb des cut off betrafen sowohl Patienten ohne (3 Patienten) und mit (1 Patient) chirurgischer Intervention. Unabhängig davon zeigten die chirurgisch versorgten Patienten in Gruppe **M** ($p < 0,001$) und **M+K** ($p < 0,03$) signifikant höhere IL-8-Konzentrationen als die nicht chirurgisch versorgten Patienten der jeweiligen Gruppen (Abb. 39). Ein Einfluss der Schrittmacherimplantation (Gruppe **K**) auf IL-8 wurde nicht beobachtet.

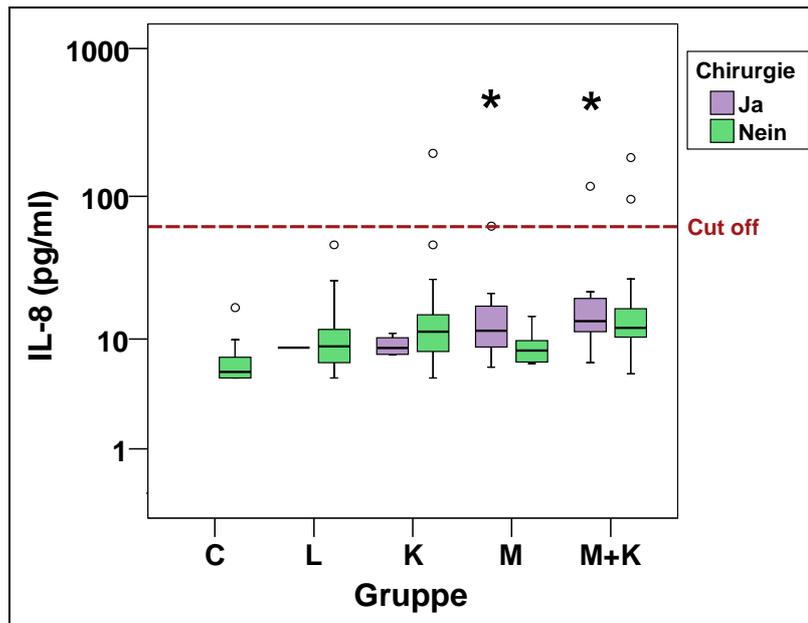


Abb. 39 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die IL-8 Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; IL-8, Interleukin-8; (*), > ohne Chirurgie;

Wurden nur die nicht chirurgisch versorgten Patienten analysiert, zeigten sich die niedrigsten IL-8 Werte in der Kontrollgruppe mit signifikanten Unterschieden ($p < 0,001$) zu allen Patientengruppen.

Die L-Gruppe wies niedrigere Werte gegenüber den Gruppen **K** und **M+K** ($p < 0,001$), nicht jedoch gegenüber der Gruppe **M** auf. In Gruppe **M** lagen die Werte signifikant unter denen der Gruppen **K** und **M+K** ($p = 0,03$). Unterschiede zwischen den Gruppen **K** und **M+K** existierten nicht (Abb. 40).

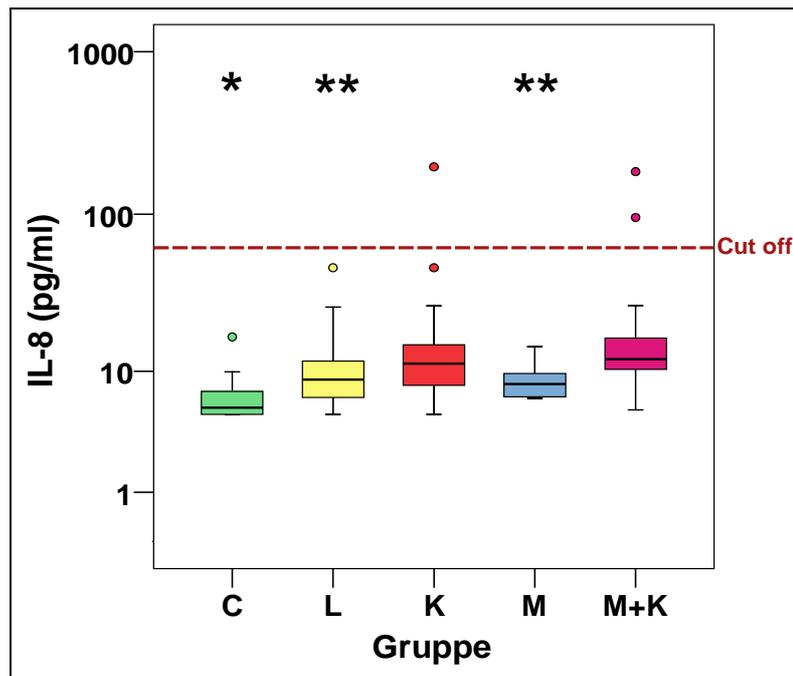


Abb. 40 IL-8-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; IL-8, Interleukin 8; (*), < L, K, M, M+K; (**), < K, M+K

Im Hinblick auf den Schweregrad der Kardiomyopathie stieg die IL-8-Konzentration von den Patienten mit dem Risiko für eine Kardiomyopathie in der Latenz-Gruppe über die Patienten mit milder/moderater ($p < 0,01$) hin zu den Patienten mit schwerer Kardiomyopathie ($p < 0,001$) signifikant an (Abb. 41). Auch der IL-8 Anstieg zwischen milder/moderater und schwerer Kardiomyopathie war signifikant ($p < 0,05$). Unterschiedliche IL-8 Konzentrationen in den Patienten mit Auto-Antikörperpositivität bzw. -negativität der Latenz-Gruppe wurden nicht beobachtet. Die IL-8- Konzentration korrelierte signifikant mit der Konzentration von CRP, IL-2R und IL-6 ($p < 0,05$) (Abb. 42, 43, und 44).

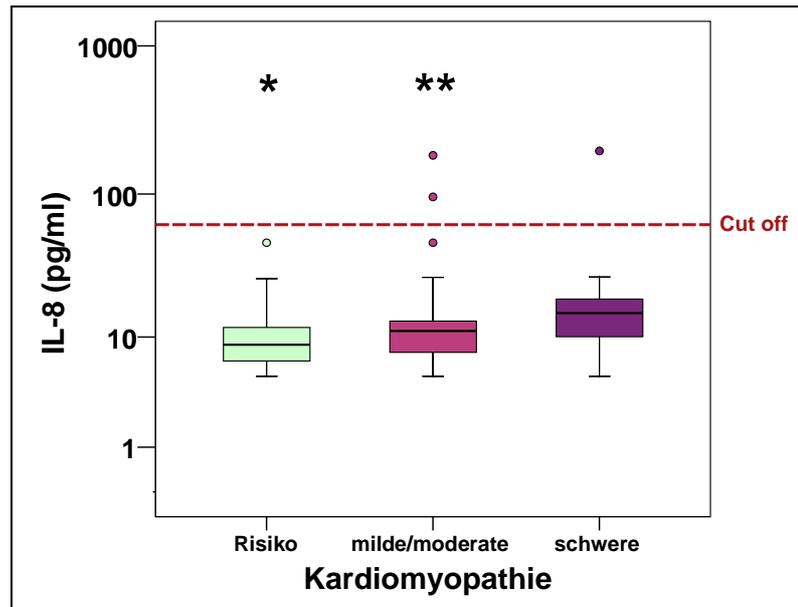


Abb. 41 IL-8-Konzentration in Abhängigkeit vom Schweregrad der Kardiomyopathie bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung
 IL-8, Interleukin 8; (*), < milde/moderate, schwere Kardiomyopathie; (**), < schwere Kardiomyopathie.

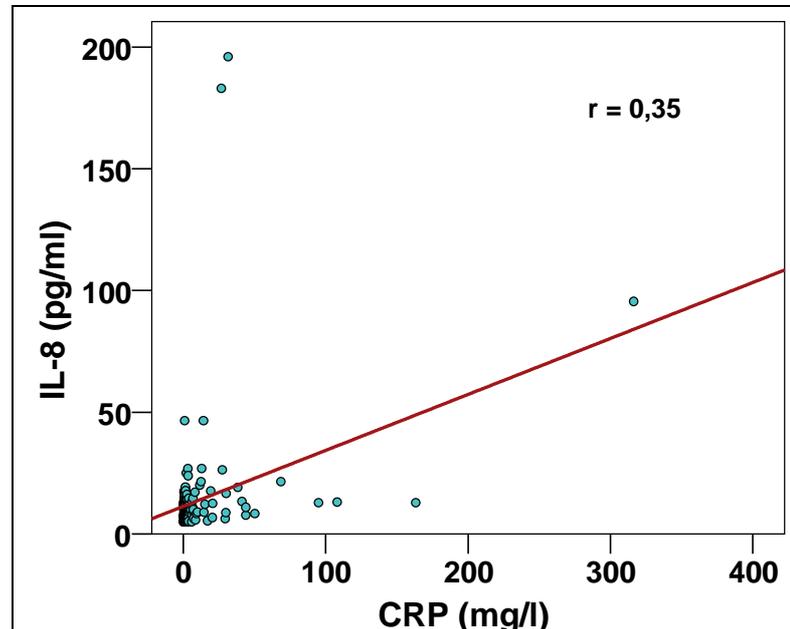


Abb. 42 Korrelation von CRP- und IL-8-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)
 CRP, C-reaktives Protein; IL-8, Interleukin 8; r, Korrelationskoeffizient.

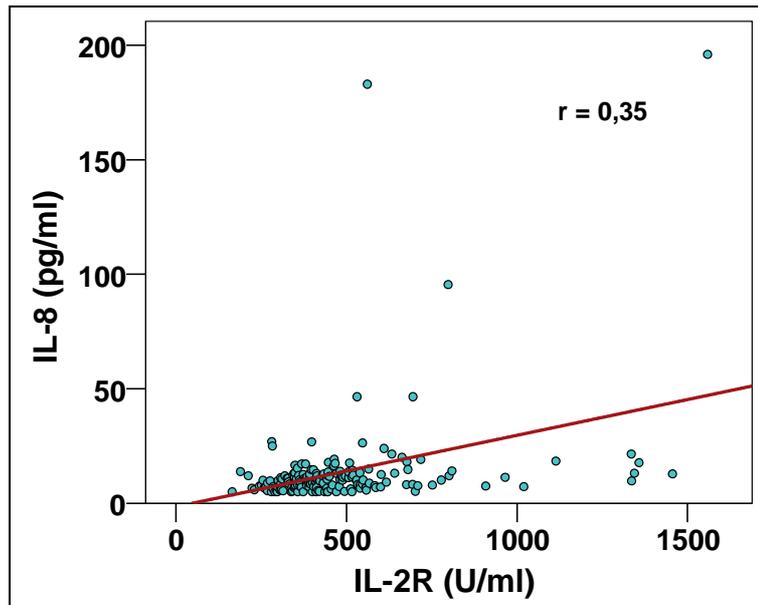


Abb. 43 Korrelation von IL-2R- und IL-8-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

IL-2R, löslicher Interleukin 2 Rezeptor; IL-8, Interleukin 8; r, Korrelationskoeffizient.

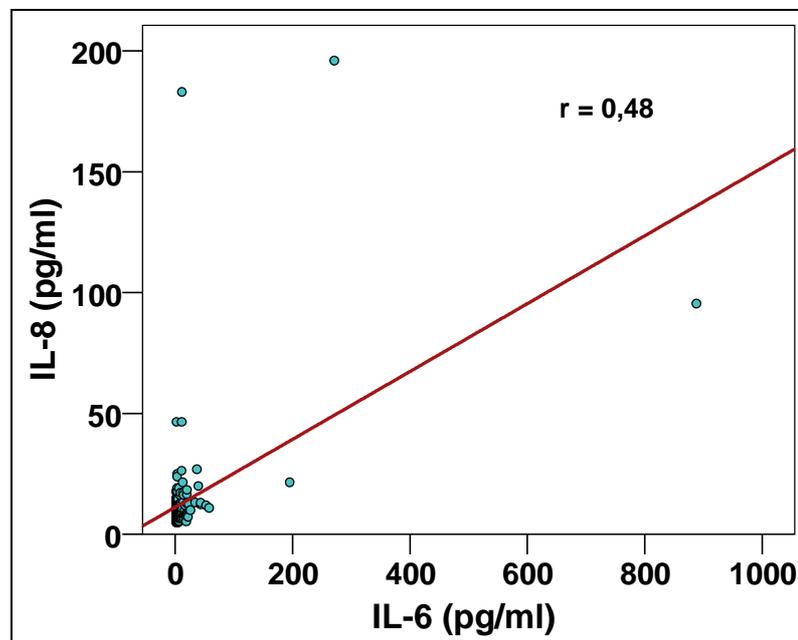


Abb. 44 Korrelation von IL-6- und IL-8-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; r, Korrelationskoeffizient.

4.3.5. IL-10-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Ein Einfluss der chirurgischen Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die IL-10-Konzentration konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 45). Während alle Probanden der Kontrollgruppe IL-10-Werte unterhalb des cut off aufwiesen, lagen 12 % (Gruppe **L**), 17 % (Gruppe **K**), 12 % (Gruppe **M**) und 23 % (Gruppe **M+K**) der IL-10-Werte über dem cut off von 9,1 pg/ml. Die Anzahl der IL-10-Konzentrationen über dem cut off betraf dabei überwiegend die nicht chirurgisch versorgten Patienten.

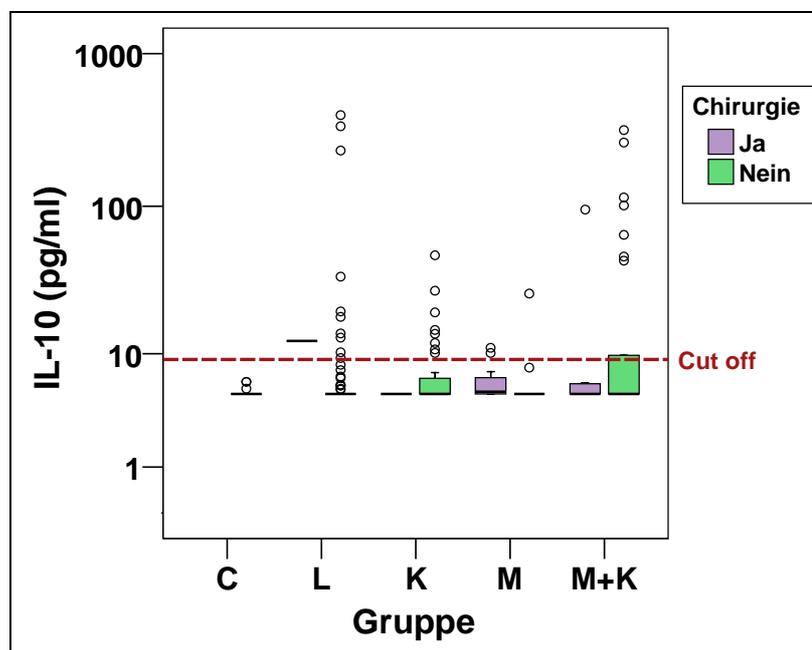


Abb. 45 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die IL-10-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; IL-10, Interleukin 10.

Da die chirurgische Intervention keinen Einfluss auf die IL-10-Konzentration hatte, wurden in die weiteren Analysen sowohl chirurgisch versorgte als auch nicht chirurgisch versorgte Patienten eingeschlossen. Dabei war die IL-10-Konzentration in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) signifikant niedriger als in Gruppe **K**, **M**, **M+K**. Zu Gruppe **L**

bestand kein Unterschied (Abb. 46). Schwache Korrelationen bestanden zwischen den Konzentrationen von CRP ($p < 0,01$), IL-6 ($p < 0,001$), IL-8 ($p < 0,05$) und der IL-10 Konzentration (Abb. 47, 48, 49). Keine Korrelation ergab sich zwischen IL-10 und IL-2R. Eine Abhängigkeit der IL-10-Konzentration vom Schweregrad der Kardiomyopathie wurde nicht beobachtet.

Unterschiedliche IL-10-Konzentrationen in den Patienten der Latenz-Gruppe mit Positivität bzw. Negativität für die Auto-Antikörper waren nicht nachweisbar.

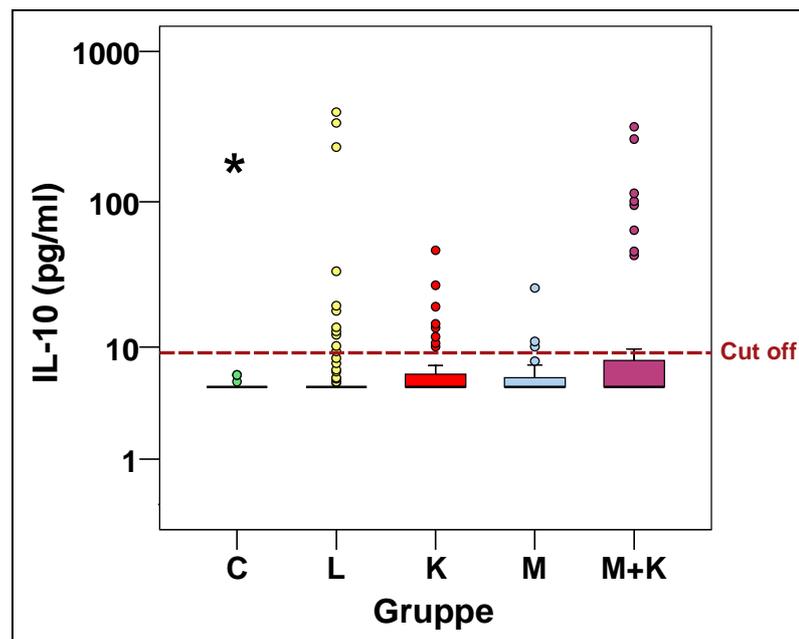


Abb. 46 IL-10-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; IL-10, Interleukin 10; (*), $< K, M, M+K$.

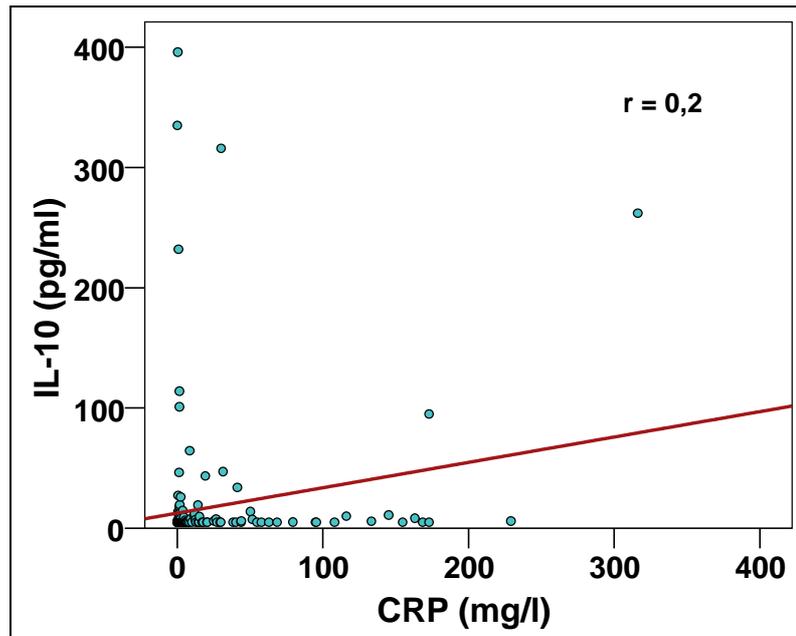


Abb. 47 Korrelation von CRP- und IL-10-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)
 CRP, C-reaktives Protein; IL-10, Interleukin 10; r, Korrelationskoeffizient.

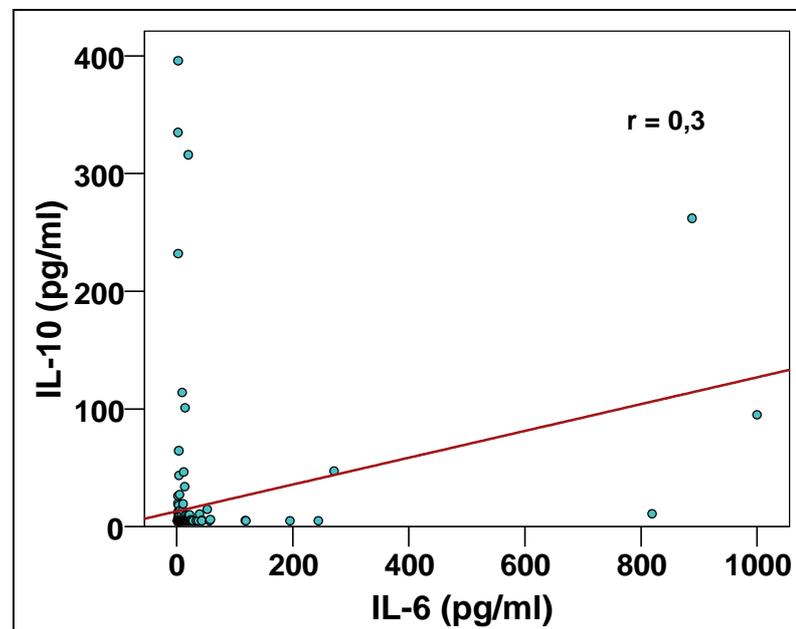


Abb. 48 Korrelation von IL-6- und IL-10-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)
 IL-6, Interleukin 6; IL-10, Interleukin 10; r, Korrelationskoeffizient.

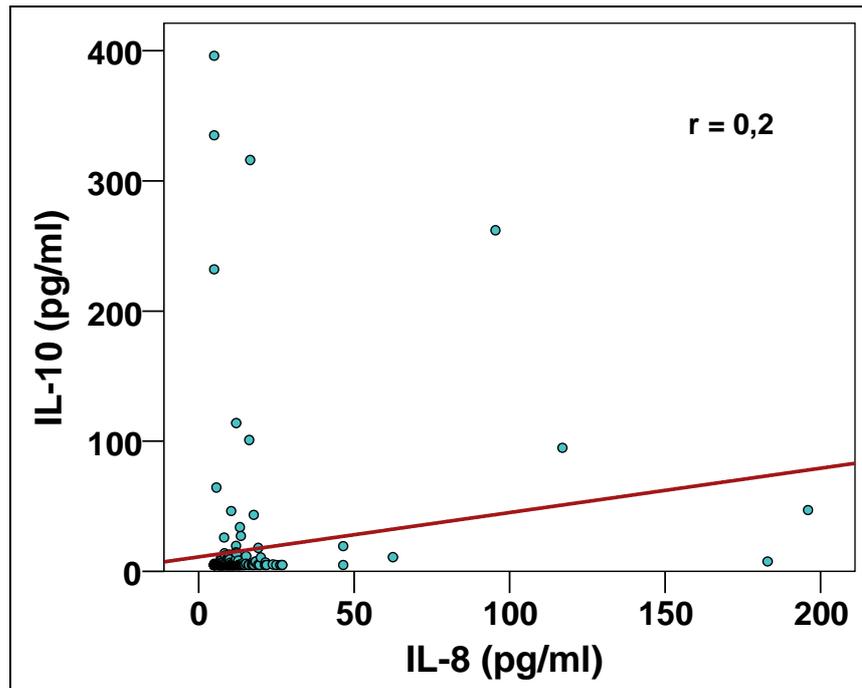


Abb. 49 Korrelation von IL-8- und IL-10-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung ohne chirurgische Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie)

IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; r, Korrelationskoeffizient.

4.3.6. TNF α -Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

57 % der Kontrollen hatten TNF α -Konzentrationen über dem cut off. Dagegen lagen in Gruppe **L** mit 81 % ($p < 0,05$), **K** mit 91 % ($p = 0,02$) und **M+K** mit 92 % ($p < 0,05$) signifikant mehr Werte über dem cut off von 8,1 pg/ml. Zur Gruppe **M** bestand kein Unterschied (Abb. 50). Die verschiedenen Patientengruppen unterschieden sich im Hinblick auf Werte über dem cut off nicht.

Obwohl die Mediane für die TNF α -Konzentration in den chirurgisch versorgten Patienten insbesondere in den Gruppen **M** und **M+K** höher waren als in den nicht chirurgisch versorgten Patienten, ließ sich kein signifikanter Einfluss der Chirurgie sichern.

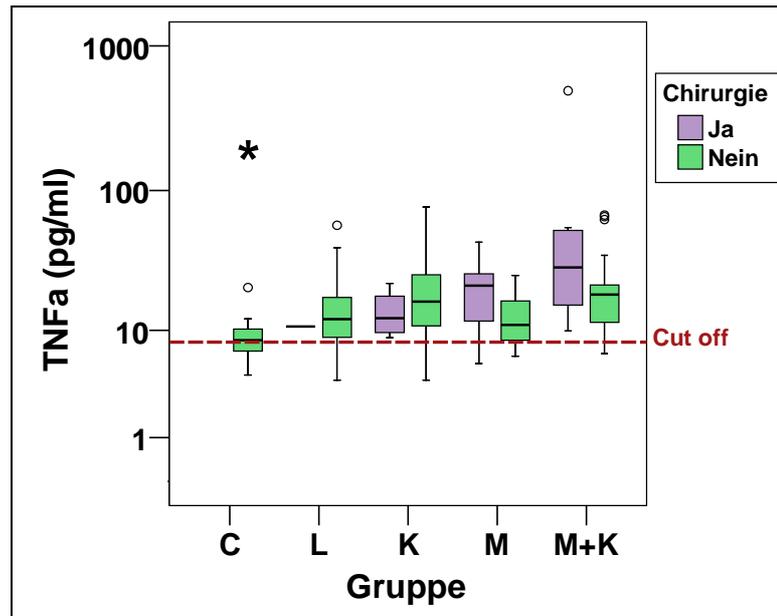


Abb. 50 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die TNF α -Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; TNF α , Tumor-Nekrose-Faktor α ; (*) < L, K, M+K.

Für die weitere Analyse werden deshalb alle Patienten (mit chirurgischer und ohne chirurgische Intervention) eingeschlossen. In der TNF α -Konzentration lag die Gruppe **C** signifikant unter den Patientengruppen **L**, **K**, **M** und **M+K** ($p < 0,001$). Im Vergleich zur Gruppe **L** fanden sich in den Gruppen **K** ($p = 0,03$) und **M+K** ($p = 0,002$) jedoch nicht in Gruppe **M** signifikant höhere Werte (Abb. 51).

Signifikante Korrelationen von TNF α und den anderen Zytokinen konnten nicht nachgewiesen werden.

Im Vergleich mit den Patienten der Latenz-Gruppe mit dem Risiko für Kardiomyopathie wiesen die Patienten mit milder/moderater ($p = 0,002$) und schwerer Kardiomyopathie ($p = 0,04$) höhere TNF α -Konzentrationen auf (Abb. 52).

In der Latenz-Gruppe unterschieden sich Patienten mit Positivität bzw. Negativität für Auto-Antikörper in der TNF α -Konzentration nicht.

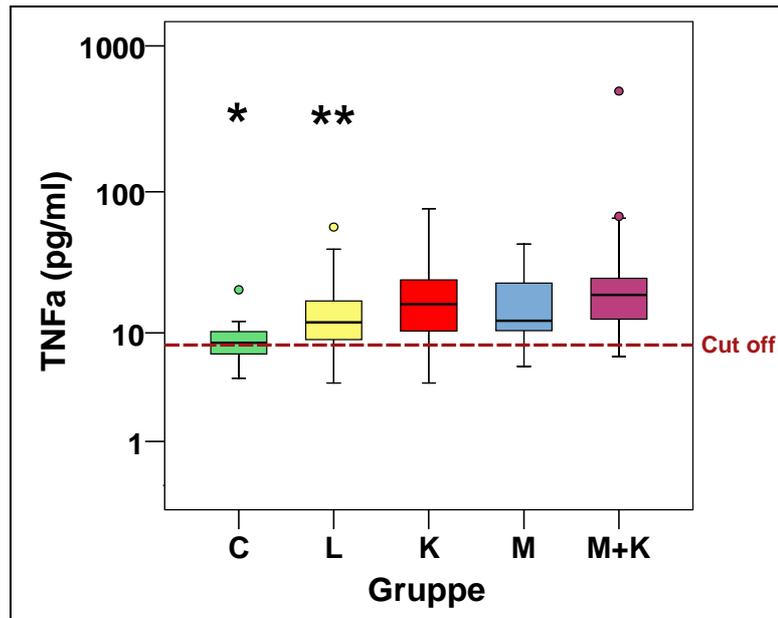


Abb. 51 TNF α -Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; TNF α , Tumor-Nekrose-Faktor α ; (*) < L, K, M, M+K; (**) < K, M+K.

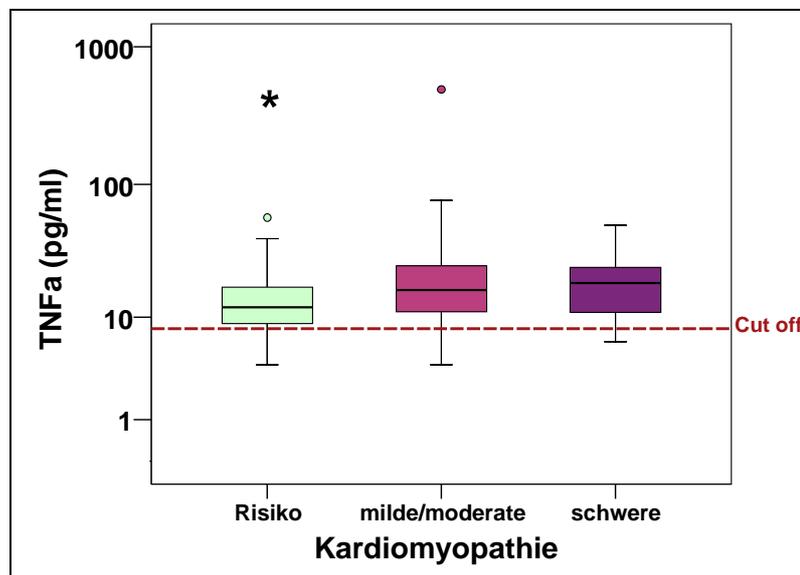


Abb. 52 TNF α -Konzentration in Abhängigkeit vom Schweregrad der Kardiomyopathie bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

TNF α , Tumor-Nekrose-Faktor α ; (*), < milde/moderate, schwere Kardiomyopathie

4.3.7. MPO-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Sowohl die Probanden der Kontrollgruppe als auch die Patienten (Ausnahme: eine Kontrollperson, je ein Patient der Gruppe **L** und Gruppe **M+K**) hatten MPO-Werte unterhalb des cut off von 654 ng/ml. Die chirurgische Intervention hatte keinen Einfluss auf die MPO-Konzentration (Abb. 53). In die weiteren Analysen wurden deshalb sowohl die Patienten mit chirurgischer als auch die ohne chirurgische Intervention eingeschlossen. Es zeigte sich dabei, dass unterschiedliche MPO-Konzentrationen in den Untersuchungsgruppen nicht existierten (Abb. 54). Signifikante Korrelationen zu anderen Entzündungsmarkern wurden nicht gefunden. Eine Abhängigkeit der MPO-Konzentration vom Schweregrad der Kardiomyopathie wurde nicht beobachtet. In der Latenz-Gruppe hatten Auto-Antikörper-Positivität bzw. -Negativität keinen Einfluss auf die MPO-Konzentration.

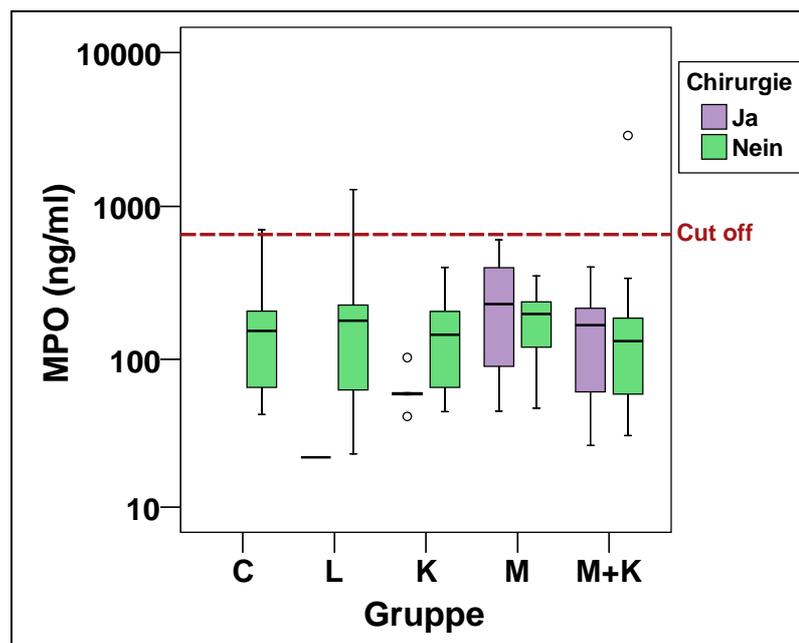


Abb. 53 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die MPO-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; MPO, Myeloperoxidase.

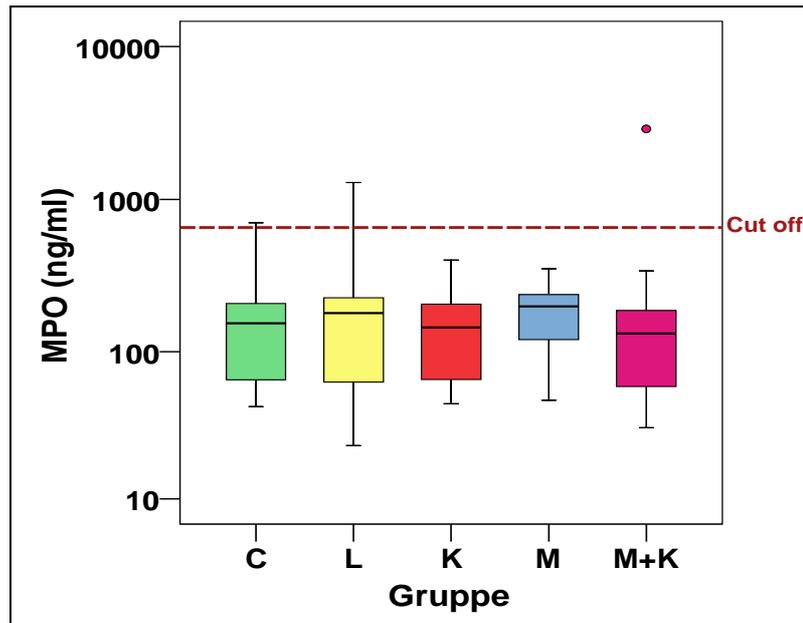


Abb. 54 MPO-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; MPO, Myeloperoxidase.

4.4. Marker für Oxidativen Stress

4.4.1. MDA-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Patientengruppen lagen die MDA-Konzentrationen überwiegend über dem cut off von 2 $\mu\text{mol/l}$. Auffällig ist, dass in der Gruppe mit Kardiomyopathie und Schrittmacherimplantation der Median der MDA-Konzentration deutlich über dem ohne Schrittmacherimplantation lag. In der Gruppe **M+K** hatten die Patienten ohne chirurgische Intervention überraschenderweise signifikant höhere MDA-Konzentrationen als die chirurgisch versorgten Patienten ($p = 0,02$) (Abb. 55). Die weiteren Analysen beziehen sich dennoch sowohl auf die chirurgisch versorgten als auch nicht versorgten Patienten. Dabei hatten die Kontrollen signifikant niedrigere MDA-Konzentrationen als die Patienten in den Gruppen **L** und **K** ($p = 0,02$). Höhere MDA-Konzentrationen wurden in Gruppe **L** und **K** im Vergleich zu

Gruppe **M+K** ($p < 0,001$) und **M** ($p < 0,05$) beobachtet (Abb. 56). Signifikante Korrelationen zu den Entzündungsmarkern bestanden nicht. Der Schweregrad der Kardiomyopathie beeinflusste die MDA-Konzentration nicht.

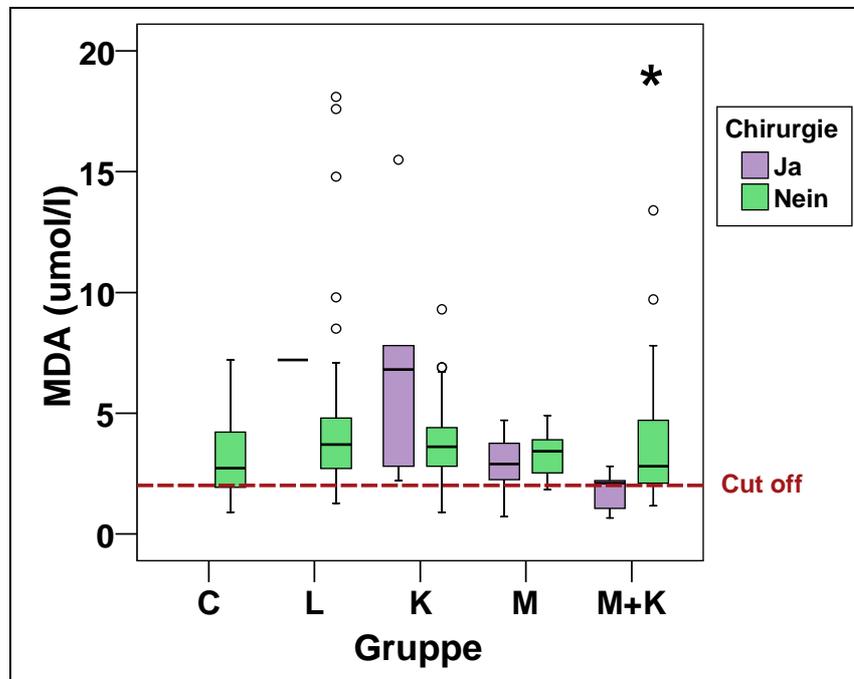


Abb. 55 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die Malondialdehyd-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; MDA, Malondialdehyd; (*), < ohne chirurgische Intervention.

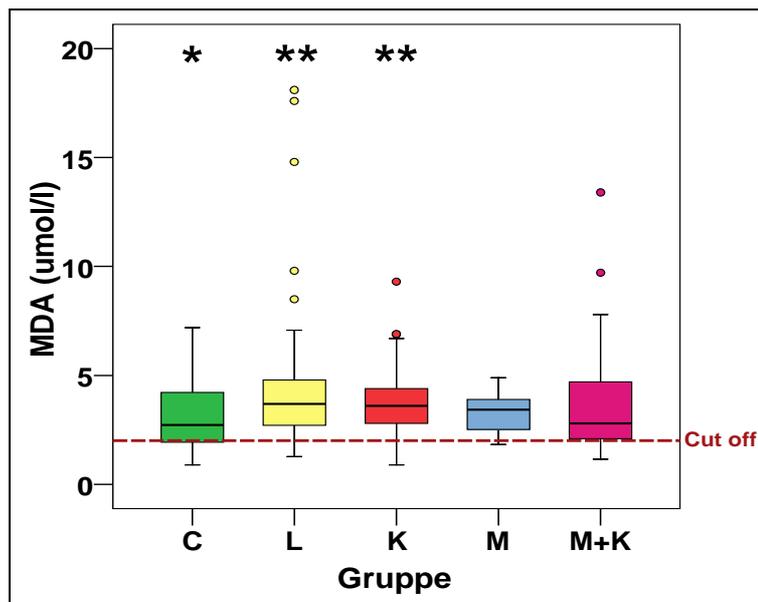


Abb. 56 MDA-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; MDA, Malondialdehyde; (*), < L, K ; (**), > M, M+K.

4.4.2. Lipidperoxid-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Die Verteilung der LPO-Werte entsprechend den Angaben des Testherstellers in weniger als 180 µmol/l (cut off 1) (kein Oxidativer Stress), 180-310 µmol/l (mäßiger Oxidativer Stress) und mehr als 310 µmol/l (cut off 2) (starker Oxidativer Stress) zeigte zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Die chirurgische Intervention hatte keinen Einfluss auf die LPO-Konzentration. In die weitere Analyse wurden deshalb die Patienten mit chirurgischer als auch die ohne chirurgische Intervention einbezogen (Abb. 57).

Signifikante LPO-Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen waren nicht sichtbar (Abb. 58). Im Median lag die Kontrollgruppe unter allen Patientengruppen. Korrelationen zu Entzündungsmarkern wurden nicht beobachtet. Eine signifikante Korrelation bestand zur MDA-Konzentration ($p < 0,003$) (Abb. 59). Ein Einfluss des Schweregrades der Kardiomyopathie auf die LPO-Konzentration bestand nicht. Auch bei den Patienten der Latenz-Gruppe mit Positivität bzw. Negativität für Auto-Antikörper ergaben sich keine unterschiedlichen LPO-Konzentrationen.

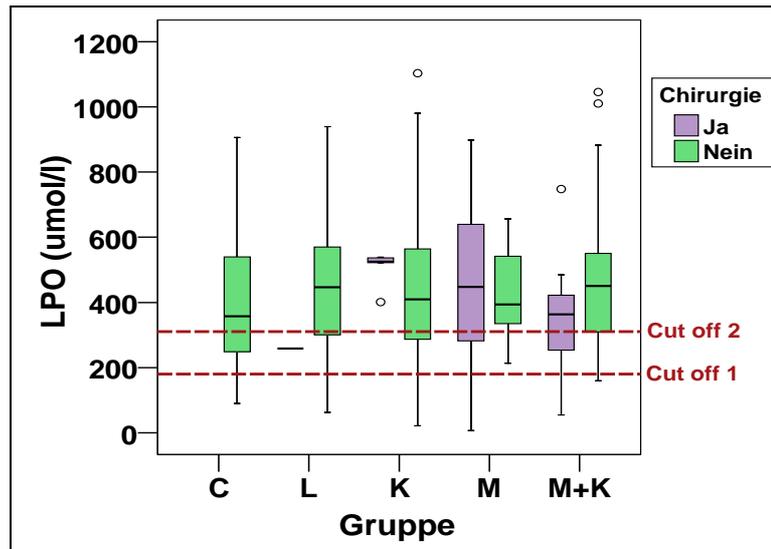


Abb. 57 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die Lipidperoxid-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; LPO, Lipidperoxide; > cut off 1, mäßiger Oxidativer Stress; > cut off 2, starker Oxidativer Stress.

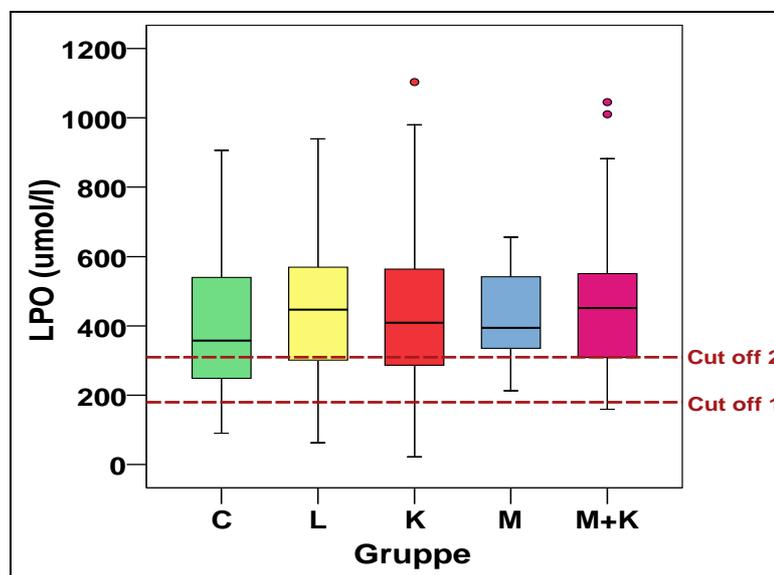


Abb. 58 LPO-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; LPO, Lipidperoxide.

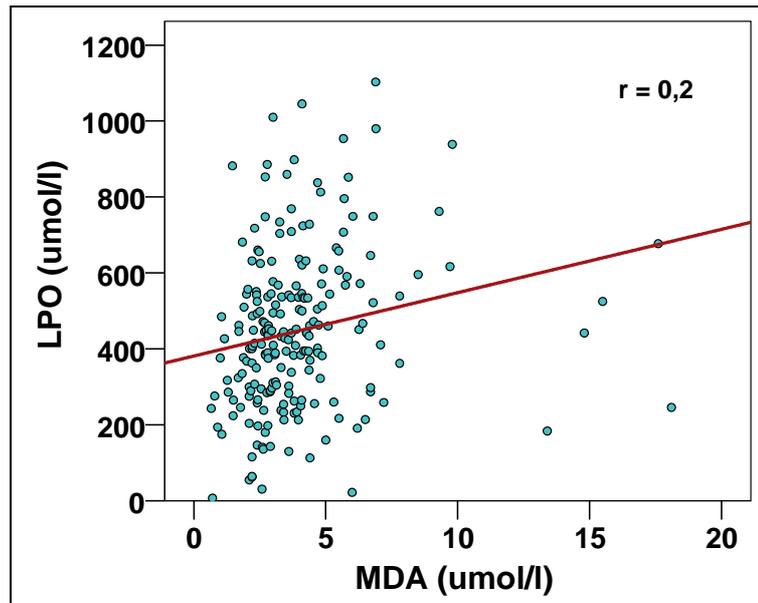


Abb. 59 Korrelation von MDA- und LPO-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

MDA, Malondialdehyde; LPO, Lipidperoxide; r, Korrelationskoeffizient.

4.5. Bestimmung der Herzmarker

4.5.1. NT-proBNP-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Nur die Kolonchirurgie hatte einen Einfluss auf die NT-proBNP-Konzentration. Dadurch fanden sich signifikant höhere Konzentrationen in den chirurgisch versorgten Patienten in Gruppe **M** ($p < 0,001$) und **M+K** ($p = 0,015$) (Abb. 60). Für die weiteren Analysen wurden deshalb die chirurgisch versorgten Patienten dieser Gruppen ausgeschlossen. Nutzt man den cut off von 125 pg/ml, unterhalb dessen sich mit einer diagnostischen Spezifität von 98 % die NT-proBNP-Werte von Gesunden befinden, zeigte sich, dass nahezu alle Kontrollpersonen und die Patienten der Gruppen **L** und **M** Werte unterhalb dieses cut off hatten. Nur 7 %, 4 % und 8 % der Patienten in den Gruppen **C**, **L** und **M** hatten NT-proBNP über diesem cut off. Dagegen fanden sich in Gruppe **K** ($p < 0,001$) und **M+K** ($p < 0,01$) mit 53 % bzw. 49 % signifikant mehr Patienten mit NT-proBNP über dem cut off von 125 pg/ml. Erst oberhalb eines cut off von 400 pg/ml kann man mit einer diagnostischen Sensitivität von 98 % davon ausgehen, dass die Patienten krank sind. In

der Gruppe **K** und **M+K** fanden sich bei 33 % bzw. 24 % der Patienten NT-proBNP-Werte über dem cut off von 400 pg/ml.

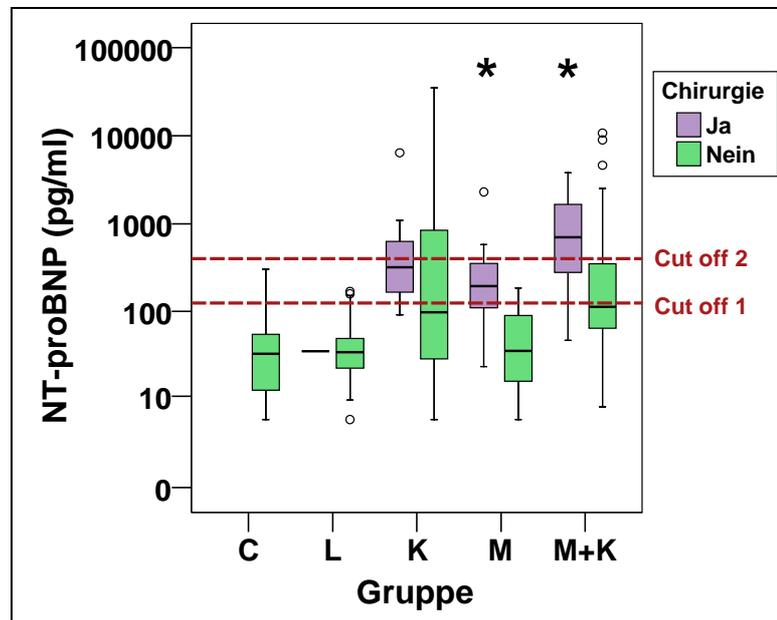


Abb. 60 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die NT-proBNP-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; NT-proBNP, N-terminales B-Typ Natriuretisches Peptid; Cut off 1 = 125 pg/ml (diagnostische Spezifität 98 %); Cut off 400 pg/ml (diagnostische Sensitivität 98 %); (*), > ohne Chirurgie M, M+K.

Allgemein hatten die Patienten der Gruppe **K**, **M** und **M+K** ($p < 0,001$) signifikant höhere NT-proBNP-Konzentrationen als die Patienten der Gruppe **C** und **L**. Zusätzlich lagen die NT-proBNP-Werte in der Gruppe **M+K** ($p = 0,003$) und **K** ($p = 0,02$) signifikant über denen der Gruppe **M**. Zwischen **K** und **M+K** bestand kein Unterschied (Abb. 61). Signifikante, wenn auch schwache Korrelationen bestanden zwischen der NT-proBNP-Konzentration und der Konzentration von CRP ($p = 0,02$) (Abb. 62) bzw. IL-8 ($p < 0,05$) (Abb. 63).

Wurde mittels linearer Regression geprüft, welchen Einfluss der Schweregrad der Kardiomyopathie (Risiko für Kardiomyopathie, milde Kardiomyopathie, moderate Kardiomyopathie, schwere Kardiomyopathie) auf die NT-proBNP-Konzentration hat,

zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) (Abb. 64). Wurden milde und moderate Kardiomyopathie zusammengefasst, stieg die NT-proBNP-Konzentration von den Patienten der Latenz-Gruppe mit dem Risiko für Kardiomyopathie signifikant zu den Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie an ($p < 0,001$). Von der Gruppe mit milder/moderater Kardiomyopathie hin zur Gruppe mit schwerer Kardiomyopathie kam es zu einem weiteren Anstieg der NT-proBNP-Konzentration ($p < 0,001$) (Abb. 65). In der Gruppe mit milder/moderater Kardiomyopathie hatten 35 % der Patienten NT-proBNP-Werte oberhalb des cut off von 125 pg/ml, 20 % sogar Werte über dem cut off von 400 pg/ml. In der Gruppe mit schwerer Kardiomyopathie hatten 87 % Werte über dem cut off von 125 pg/ml, 59 % über dem cut off von 400 pg/ml. Zwischen den Patienten der Latenz-Gruppe mit Auto-Antikörperpositivität bzw. -negativität existierten keine unterschiedlichen NT-proBNP-Konzentrationen. Für alle in die Analyse eingeschlossenen Patienten korrelierte die NT-proBNP-Konzentration mit dem beta1-AAK und M2-AAK Level ($p < 0,03$) (Abb. 66, 67). Zum beta2-AAK Level wurde keine Korrelation beobachtet.

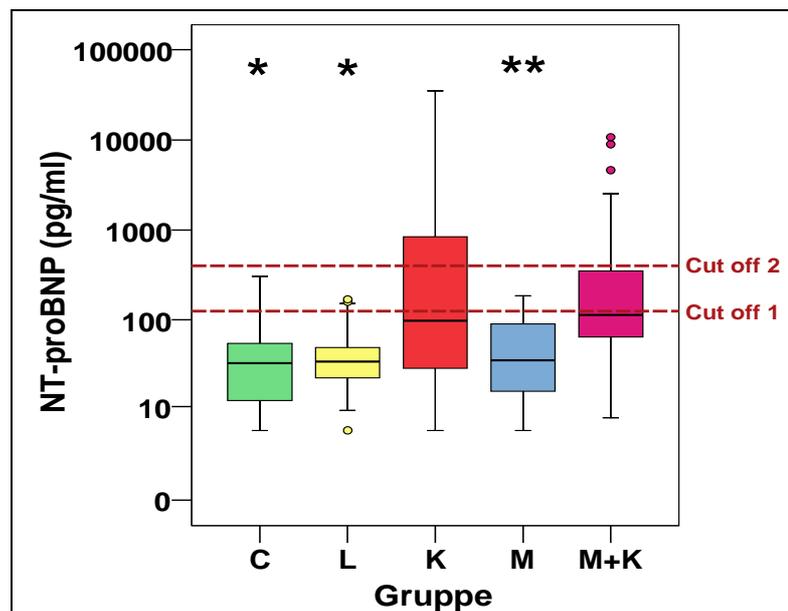


Abb. 61 NT-proBNP-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung (ausgeschlossen wurden die Patienten mit Kolonchirurgie in den Gruppen M und M+K)

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretisches Peptid; Cut off 1 = 125 pg/ml (diagnostische Spezifität 98 %); Cut off 2 = 400 pg/ml (diagnostische Sensitivität 98 %); (*), < K, M, M+K; (**), < K, M+K.

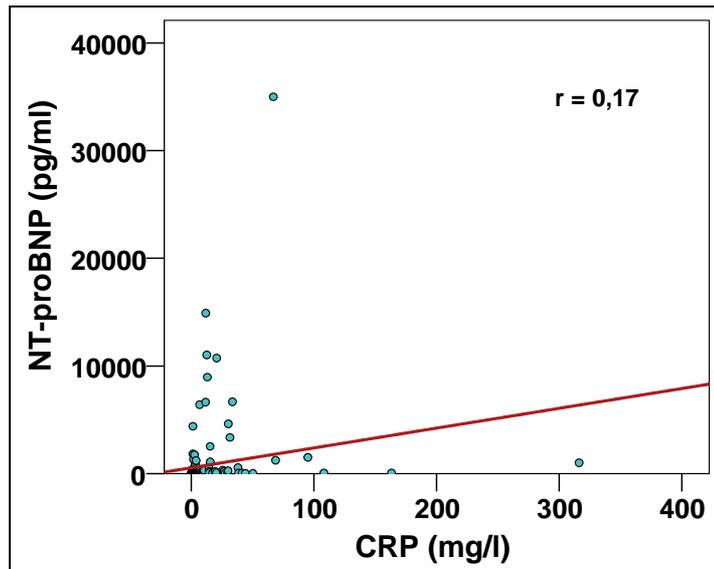


Abb. 62 Korrelation von CRP- und NT-proBNP-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung. Ausgeschlossen wurden die Patienten mit Kolonchirurgie in den Gruppen M und M+K

CRP, C-reaktives Protein; NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretisches Peptid; r, Korrelationskoeffizient.

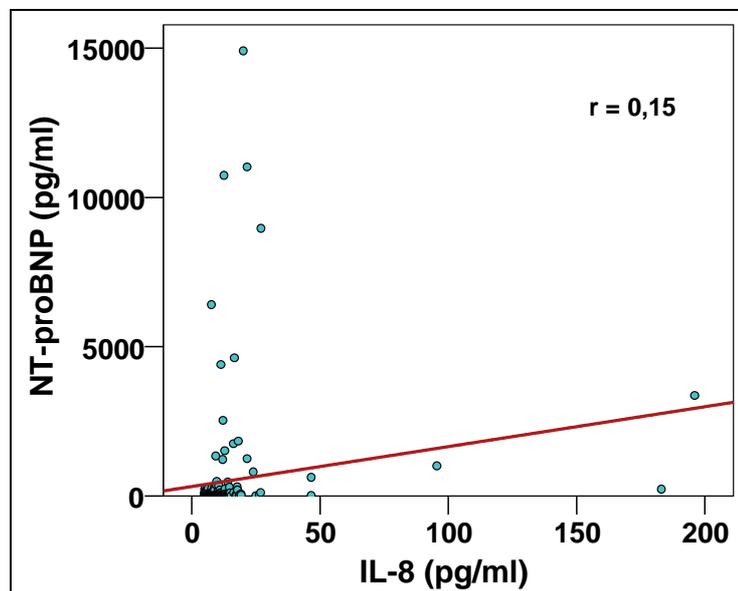


Abb. 63 Korrelation von IL-8- und NT-proBNP-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung. Ausgeschlossen wurden die Patienten mit Kolonchirurgie in den Gruppen M und M+K

IL-8, Interleukin 8; NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretisches Peptid; r, Korrelationskoeffizient.

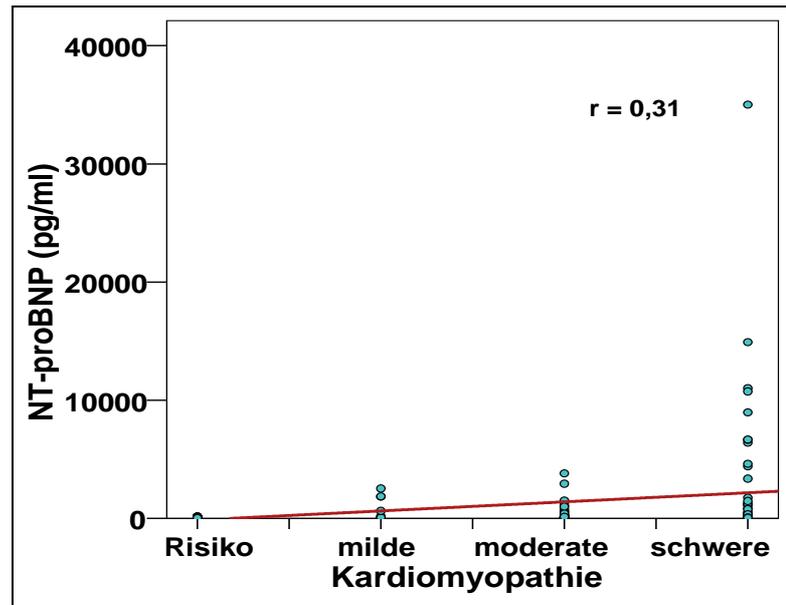


Abb. 64 Korrelation von NT-proBNP und Schweregrad der Kardiomyopathie

NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretisches Peptid; r, Korrelationskoeffizient.

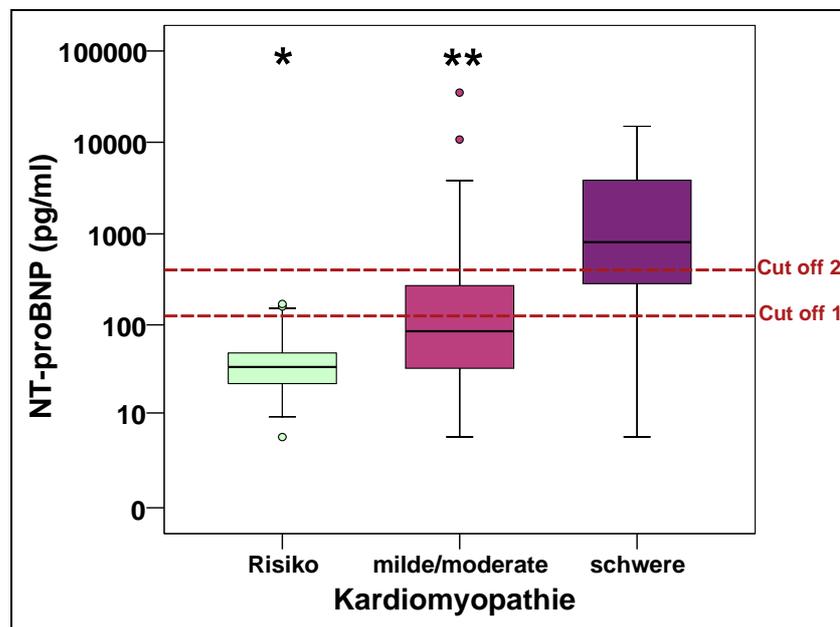


Abb. 65 NT-proBNP-Konzentration in Abhängigkeit vom Schweregrad der Kardiomyopathie bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretisches Peptid; Cut off 1 = 125 pg/ml (diagnostische Spezifität 98 %); cut off 400 pg/ml (diagnostische Sensitivität 98 %); (*), < milde/moderate Kardiomyopathie; (**), < schwere Kardiomyopathie.

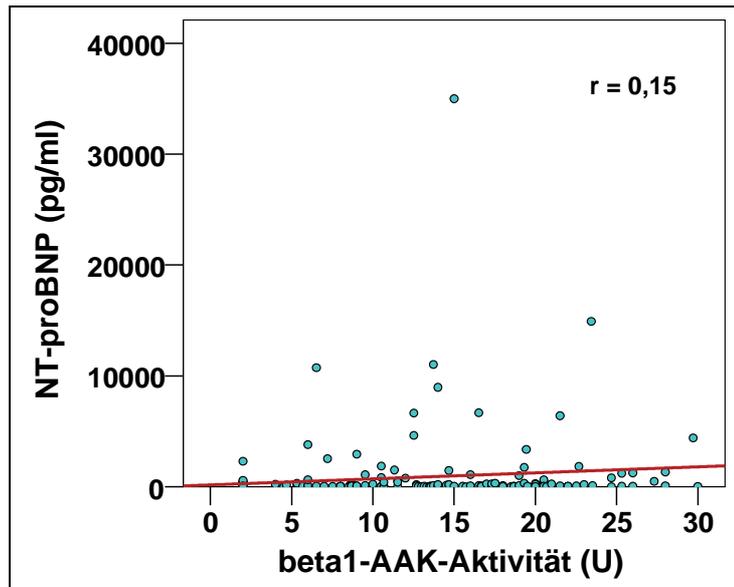


Abb. 66 Korrelation der beta1-AAK-Aktivität und NT-proBNP-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretisches Peptid; beta1-AAK-Aktivität, Auto-Antikörper-Aktivität gegen beta-1 Adrenorezeptor; r, Korrelationskoeffizient.

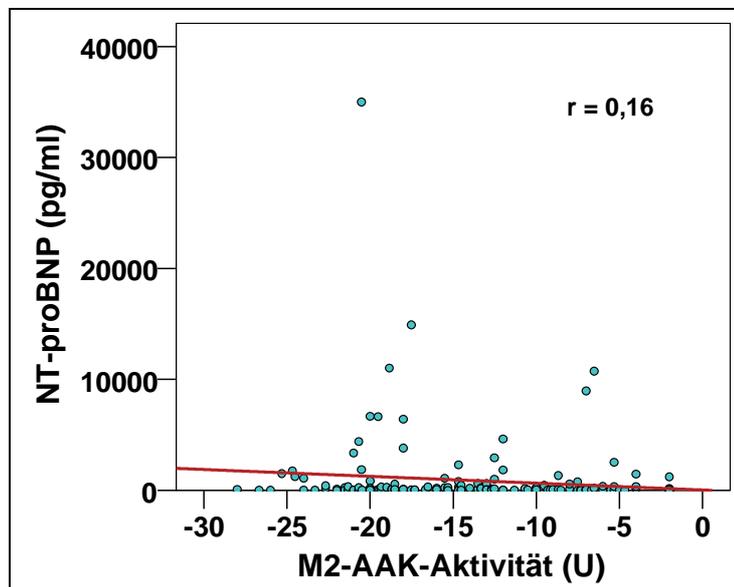


Abb. 67 Korrelation von M2-AAK-Aktivität und NT-proBNP-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretisches Peptid; M2-AAK-Aktivität, Auto-Antikörper-Aktivität gegen Muscarinerge-2 Acetylcholinrezeptoren; r, Korrelationskoeffizient.

4.5.2. cTnT-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Mit dem gegenwärtig allgemein verfügbaren cTnT-Test (untere Nachweisgrenze (UNG) = 99. Perzentile der Referenzpopulation = 10 pg/ml) war cTnT weder in den Kontrollen noch in den Patienten nachweisbar. Mit dem gegenwärtig noch nicht allgemein verfügbaren hochsensitiven cTnT-Test (hs cTnT) mit einer unteren Nachweisgrenze von 3 pg/ml und der ermittelten 99. Perzentile der Referenzpopulation von 13 pg/ml war cTnT insbesondere in den Patientengruppen nachweisbar. Ein Einfluss der chirurgischen Intervention wurde nicht beobachtet (Abb. 68). In die weitere Analyse wurden deshalb alle Studienteilnehmer eingeschlossen. Abb. 69 zeigt, dass mit dem hochsensitiven Test in der Kontrollgruppe nur ein Proband (4 %) einen messbaren cTnT-Wert aufwies, der im Bereich des Wertes der Referenzpopulation lag. In der Latenz-Gruppe wurden für 5 % der Patienten messbare cTnT-Konzentrationen im Bereich der Referenzpopulation bestimmt. In der Gruppe mit Kardiomyopathie lagen die cTnT-Konzentrationen von 27 % der Patienten über der unteren Nachweisgrenze, dabei bei 13,5 % sogar oberhalb der 99. Perzentile der Referenzpopulation. In der Gruppe **M** hatten 8 % der Patienten Werte oberhalb der unteren Nachweisgrenze. Bei keinem Patienten dieser Gruppe überschritt die cTnT-Konzentration die 99. Perzentile der Referenzpopulation. In Gruppe **M+K** war cTnT in 47 % der Patienten messbar ($>$ UNG), wovon 12 % cTnT-Werte oberhalb der 99. Perzentile der Referenzpopulation besaßen. Insgesamt zeigte sich (Abb. 69), dass sich Kontrollgruppe, Latenz-Gruppe und die Gruppe mit Megakolon nicht in der cTnT-Konzentration unterschieden. Signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe und Latenz-Gruppe ist cTnT in Gruppe **K** ($p = 0,02$; $p < 0,001$) und Gruppe **M+K** ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Die cTnT-Werte in der Gruppe **M+K** liegen darüber hinaus signifikant über denen der Gruppe **M** ($p < 0,01$).

Signifikante, wenn auch zum Teil schwache Korrelationen bestanden zwischen der cTnT-Konzentration und der Konzentration von CRP ($p < 0,05$) (Abb. 70) und IL-2R ($p < 0,001$) (Abb. 71), IL-6 ($p < 0,01$) (Abb. 72) und IL-8 ($p < 0,001$) (Abb. 73). Auch zwischen NT-proBNP und cTnT bestand eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) (Abb. 74).

Wurde mittels linearer Regression geprüft, welchen Einfluss der Schweregrad der Kardiomyopathie (Risiko für Kardiomyopathie, milde Kardiomyopathie, moderate Kardiomyopathie, schwere Kardiomyopathie) auf die cTnT Konzentration hat, zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) (Abb. 75). Diese Beziehung zum Schweregrad wurde auch deutlich, wenn milde und moderate Kardiomyopathie zusammengefasst wurden und den Patienten mit dem Risiko für Kardiomyopathie (Latenz-Gruppe) und den

Patienten mit schwerer Kardiomyopathie gegenüber gestellt wurden (Abb. 76). Die cTnT-Konzentration stieg von den Patienten mit Kardiomyopathierisiko über die Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie an ($p < 0,001$), zu den Patienten mit schwerer Kardiomyopathie ($p < 0,001$) signifikant an. Unterstrichen wird dies durch die Zunahme von Patienten mit messbarem cTnT ($> \text{UNG}$) von der Gruppe mit milder/moderater Kardiomyopathie (30 %, davon 10 % über der 99. Perzentile) zur Gruppe mit schwerer Kardiomyopathie, in der 50 % der Patienten messbare cTnT-Werte aufwiesen, davon 20 % Werte über der 99. Perzentile.

Zwischen den Patienten der Latenz-Gruppe mit Auto-Antikörperpositivität bzw. Auto-Antikörpernegativität existierten keine unterschiedlichen cTnT-Konzentrationen.

Darüber hinaus korrelierte die cTnT-Konzentration mit dem beta1-AAK ($p < 0,01$) (Abb. 77) und M2-AAK Level ($p = 0,02$) (Abb. 78). Zum beta2-AAK Level wurde keine Korrelation beobachtet.

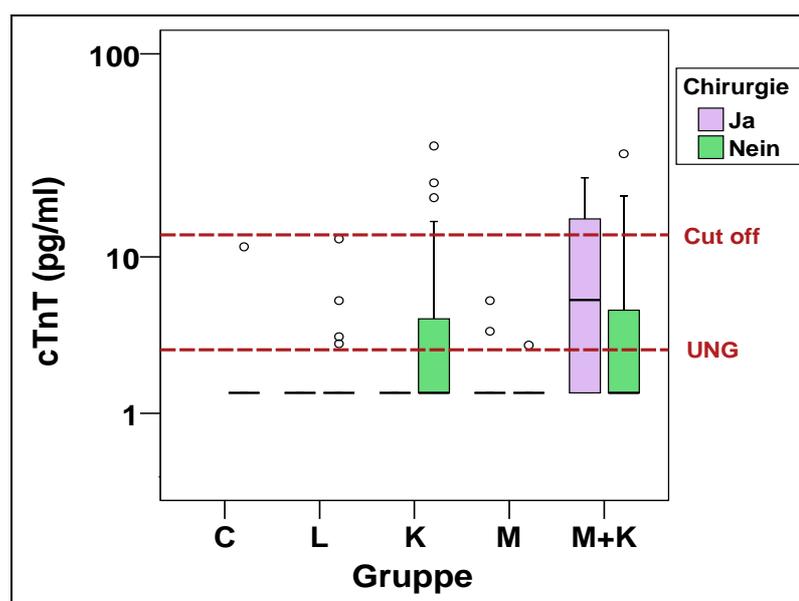


Abb. 68 Einfluss chirurgischer Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie) auf die cTnT-Konzentration in Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Kontrollen; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; cTnT, kardiales Troponin T; UNG, Untere Nachweisgrenze (3 pg/ml); cut off, 99. Perzentile der Referenzpopulation (13 pg/ml).

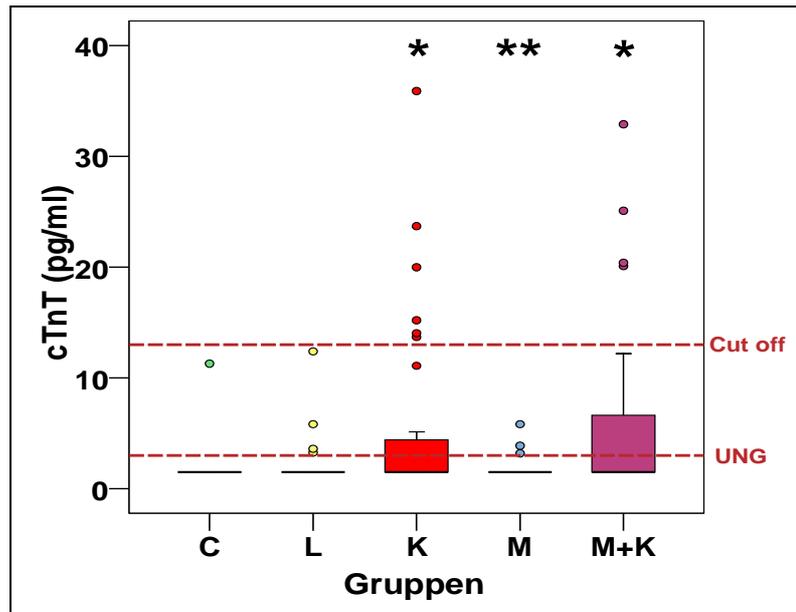


Abb. 69 cTnT-Konzentration in der Kontrollgruppe und in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

C, Control; L, Latenz; K, Kardiomyopathie; M, Megakolon; M+K, Megakolon und Kardiomyopathie; cTnT, kardiales Troponin T; (*), K, M+K > C, L; (**), M < M+K; UNG, Untere Nachweisgrenze (3 pg/ml); cut off, 99. Perzentile der Referenzpopulation (13 pg/ml)

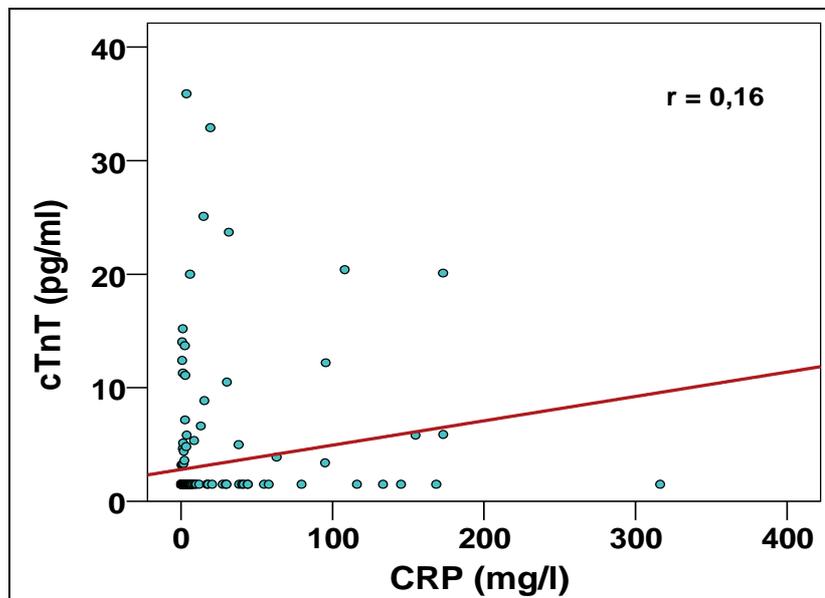


Abb. 70 Korrelation von CRP- und cTnT-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

CRP, C-reaktives Protein; cTnT, kardiales Troponin T; r, Korrelationskoeffizient.

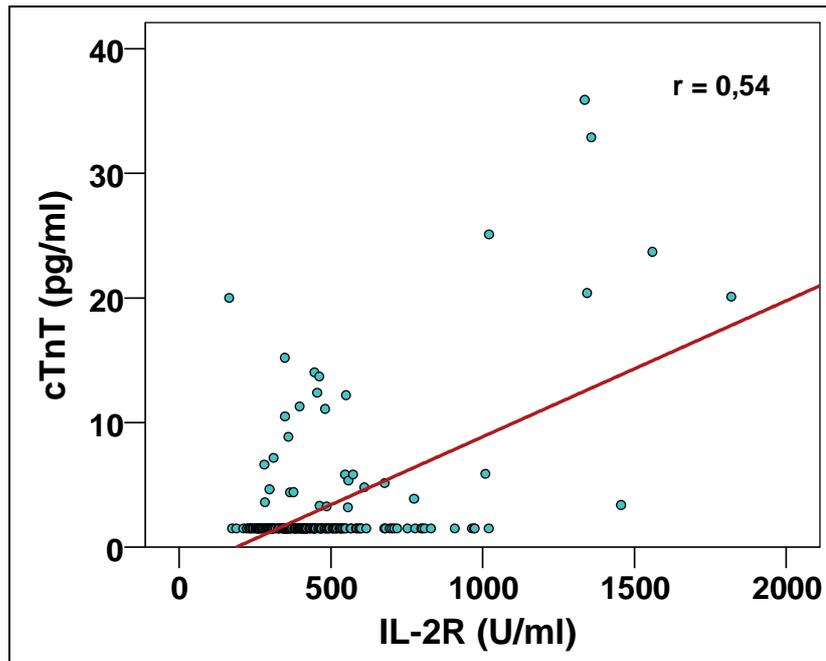


Abb. 71 Korrelation von IL-2R- und cTnT-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

IL-2R, löslicher Interleukin 2 Rezeptor; cTnT, kardiales Troponin T; r, Korrelationskoeffizient.

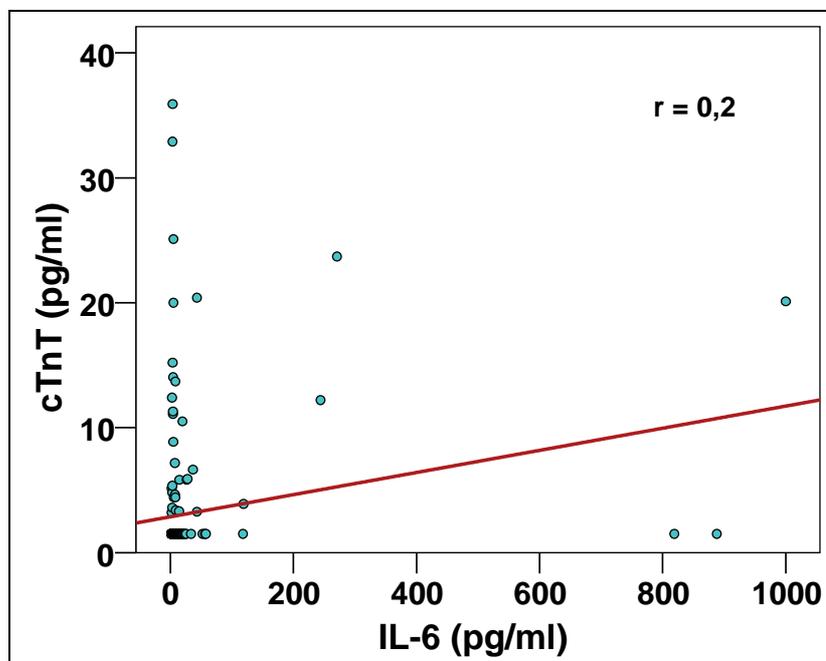


Abb. 72 Korrelation von IL-6- und cTnT-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

IL-6, Interleukin 6; cTnT, kardiales Troponin T; r, Korrelationskoeffizient.

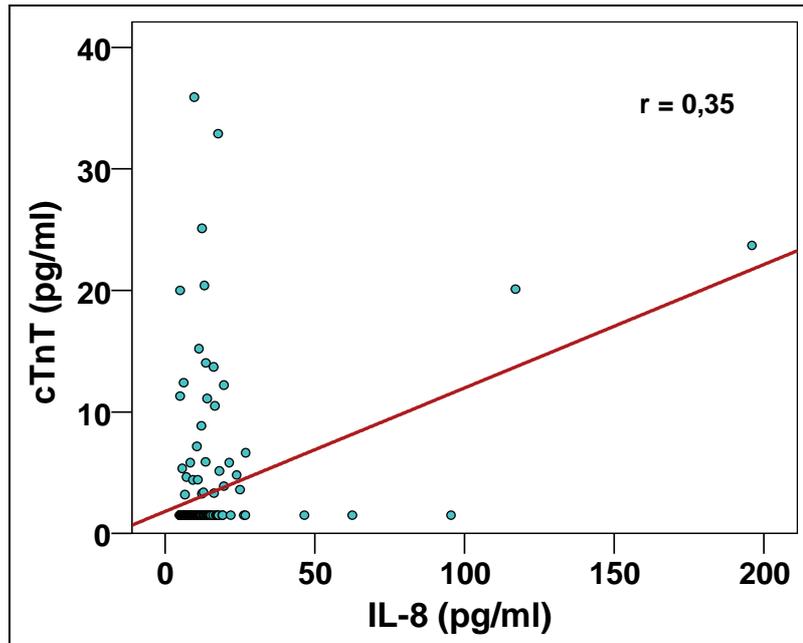


Abb. 73 Korrelation von IL-8- und cTnT-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

IL-8, Interleukin 8; cTnT, kardiales Troponin T; r, Korrelationskoeffizient.

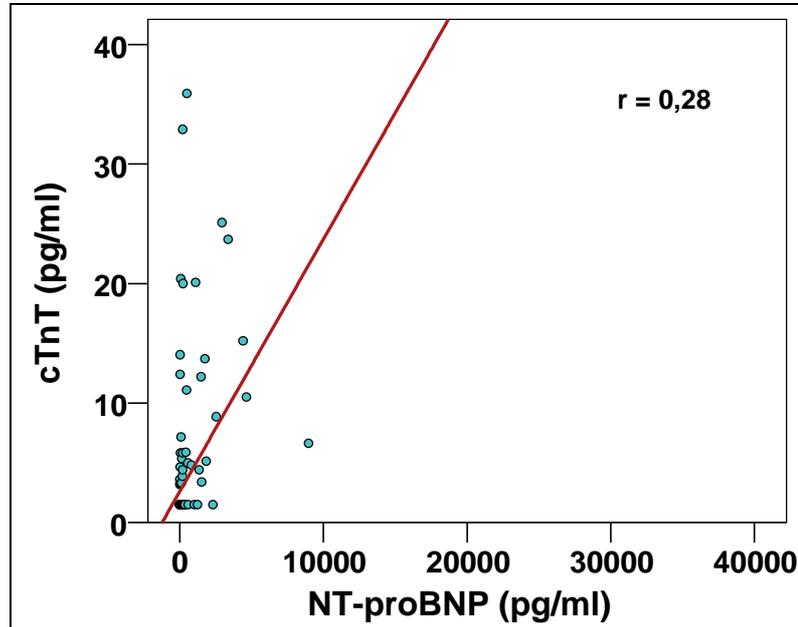


Abb. 74 Korrelation von NT-proBNP- und cTnT-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

NT-proBNP, N-terminales B-Typ-natriuretisches Peptid; cTnT, kardiales Troponin T; r, Korrelationskoeffizient.

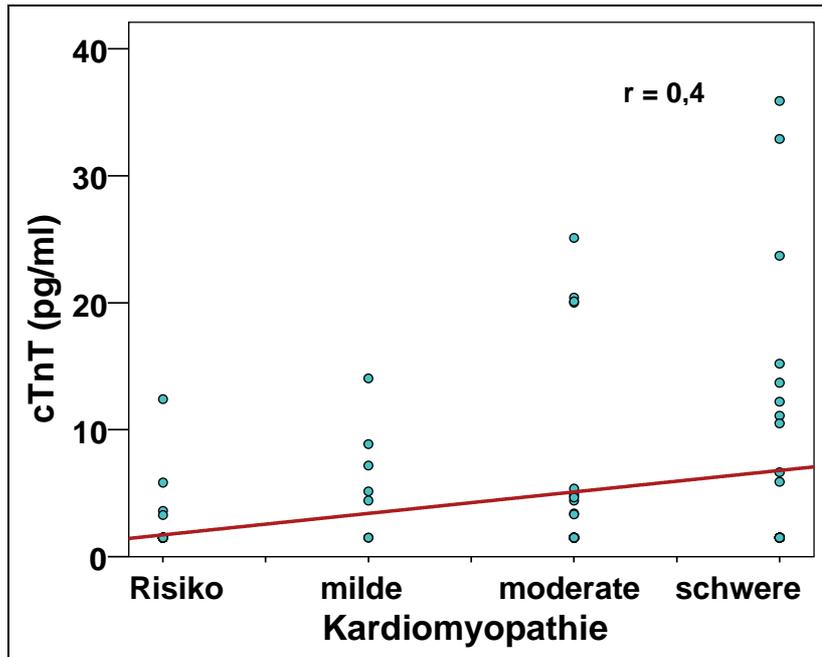


Abb. 75 Korrelation von cTnT und Schweregrad der Kardiomyopathie
 cTnT, kardiales Troponin T; r, Korrelationskoeffizient.

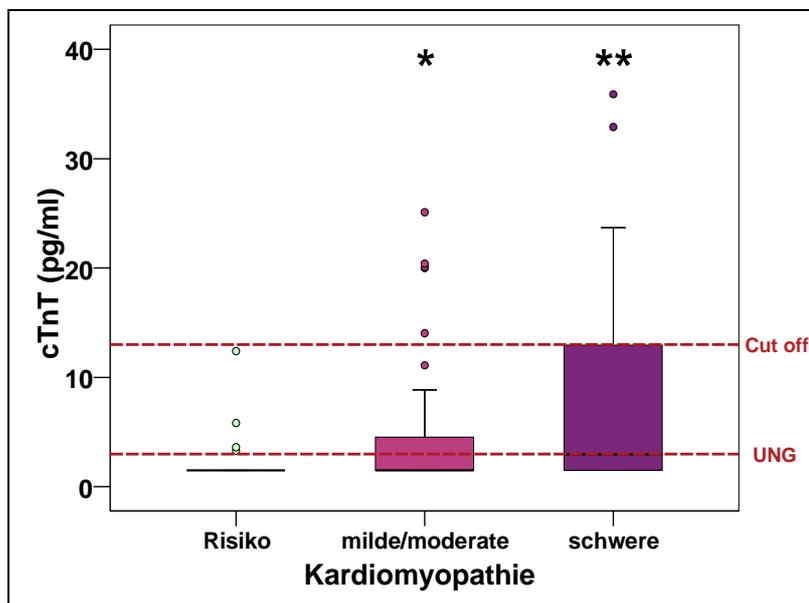


Abb. 76 Konzentration in Abhängigkeit vom Schweregrad der Kardiomyopathie bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung
 cTnT, kardiales Troponin T; (*), > ohne; (**), > milde/moderate Kardiomyopathie, UNG, Untere Nachweisgrenze (3 pg/ml); cut off, 99. Perzentile der Referenzpopulation (13 pg/ml).

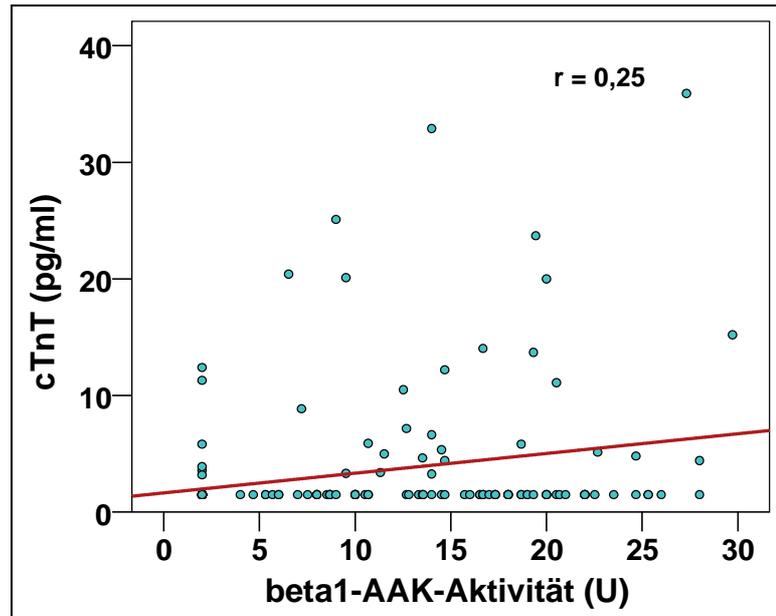


Abb. 77 Korrelation der beta1-AAK-Aktivität und der cTnT-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

cTnT, kardiales Troponin T; beta1-AAK-Aktivität, Auto-Antikörper-Aktivität gegen beta-1 Adrenorezeptor; r, Korrelationskoeffizient.

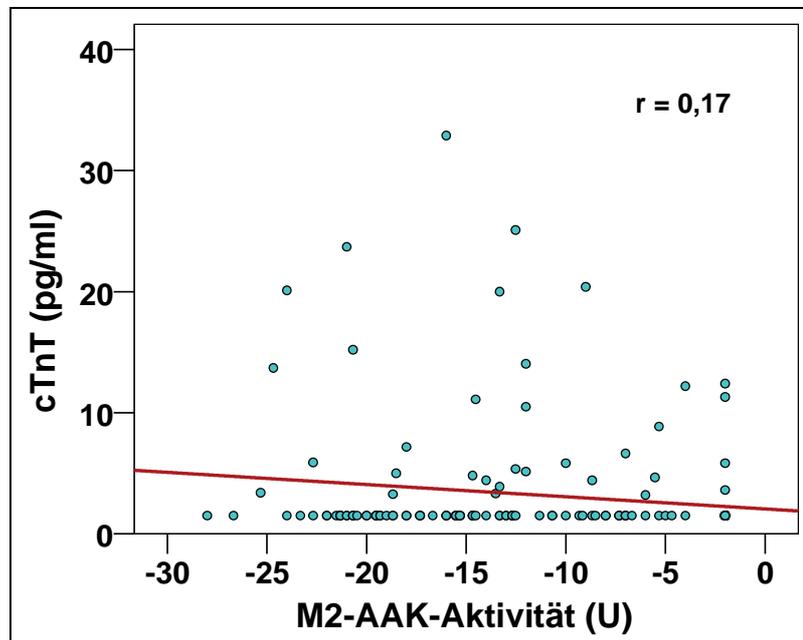


Abb. 78 Korrelation von M2-AAK-Aktivität und cTnT-Konzentration in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

cTnT hs, kardiales Troponin T; M2-AAK-Aktivität, Auto-Antikörper-Aktivität gegen Muscarinerge-2 Acetylcholinrezeptoren; r, Korrelationskoeffizient.

4.5.3. Klassifizierung von Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie, basierend auf der Konzentration von NT-proBNP, kombiniert mit der Konzentration von cTnT

Werden Kontrollen und Patienten als positiv angesehen, wenn deren NT-proBNP-Konzentration über dem cut off von 125 pg/ml liegt oder wenn sie eine messbare cTnT-Konzentration aufweisen, dann erhöht sich die Zahl der Patienten mit Herzmarker-Positivität im Vergleich zur Positivität, die sich aus der Bestimmung des jeweils einzelnen Parameters ergibt. Eingeschlossen wurden nur die Patienten ohne chirurgische Intervention. Tab. 6 und 7 zeigen den Vergleich. Die Zunahme der Patienten mit Markerpositivität zeigte sich vor allem in den Kontrollen, in der Latenz-Gruppe und in den Gruppen mit Megakolon bzw. Megakolon kombiniert mit Kardiomyopathie. Wurden die Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie auf Positivität für NT-proBNP und/oder cTnT untersucht, steigt der Anteil an Positivität insbesondere im Vergleich zur Einzelbestimmung von cTnT.

Tab. 6 Prozentsatz an Kontrollen und chronischen Chagas-Patienten mit Herzmarker-Positivität bei Einzelbestimmung der Marker bzw. bei kombinierter Bestimmung

Gruppen	NT-proBNP > 125 pg/ml (%)	cTnT > UNG (%)	NT-proBNP >125 pg/ml und/oder cTnT > 3 pg/ml (%)
Kontrollen	7	4	10
Latenz	4	5	9
Kardiomyopathie	53	27	54
Megakolon	8	8	15
Megakolon + Kardiomyopathie	49	47	60

UNG, Untere Nachweisgrenze.

Tab. 7 Prozentsatz an Herzmarker-Positivität bei Einzelbestimmung der Marker bzw. bei kombinierter Bestimmung in Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Kardiomyopathie

Kardiomyopathie	NT-proBNP > 125 pg/ml (%)	cTnT > UNG (%)	NT-proBNP >125 pg/ml und/oder cTnT > 3 pg/ml (%)
ohne	4	5	8
mild/moderat	40	30	43
schwer	87	50	87

UNG, Untere Nachweisgrenze.

5. DISKUSSION

Die Chagas-Erkrankung ist endemisch in mehr als 18 Ländern Lateinamerikas verbreitet.^{2,10} Obwohl die Erkrankung auch zukünftig ihren Schwerpunkt in Lateinamerika behalten wird, gibt es Hinweise, dass durch Migrationsprozesse - kombiniert mit intrauteriner Erregerübertragung sowie Erregerübertragung durch Bluttransfusion und Organtransplantation - die Chagas-Erkrankung auf dem Weg ist, ein weltweites Problem zu werden.^{3,5,10} Dies ist um so folgenschwerer, da bisher keine effektive Therapie existiert, die zur vollständigen Erregereliminierung bei den Infizierten führt. Damit bleiben die einmal Infizierten lebenslang Carrier und werden als Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung bezeichnet. Interessanterweise entwickeln jedoch von diesen chronischen Chagas-Patienten nur ca 30 % lebensbedrohliche Komplikationen insbesondere Herzkrankheiten und gastrointestinale Erkrankungen. Obwohl in zunehmendem Maße autoimmune Prozesse in den Mittelpunkt der Pathogenese von Chagas-Herzkrankheit und gastrointestinaler Erkrankung gerückt sind, ist noch immer weitgehend unbekannt, welche spezifischen pathobiochemischen Mechanismen an der Entwicklung der lebensbedrohlichen Komplikationen der chronischen Chagas-Erkrankung beteiligt sind. Damit fehlen aussagekräftige Informationen darüber,

1. welches die Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung der Chagas-Manifestationsformen sind und deshalb präventiven Konzepten zugeführt werden sollten und

2. wie ein optimales therapeutisches Regime gestaltet sein sollte, um den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen Chagas-Erkrankung zu verhindern bzw. hinauszuzögern.

3. Unabhängig davon würde sich die Prognose der Chagas-Patienten verbessern lassen, wenn kostengünstige und für große Patientengruppen zugängliche Diagnoseverfahren bereitstünden, die bei chronischen Chagas-Patienten geeignet sind, frühzeitig eine Herzkrankheit und gastrointestinale Erkrankung zu diagnostizieren und deren Verläufe zu beurteilen.

Dass unter diesem Gesichtspunkt laboratoriumsmedizinische Marker dem Einsatz der elektrophysiologischen, echokardiographischen und radiologischen Diagnostik überlegen sein sollten, ist leicht zu belegen. Laboratoriumsmedizinische Untersuchungen sind hochstandardisiert, mit hohem Probenaufkommen durchführbar und erfordern keine Anwesenheit des zu Untersuchenden am Untersuchungsort. Insbesondere für den ländlichen Bereich würde eine auf die laboratoriumsmedizinische Diagnostik beruhende Patientebetreuung einen wesentlichen Vorteil darstellen.

Ziel der Arbeit war es, Untersuchungen durchzuführen, die geeignet sind, zur Verifizierung der Autoimmunhypothese der chronischen Chagas-Erkrankung beizutragen und davon abgeleitet Marker anzubieten, die die Gruppe der Patienten identifiziert, bei denen ein hohes Risiko für die Entwicklung von Chagas-Kardiomyopathie und Chagas-Megakolon vermutet werden kann. Im zweiten Teil sollte geprüft werden, ob Methoden der Laboratoriumsmedizin geeignet sind, Informationen zum Übergang der asymptomatischen in die symptomatische Chagas-Erkrankung bzw. zum Schweregrad der symptomatischen Erkrankung zu liefern.

5.1. Material und Methoden

5.1.1. Patienteneinschluss und Klassifizierung

In unsere Studie wurden Patienten eingeschlossen, bei denen die chronische Chagas-Erkrankung erstmals diagnostiziert wurde bzw. die bei bekannter chronischer Chagas-Erkrankung zur Routineuntersuchung einbestellt waren. Die Blutabnahme bei diesen Patienten erfolgte, bevor eine Therapie eingeleitet bzw. die Therapie verändert wurde. Zu einer zweiten Gruppe von Patienten in unserer Studie gehören solche, die bei bekannter chronischer Chagas-Erkrankung für eine Schrittmacherimplantation bzw. Megakolonoperation ins Krankenhaus eingewiesen worden waren. Kritisch ist darauf hinzuweisen, dass bei diesen Patienten die Blutentnahme nach der chirurgischen Intervention erfolgte. Die Ursache dafür ist im Organisationsablauf in den medizinischen Einrichtungen in Sucre/Bolivien zu suchen. Prinzipiell musste deshalb davon ausgegangen werden, dass die chirurgische Intervention Einfluss auf die von uns gemessenen Parameter bei den entsprechenden Patienten haben könnte. Für alle untersuchten Parameter wurde deshalb bei diesen Patienten geprüft, ob die chirurgische Intervention einen signifikanten Einfluss auf die Marker-Konzentration hat. Bei Nachweis eines derartigen Einflusses wurden die chirurgisch versorgten Patienten von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Als Kontrollgruppe diente eine Gruppe von Blutspendern, bei denen die Infektion mit *Trypanosoma cruzi* ausgeschlossen wurde.

Die von uns ermittelten Schweregrade der Kardiomyopathie basieren auf elektrokardiographischen und radiologischen Untersuchungen. Die dabei angewendeten elektrokardiographischen Kriterien stimmen im Wesentlichen mit den auch von anderen Untersuchern genutzten Kriterien überein.^{106,108} Ein gewisser subjektiver Anteil bei der Schweregradeinteilung mit Hilfe der von uns genutzten Kriterien kann aber nicht

ausgeschlossen werden. Eine Objektivierung würde sich beim Einsatz der Echokardiographie ergeben. In verschiedenen Studien ist die Echokardiographie bereits zusätzlich zur elektrokardiographischen Charakterisierung des Schweregrades der Kardiomyopathie eingesetzt worden.^{90,108} Die von uns in Bolivien mit einer im Vergleich zu anderen Studien^{65,88,100} relativ großen Patientenzahl als „Feldstudie“ geplante Untersuchung ließ aus organisatorischen und insbesondere ökonomischen Gründen eine zusätzliche echokardiographische Untersuchung der Patienten nicht zu.

5.1.2. Auto-Antikörperquantifizierung

Der von uns genutzte Bioassay basiert auf ersten Untersuchungen von Wallukat et al.¹⁰⁷ Bekannte Nachteile sind die schwierige Standardisierung insbesondere im Hinblick auf die von „Tag zu Tag“ -Variabilität. Gegenüber der früher genutzten visuellen Bestimmung der Schlagrate der neonatalen Rattenkardiomyozyten objektiviert die von uns zur Quantifizierung genutzte computergestützte Auswertung der Schlagfrequenz (Programm Imagoquant Fourieranalyse 100) die Messergebnisse. Die umfassende Nutzbarkeit des Bioassays, auch bei computergestützter Auswertung, wird zusätzlich durch einen begrenzten Probendurchsatz eingeschränkt.

Der Vorteil des Bioassays unter Nutzung neonataler Kardiomyozyten besteht in der Nutzung der Schlagfrequenz und damit eines integralen Parameter für die Zellfunktionalität als Messsignal. Weiterhin erlaubt der Bioassay die parallele Bestimmung mehrerer Autoantikörper und die von diesen erkannten Epitope der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dagegen quantifizieren ELISA und RIA die Autoantikörper ausschließlich über ihr Bindungsverhalten ohne den Nachweis einer Funktionalität der Autoantikörper zu zeigen. Möglicherweise liegen hier Ursachen für z.T. unterschiedliche Ergebnisse von Bioassay und ELISA.^{109,110} Dennoch sind eine Reihe von ELISA zur Quantifizierung von beta1-, beta2- und M2-AAK in Studien eingesetzt worden.^{46,111,112} Diese basieren auf Bindungspeptiden, die die extrazellulären Domänen der von den Autoantikörpern erkannten Rezeptoren repräsentieren. Nach unserer Kenntnis existiert jedoch bisher kein allgemein kommerziell verfügbarer ELISA für einen der in dieser Arbeit behandelten Autoantikörper. Andere AAK-Quantifizierungen insbesondere bei der beta1-AAK-Quantifizierung nutzen die AAK-induzierte cAMP-Bildung in Zellkulturen, die den entsprechenden rekombinanten Rezeptor besitzen, als Messsignal,¹⁰⁹ wobei die cAMP-Quantifizierung mittels RIA oder ELISA erfolgt. Zukünftig könnten vor allem Bioassay-Entwicklungen Bedeutung gewinnen, in denen die cAMP-Bildung mit der FRET-Technik quantifiziert wird.¹⁰⁹

5.1.3. Laboratoriumsmedizinische Untersuchungen

Im Hinblick auf eine frühzeitige laboratoriumsmedizinische Diagnose von Kardiomyopathie boten sich prinzipiell Entzündungsmarker, Marker für den Oxidativen Stress und herzspezifische Marker an. Unter den herzspezifischen Markern sind dabei nach unserer Ansicht insbesondere das B-Typ-natriuretischen Peptid und die Troponine zu berücksichtigen. Im Hinblick auf die laboratoriumsmedizinische Diagnostik und Verlaufsbeurteilung des Chagas-assoziierten Megakolons muss jedoch an dieser Stelle festgestellt werden, dass es uns nicht möglich war, einen erfolgversprechender Ansatz zur laboratoriumsmedizinischen Charakterisierung des Megakolons im Allgemeinen und des Chagas-assoziierten Megakolons im Speziellen aus der gegenwärtig vorliegenden Literatur abzuleiten.

Das Fehlen spezifischer laboratoriumsmedizinischer Marker zur Megakolon-Charakterisierung ist allerdings nicht überraschend, da im Hinblick auf das Chagas-Megakolon von einer im weitesten Sinne „aganglionösen Pathogenese“ ausgegangen wird, wobei die von uns diskutierte autoimmune Genese ein wesentlicher Meilenstein sein könnte. Toxisches Megakolon, Volvulus und Darmperforation mit nachfolgender eitriger Peritonitis sind erst in den Endphasen der Erkrankung zu beobachten. Hier könnten die bekannten Entzündungsmarker einen wenn auch unspezifischen laboratoriumsmedizinischen Zugang liefern. Einen spezifischen Zugang zur entzündlichen Darmerkrankung könnte die Bestimmung des intestinalen fettsäurebindenden Proteins (iFABP) liefern.^{79,80} Der von uns in einer Pilotstudie (Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt) an Patienten mit Chagas-Megakolon eingesetzte iFABP-ELISA (Hycult Biotechnology b.v.) lieferte jedoch keinen Ansatzpunkt zur weiteren Verfolgung dieser Diagnosestrategie.

5.2. Resultate

5.2.1. Charakteristik von Kontrollen und Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung

Hinsichtlich des Alters zeigten die Kontrollgruppe und die Latenz-Gruppe ein vergleichbares Alter, das jedoch signifikant unter dem der Gruppen mit Kardiomyopathie, Megakolon und Megakolon/Kardiomyopathie lag. Es muss angenommen werden, dass

sich dieser Unterschied zwischen dem Alter der Patienten in der Latenz-Gruppe und den symptomatischen Gruppen aus dem zeitlichen Verlauf der Erkrankung mit z.T. jahrzehntelangem asymptomatischem Krankheitsstadium und erst dann Manifestation von Kardiomyopathie und Megakolon ergab. Um eine bessere Basis für den Vergleich „gesund“ und „asymptomatische Chagas-Erkrankung“ zu haben, wurde die Kontrollgruppe altersgemäß der Latenz-Gruppe angepasst. Auf eine den Gruppen **K**, **M** und **M+K** altersgerechte Kontrollgruppe wurde aus organisatorischen Gründen verzichtet. Unter den eingeschlossenen Patienten waren die in Gruppe **K** und **M** jünger als die **M+K** Patienten. Die Ursache dafür könnte in der erst mit zunehmendem Alter bei Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie erfolgenden Megakolonmanifestation liegen.²⁵ Obwohl die Geschlechterverteilung in unseren Untersuchungsgruppen z.T. signifikant unterschiedlich war, haben wir keinen Hinweis aus der Literatur, dass dies auf geschlechtsspezifische Erkrankungshäufigkeit für bestimmte Manifestationsformen zurückzuführen ist. Einen Einfluss des Alters auf die von uns untersuchten Parameter konnten wir ausschließen.

Als Nebenbefund zeigte sich bei den in die Studie eingeschlossenen Kontrollpersonen und Patienten, dass sich nach Analyse von Geburtsort und Wohnort eine signifikante Wanderung vom ländlichen in den städtischen Bereich ergab. Dies entspricht den typischen Bevölkerungsbewegungen in Bolivien¹¹³ wie allgemein in Südamerika und unterstützt, dass die chronische Chagas-Erkrankung ausgehend von den typischen ländlichen Lebensbereichen mit hoher Infektionsrate, zunehmend städtische Bereiche erfasst, in denen sich dann die Erkrankung unabhängig von der primären Infektion verbreiten kann.

5.2.2. Auto-Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

In den achtziger und neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts traten Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, insbesondere Autoantikörper, die gegen beta1-, beta2- und M2-Rezeptoren gerichtet sind, zunehmend in den Mittelpunkt von experimentellen Untersuchungen und klinischen Studien zur chronischen Chagas-Erkrankung. So beschrieben Sterin-Borda et al. 1988¹¹⁴ das Auftreten von beta1-AAK in Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie. Goin et al.¹¹⁵ wiesen 1991 beta1- und beta2-AAK im Serum von Chagas-Patienten nach. M2-AAK wurden sowohl bei Patienten mit Kardiomyopathie¹¹⁶ als auch mit Megakolon beschrieben.^{56¹¹⁷}

In unserer Studie zeigten wir, dass nahezu alle Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie beta1-, beta2- und M2-AAK besitzen. Die hohe Prävalenz von beta1- und M2-AAK in Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie wurde auch von anderen beobachtet.¹¹⁸

Funktionell könnten sowohl beta1- als auch M2-AAK für die typischen Reizleitungsstörungen im Chagas-Herz verantwortlich sein.^{119,120}

Unterstützt wird die pathologische Funktion der M2-AAK in der nervalen Innervation des Herzens durch den Nachweis von M2-AAK-Positivität in Patienten mit Dysautonomie. Patienten ohne Dysautonomie waren in einem geringeren Prozentsatz positiv für M2-AAK.¹²¹

Darüber hinaus sind weitere durch beta1-AAK ausgelöste Pathomechanismen im Herz beschrieben. Viele dieser Effekte lassen sich über die Autoantikörper-induzierte Stimulation der Adenylatcyclase und deren nachgeordnete Reaktionen erklären. Beschrieben sind auch Stimulation der Ca-ATPase und Inhibition der Na/K-ATPase. Generell scheint die Beeinflussung der Ca-Homöostase im Herz ein zentrales Ereignis in den durch beta1-AAK induzierten Pathomechanismen zu sein.^{39,122}

Als Reaktion auf die Bindung vom M2-AAK an den entsprechenden muscarinerg-cholinergen Rezeptor im Herzen wurden verminderte cAMP- und gesteigerte cGMP-Bildung beschrieben. Bekannt sind auch die Beeinflussung von Phosphoinositol-abhängigem Stoffwechsel, aber auch Stimulierung der NO-Bildung.¹²²

Die von uns gezeigte hohe Prävalenz von beta2-AAK in Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie ist so bisher nicht beschrieben worden. Beta2-AAK könnte jedoch neben den anderen beiden AAK für die Reizleitungsstörungen im Chagas-Herz verantwortlich sein. Beschrieben ist, dass beta2-AAK zur Blockierung der Reizleitung im Herz führt, wie an isoliert perfundierten Mäuseherzen gezeigt wurde.¹²³ Weiterhin liegen Studien vor, in denen gezeigt wurde, dass die Präsenz von beta2-AAK mit dem Auftreten von Reizleitungsstörungen korreliert.^{119,124}

Bei nahezu allen Patienten mit Megakolon fanden wir beta2- und M2-AAK. Das Auftreten dieser AAK bei Megakolon-Patienten könnte in Zusammenhang mit den pathogenetisch bedeutsamen Abnormitäten in der nervalen Innervation des Kolons stehen.¹²⁵

Im Gegensatz zur Chagas-Kardiomyopathie fanden sich bei nur ca. 35 % der Megakolonpatienten beta1-AAK. Denkbar ist, dass beta1-AAK über die Beeinflussung der Innervation des Darmes an der Megakolon-Pathogenese beteiligt sind.¹²⁵ Nicht

ausschließen können wir, dass das Auftreten von beta-1-AAK bei Megakolon-Patienten ein frühes Zeichen für die zusätzliche Manifestation einer Kardiomyopathie darstellt.

Ausgehend von unseren Befunden zur AAK-Positivität bei Kardiomyopathie bzw. Megakolon haben wir ein unterschiedliches Auto-Antikörper-Muster für Chagas-Kardiomyopathie und Megakolon postuliert.

Typisch für die Chagas-Kardiomyopathie ist danach die Auto-Antikörper-Kombination beta1-/M2-AAK, für Chagas-Megakolon die Kombination beta2-/M2-AAK. Danach sollten Patienten mit Kardiomyopathie und Megakolon mit allen drei Auto-Antikörpern belastet sein. An der von uns untersuchten Gruppe von Patienten mit Kardiomyopathie und Megakolon bestätigte sich dies.

Nach unseren Untersuchungen unterscheiden sich chronische Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon nicht nur durch ein unterschiedliches AAK-Muster, sondern auch in der AAK-Aktivität. Während die Kardiomyopathie-Patienten signifikant höhere beta1- und M2-AAK-Aktivitäten als die Megakolon-Patienten mit AAK-Positivität für diese AAK zeigten, war das beta2-AAK-Level in den Megakolon-Patienten höher. Aus der ROC-Analyse ließ sich ableiten, dass ein beta1-AAK-Level von 9,6 U am besten geeignet ist, um zwischen Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon zu unterscheiden. Bisher sind vergleichbare Resultate nicht publiziert worden.

Sowohl die von uns gezeigten typischen AAK-Muster für Chagas-Kardiomyopathie bzw. Megakolon als auch die krankheitsspezifischen Aktivitäten der AAK unterstützen die Autoimmunhypothese über die Pathogenese der Spätfolgen der chronischen Chagas-Erkrankung. Die pathogenetische Funktion von beta1- und M2-AAK bei der Chagas-Herzschädigung wird zusätzlich durch die von uns beschriebene Korrelation von AAK-Level und Schweregrad der Kardiomyopathie untermauert. Damit sind unsere Ergebnisse letztlich geeignet, das Augenmerk verstärkt auch bei der chronischen Chagas-Erkrankung auf Therapieverfahren zu richten, die zur Beseitigung der AAK führen und beispielsweise in Gestalt der AAK-Immunadsorption bei AAK-positiven Patienten mit DCM bereits eingesetzt werden.^{34,35}

Aufgrund der hohen Kosten dieses Therapieverfahrens, insbesondere auch, wenn man zusätzlich die ökonomischen und die organisatorischen Bedingungen in den Hauptverbreitungsgebieten der Chagas-Erkrankung berücksichtigt, sind sicherlich gegenwärtig in der Forschung befindliche Therapieverfahren, die sich auf die Inhibition der AAK richten, vielversprechender.¹²⁶

In den bisher vorliegenden Untersuchungen zum Nachweis von AAK bei chronischen Chagas-Patienten wurden meistens Patienten mit manifester Kardiomyopathie oder

Megakolon eingeschlossen. Nur sehr begrenzte Informationen gibt es über das Auftreten von AAK bei asymptomatischen Patienten. So fanden sich M2-AAK bei asymptomatischen chronischen Chagas-Patienten.^{116,121} Ohne die AAK zu spezifizieren, wurde in 8 % der chronischen Chagas-Patienten ohne Kardiomyopathie Antikörperpositivität beschrieben.¹²⁰

Wir zeigen nun an den 96 chronischen Chagas-Patienten unserer Latenz-Gruppe erstmals, dass ein hoher Prozentsatz (ca. 35-40 %) der Patienten beta1, beta2- und M2-AAK tragen. Nach Analyse des Antikörpermusters fanden wir, dass ca. 1/3 der Patienten entweder die Kardiomyopathie-spezifische Auto-Antikörperkombination beta1-/M2-AAK oder die Megakolon-spezifische Kombination beta2/M2-AAK oder beide Kombinationen besaßen.

Das Auffinden von Auto-Antikörper-spezifischen Mustern für die Manifestationsformen der chronischen Chagas-Erkrankung in 1/3 der Patienten der Latenz-Gruppe steht in guter Übereinstimmung mit den epidemiologischen Daten, nach denen 2/3 der chronischen Chagas-Patienten asymptomatisch bleiben und 1/3 die Manifestationsformen entwickeln.¹²¹

Nutzt man zusätzlich den zur Differenzierung von Kardiomyopathie und Megakolon errechneten „cut off“ von 9,6 U beta1-AAK-Aktivität, lassen sich die Patienten der Latenz-Gruppe, für die wir aufgrund ihrer Positivität für die Kardiomyopathie- bzw. Megakolon-spezifischen AAK-Muster ein Risiko für die Entwicklung der Chagas-Spätschäden postuliert haben, zu 85 % zur Gruppe mit Kardiomyopathie-Risiko und zu 15 % zur Gruppe mit Megakolon-Risiko zuordnen. Dies steht wiederum in Übereinstimmung mit den epidemiologischen Daten des Auftretens von Kardiomyopathie bzw. Megakolon in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung.

Unter Berücksichtigung der von uns vorgelegten Ergebnisse zum Auftreten und zur Aktivität von AAK bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung wäre folgender Algorithmus zur Klassifizierung der asymptomatischen Chagas-Patienten denkbar:

1. Bestimmung von beta1-, beta2- und M2-AAK zum Auffinder der Patienten mit hohem Risiko für die Entwicklung der Manifestationsformen.
2. Klassifizierung der Risiko-Patienten über die beta1-AAK-Aktivität in die mit Kardiomyopathie- bzw. Megakolon-Risiko.

Damit würde sich eine Möglichkeit ergeben, die entsprechenden Patienten in Überwachungsprogramme einzuschließen. Dies könnte zu einer gezielte Diagnostik und

damit frühzeitigen Diagnose der Chagas-bedingten Herz bzw. Kolonschädigung führen. Zusätzlich könnten die Patienten mit dem erhöhten Risiko für die Entwicklung der Spätschäden gezielten Präventionsprogrammen zugeführt werden. Von einer besseren Prognose der Patienten bei früher Diagnose der Chagas-Spätschäden und gezielter Prävention kann ausgegangen werden.

Einschränkend muss an dieser Stelle allerdings angeführt werden, dass erst prospektive Studien den tatsächlichen Stellenwert ermitteln werden, den das von uns - aufbauend auf unseren Ergebnissen zur AAK-Präsenz in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung - aufgestellte Konzept zur Klassifizierung der Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung hat.

5.2.3. Marker zur Charakterisierung von Entzündungsprozessen

Wie bereits in Kap. 2.5 ausgeführt wurde, lassen sich typische Zeichen für entzündliche Prozesse insbesondere nach der akuten Infektion beobachten,²⁹ sind aber auch bei der chronischen Chagas-Erkrankung und dabei sowohl im Herz als auch im Kolon gefunden worden. Insbesondere bei Chagas-Herzkrankheit wurden fokale Entzündungsherde im Herz beschrieben.^{5,127,128} Auch für die gastrointestinale Chagas-Erkrankung werden entzündliche Prozesse in der Pathogenese diskutiert. So wurden T-Lymphozyteninfiltrate mit Degeneration von glatten Muskel- und Nervenzellen beobachtet.^{129,130}

Im Ergebnis derartiger Untersuchungen ist die Beteiligung entzündlicher Prozesse an der Pathogenese des Chagas-Megakolons postuliert worden. Allerdings ist bisher nicht klar, ob es sich dabei um ein primäres Geschehen oder um eine Sekundärreaktion im Rahmen der Megakolonpathogenese handelt.^{3,7}

Allgemein wird davon ausgegangen, dass entzündlichen Prozessen eine größere Bedeutung bei der Chagas-Herzkrankheit als beim Megakolon zukommt.⁵

Hinsichtlich der Konzentration von proinflammatorischen Serum-Markern, die in unserer Studie untersucht wurden (CRP, IL-6, IL-8, TNF α) liegen z.T. widersprüchliche Ergebnisse vor. Insbesondere bei fortgeschrittener Chagas-Kardiomyopathie waren CRP und IL-6 erhöht.⁶⁵ Bei Patienten mit HIV-Infektion und chronischer Chagas-Erkrankung waren TNF α und Interleukine höher als bei HIV-Infizierten ohne Chagas-Erkrankung.¹³¹ Andererseits unterschieden sich die CRP und sIL-2R in Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung und unterschiedlichen Manifestationsformen nicht.¹³²

Möglicherweise hat dabei auch der Abnahmezeitpunkt des Probenmaterials – beispielsweise bei Patienten mit chirurgischer Intervention – Einfluss auf die

beobachteten Markerkonstellationen. Wie bereits in Kap. 4.1.2. ausgewiesen, haben wir jeden Marker hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung durch eine chirurgische Intervention beim Patienten geprüft und wenn diese offensichtlich war, solche Patienten von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die von uns vorgelegten Daten weisen nun anhand von CRP und IL-6 auf deutliche Zeichen der Entzündung bei den Patienten mit Kardiomyopathie und denen mit Kardiomyopathie kombiniert mit Megakolon hin, wobei allerdings nur bei einem Teil der Patienten die CRP- und IL-6-Konzentration oberhalb des für akute Entzündungen ausgewiesenen cut off liegen. Wie jedoch für das CRP gut beschrieben ist, weisen steigende Konzentrationen, auch wenn sie den cut off nicht überschreiten, wie dies bei einem Teil unserer Patienten der Fall war, auf zunehmende entzündliche Aktivitäten im Herz hin. Diese Befunde unterstützen die Hypothese der chronisch aktivierten Entzündung bei Chagas-Kardiomyopathie.¹⁴ Zusätzlich in diese Richtung weisen die zunehmende Konzentration von CRP und IL-6 ausgehend von den Patienten der Latenz-Gruppe, für die wir ein Risiko für die Entwicklung einer Kardiomyopathie postuliert haben (AAK-positive Patienten), hin zu den Patienten mit schwerer Kardiomyopathie. Von anderen wurde gezeigt, dass sich mit steigenden IL-6-Konzentrationen bei Kardiomyopathie-Patienten die Prognose verschlechterte.¹³³ Die in der Latenz-Gruppe und in der Megakolon-Gruppe nicht unterschiedlichen CRP- und IL-6-Konzentrationen stehen in Einklang mit der Annahme, dass entzündliche Prozesse bei der Megakolongenese weniger bedeutsam sind als in der Genese der Chagas-Kardiomyopathie.

Hinsichtlich des proinflammatorischen Zytokins IL-8 lagen die Werte für alle Gruppen unterhalb des cut off. Dennoch zeigten sich mit CRP und IL-6 vergleichbare Konzentrationsunterschiede, die damit die entzündliche Komponente in der Genese der Chagas-Kardiomyopathie unterstützen.

Im Gegensatz dazu lag bei der überwiegenden Anzahl der Patienten, sowohl der asymptomatischen als auch der symptomatischen Patienten, die TNF α -Konzentration über dem cut off. Hinsichtlich der gruppenspezifischen Werte zeigte sich ein den anderen proinflammatorischen Zytokinen vergleichbares Muster mit der niedrigsten Konzentration in der Kontrollgruppe und in der Latenz-Gruppe sowie signifikant höheren Konzentrationen in den Gruppen mit Herz- und Kolonerkrankung. Auch andere Untersucher haben eine erhöhte TNF α -Konzentration in Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie, verglichen mit der Konzentration von gesunden Kontrollpersonen beschrieben.¹³³ Die aus unseren Daten abgeleitete Zunahme der TNF α -Konzentration ausgehend von den latenten Patienten, für die wir ein Kardiomyopathierisiko postuliert

haben, hin zu den Patienten mit schwerer Kardiomyopathie stimmt mit Untersuchungen überein, in denen gezeigt wurde, dass die Serum-TNF α -Konzentration mit dem Schweregrad der Kardiomyopathie ansteigt.^{134,135,136} Allerdings finden sich auch Mitteilungen, dass sich asymptomatische und symptomatische Patienten sowohl mit Kardiomyopathie als auch mit Megakolon in ihrer TNF α -Konzentration nicht unterscheiden.¹³⁷ Bei Chagas-Patienten mit gastrointestinaler Manifestation wurden sogar im Vergleich zu den Kontrollpersonen niedrigere Konzentrationen gefunden.¹³⁸ Für den löslichen IL-2-Rezeptor liegen wiederum die Werte aller Gruppen mit wenigen Ausnahmen, insbesondere in den beiden Gruppen mit Kardiomyopathie, innerhalb des Referenzbereiches, aber auch hier mit dem typischen Muster, das auf die Assoziation von Kardiomyopathie und Entzündung bei der Chagas-Erkrankung hinweist. Gesteigerte Konzentrationen von IL-2R wurden in der Literatur bei akut mit *Trypanosoma cruzi* infizierten Kindern beobachtet.⁶⁶ Dies könnte in Einklang stehen mit Untersuchungen, in denen an einem Maus-Modell gezeigt wurde, dass die Expression von IL-2R während der Immunsuppression in der akuten Phase hoch ist.¹³⁹ In chronisch erkrankten Kindern wurden keine zu den Kontrollen veränderten IL-2R-Konzentrationen beobachtet.

Dies muss jedoch nicht unbedingt im Widerspruch zu unseren Ergebnissen stehen. Während sich die chronisch erkrankten Kinder in der Regel in der asymptomatischen Phase der Chagas-Erkrankung befanden, wurden die in unserer Studie erhobenen erhöhten IL-2R-Werte in erwachsenen asymptomatischen und symptomatischen Patienten erhoben, bei denen immer wiederkehrende akut entzündliche Phasen bekannt sind. Ein Zusammenhang von akut entzündlichen Phasen und IL-2R Freisetzung würde auch erklären, warum im Vergleich zu den anderen untersuchten proinflammatorischen Markern keine organspezifischen Muster nachweisbar waren.

Dass es bei chronischer Chagas-Erkrankung zu erhöhten IL-2R-Konzentrationen kommt, ist auch von anderen gezeigt worden.⁶⁹

Für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 fanden sich Werte über dem cut off nur bei den Chagas-Patienten, nicht jedoch in der Kontrollgruppe. Die gegenüber der Kontrollgruppe erhöhten IL-10 Konzentrationen in allen Patientengruppen, ohne dass ein spezifisches Muster sichtbar wurde, könnte darauf hinweisen, dass hier ein Kompensationsmechanismus zum Tragen kommt, der insbesondere gegen die temporär akut entzündlichen Phasen im Verlauf der chronischen Chagas-Erkrankung gerichtet ist.

Die in unserer Studie nachgewiesenen, wenn auch schwachen, jedoch signifikanten Korrelationen zwischen den Konzentrationen der verschiedenen Entzündungsmarker sind bei deren bekannten Interaktionen im Entzündungsprozess - am besten sicherlich untersucht für CRP und IL-6 - nicht überraschend.

5.2.4 Marker zur Charakterisierung von Oxidativem Stress

Tierexperimentelle Untersuchungen haben deutlich gemacht, dass es nach einer Infektion mit *T. cruzi* in der akuten Phase zu einem Anstieg von Oxidativem Stress, sichtbar in Serum und im Herz, kommt. Im Serum, besonders aber im Herz, wurde der gesteigerte Oxidative Stress an der Zunahme von Lipidperoxydationsprodukten und Produkten der Proteincarbonylierung sichtbar. Gleichzeitig kam es in der akuten Infektionsphase zu einem kompensatorischen Anstieg der antioxidativen Kapazität. Der akuten Infektionsphase folgt eine Phase mit Verminderung des Oxidativen Stress. Im Verlauf der weiteren chronischen Phase kommt es erneut zu einem Anstieg von Oxidativem Stress, der jetzt von einer zunehmenden Verminderung der antioxidativen Kapazität begleitet war.^{140,141,142} Als eine Quelle für den Oxidativen Stress bei Infektion mit *T. cruzi* wurden entzündliche Prozesse diskutiert. Als ein Beleg dafür wurden Korrelationen von Entzündungsmarkern und Markern für den Oxidativen Stress¹⁴³ und eine gesteigerte Myeloperoxidase-Aktivität im Serum von Chagas-Patienten angeführt.¹⁴⁴ Des Weiteren ist vor allem die Mitochondrienschädigung im Verlauf der akuten Infektion und Kardiomyopathie-genese als Quelle für den Oxidativen Stress diskutiert worden.^{136,145} Auch erste Hinweise auf gesteigerten Oxidativen Stress in Patienten mit Chagas-Erkrankung liegen vor. Insbesondere wurde dies an Chagas-spezifischen Veränderungen im Hinblick auf die antioxidative Kapazität des Blutes sichtbar.^{73,146} Durch Substitution von Patienten mit Vitamin C und E über 6 Monate konnten die Chagas-assoziierten Erhöhungen von Lipidperoxydations- und Proteincarbonylierungsprodukten sowie der Verlust an antioxidativer Kapazität vermindert werden.⁷⁴

Wir haben in unserer Studie die Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität im Serum eingesetzt, um den oben postulierten Zusammenhang von Entzündung und Oxidativem Stress bei Patienten mit Chagas-Erkrankung zu analysieren. Entgegen der beschriebenen Erhöhung der MPO-Aktivität¹⁴⁴ lagen die MPO-Aktivitäten in den verschiedenen Untersuchungsgruppen unserer Studie in der Regel im vom Testhersteller angegebenen Referenzbereich. Signifikante Unterschiede in der Aktivität zwischen den Gruppen waren nicht nachweisbar. Nur für die Patienten der Latenz-Gruppe war eine gegenüber den anderen Gruppen größere Variabilität in der MPO-Aktivität sichtbar. Eine Ursache dafür können wir gegenwärtig nicht erkennen. Eine im Hinblick auf den Oxidativen Stress möglicherweise herausgehobene Stellung der Latenz-Gruppe lässt sich auch aus den Daten zu den Oxidativen Stress-Markern Malondialdehyd (MDA) und Lipidperoxide (LPO) vermuten. Beide Marker zeigten anhand des Medians (für MDA signifikant) einen Anstieg der Konzentration beim

Vergleich von Kontrollgruppe und Latenz-Gruppe. Die Latenz-Gruppe wies zusätzlich höhere Werte für MDA und LPO als die Gruppe mit Megakolon auf. Insgesamt stützen die Befunde zum MDA und LPO die Hypothese von gesteigertem Oxidativem Stress bei Patienten mit Chagas-Erkrankung. Dass dabei der Oxidative Stress außer Patienten in der Latenz-Phase hauptsächlich die Patienten mit Kardiomyopathie betrifft, könnte aus unseren Daten vermutet werden. Hier sind jedoch weitergehende Untersuchungen notwendig, insbesondere deshalb, weil gerade die Bestimmung von Markern des Oxidativen Stress nur dann aussagekräftig ist, wenn mit einem hochstandardisierten Protokoll Probennahme und Lagerung so realisiert werden können, dass bei Patientenrekrutierung über längere Zeiträume präanalytische Einflüsse auf die Marker, die zu Verfälschungen führen können, ausgeschlossen sind.

5.2.5. Marker der Herz-Schädigung

Kardiales Troponin T und I sowie B-Typ-natriuretisches Peptid (BNP) bzw. NT-proBNP (inaktives N-terminales Ende der proBNP-Prozessierung zu BNP) sind Eckpfeiler in der modernen kardiologischen Diagnostik. So stellen die Troponine heute die Entscheidungsgröße dar, mit der beim akuten Koronarsyndrom die Differenzierung von Angina pectoris und Myokardinfarkt ohne ST-Hebung im EKG (NON-STEMI) vorgenommen wird.¹⁴⁷

Auch BNP und NT-proBNP haben als klinisch-chemische Messgrößen Eingang in die Leitlinien zur Diagnostik und zum Therapiemonitoring bei Herzinsuffizienz gefunden.¹⁴⁸

Bereits frühzeitig in der BNP-Ära ist B-Typ-natriuretisches Peptid auch zur Charakterisierung von Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie eingesetzt worden. Die nach unserer Kenntnis erste Publikation zum BNP bei Chagas-Erkrankung zeigte bereits die Korrelation von linksventrikulärer Dysfunktion und Höhe der BNP-Konzentration im Blut.⁸⁹

In unserer Studie wiesen die überwiegende Zahl der zur Kontrollgruppe, Latenz-Gruppe und Megakolon-Gruppe gehörenden Probanden NT-proBNP-Konzentrationen im Referenzbereich auf. Nur 4-8 % der Probanden dieser Gruppen hatten Werte oberhalb des Referenzbereiches. Dabei war jedoch die NT-proBNP-Konzentration bei den Megakolonpatienten signifikant höher als bei den Kontrollen und in der Latenz-Gruppe. Kürzlich wurde gezeigt, dass sich bereits bei chronischen Chagas-Patienten mit milder Kardiomyopathie, deren EKG normal war, die eine unauffällige radiologische Diagnostik und nur geringe Veränderungen im Echokardiogramm (abnormale regionale

Wandbewegung) aufwiesen, doch signifikant erhöhte BNP-Konzentrationen fanden, wenn mit nicht-infizierten Kontrollpersonen verglichen wurde.⁹⁰

Die Zuordnung unserer Patienten in die Megakolon- bzw. Kardiomyopathie/Megakolon-Gruppe beruhte primär auf der Abwesenheit bzw. dem Auftreten eines abnormalen EKG. Damit wurden möglicherweise Patienten mit milder Kardiomyopathie (siehe oben aufgeführte Kriterien) nicht erkannt und damit der Megakolon-Gruppe und nicht der Kardiomyopathie/Megakolon-Gruppe zugeordnet. Die gegenüber den Kontrollen und der Latenz-Gruppe, wenn auch geringfügig, so doch signifikant erhöhte NT-proBNP-Konzentration in den Megakolon-Patienten, könnte so eine Erklärung finden.

Im Hinblick auf die Patienten der Latenz-Gruppe mit NT-proBNP-Werten oberhalb des Referenzbereiches kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese Patienten trotz des fehlenden pathologischen EKG eine milde Kardiomyopathie aufwiesen und damit der Kardiomyopathie-Gruppe zuzuordnen wären, was deren NT-proBNP-Werte erklären würde. Unter dem gleichen Gesichtspunkt müssen auch die NT-proBNP-Werte oberhalb des Referenzbereiches in der Kontrollgruppe diskutiert werden. Auch unter diesen könnten sich Patienten mit nicht erkannter milder Kardiomyopathie verstecken.

Deutlich höhere NT-proBNP-Werte fanden wir in der Kardiomyopathie- und in der Kardiomyopathie/Megakolon-Gruppe, in denen zusätzlich auch die Beziehung von NT-proBNP-Konzentration und Schweregrad der Kardiomyopathie gezeigt wurde, was eine Reihe bereits vorliegender Untersuchungen ergänzt.^{90,149,150}

Darauf hinzuweisen ist, dass sich die Gruppe der Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie insbesondere aus Patienten zusammensetzte, bei denen nach Feststellung der chronischen Chagas-Erkrankung (Nachweis von *T. cruzi*-Antikörperpositivität bei potentiellen Blutspendern) bzw. nach Manifestation des Megakolons gezielt nach der Kardiomyopathie gesucht wurde. Gravierende klinische Symptomatik, die die Patienten veranlasst hätten sich im Hinblick auf eine Herzschiädigung beim Arzt vorzustellen, wurde von den Patienten nicht angegeben. Damit ist die Herzmanifestation in der milden bzw. moderaten Form in der Regel ein Zufallsbefund. Insbesondere deshalb, weil es in Folge der lokalen und ökonomischen Bedingungen in Südamerika vermutlich auch zukünftig nicht möglich sein wird, *T. cruzi*-infizierte Personen flächendeckend mittels EKG oder besser Echokardiographie nach frühen Zeichen für eine Herzmanifestation der Chagas-Erkrankung zu untersuchen.

Der von uns gezeigte Prozentsatz an Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie jedoch mit deutlicher NT-proBNP-Positivität (> 125 pg/ml) weist daraufhin, dass mit der Bestimmung von B-Typ-natriuretischen Peptiden in klinisch unauffälligen Chagas-

Patienten eine Möglichkeit besteht, bei einem erheblichen Teil dieser Patienten frühe Herzveränderungen zu erkennen. Solche Patienten könnten dann eher als bisher einer gezielten weiteren Diagnostik zugeführt und frühzeitig in sekundäre Präventionsprogramme eingeschlossen werden. Die von uns gezeigte Zunahme der NT-proBNP-Konzentration mit dem Schweregrad der Chagas-Kardiomyopathie unterstreicht den Stellenwert, den die klinisch-chemische Diagnostik im Rahmen des Therapie-Monitorings bei Chagas-Kardiomyopathie erlangen kann.

Unterstützt wird die Bedeutung, die der Bestimmung der B-Typ-natriuretischen Peptide bei Patienten mit Chagas-Erkrankung zukommt, durch Untersuchungen, in denen B-Typ-natriuretisches Peptid als Prognosemarker bei Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung eingesetzt wurde.⁹⁴

Die Bestimmung von B-Typ-natriuretischen Peptiden bei Patienten mit unauffälliger chronischer Chagas-Erkrankung, wie von uns vorgeschlagen oder aber zum Therapiemonitoring, ist nach unserer Ansicht der kosten- und personalintensiven Diagnostik mittels EKG und Echokardiographie überlegen. Die laboratoriumsmedizinische Diagnostik erlaubt eine für den Patienten kostengünstige dezentrale Probengewinnung in unmittelbarer örtlicher Nähe des Patienten (keine Reise zum Untersuchungsort) kombiniert mit einer hochstandardisierten und zentralisierten, damit qualitätsgesicherten und kostenminimierten Marker-Analytik in wenigen Zentren.

Im Vergleich zu den B-Typ-natriuretischen Peptiden als ausgewiesene Marker der Herzinsuffizienz stellen die kardialen Troponine hochspezifische Marker der Herznekrose dar.^{96,97} Ihre Zunahme im Blut gehört deshalb heute neben der entsprechenden Klinik (akuter Brustschmerz) und dem typischem EKG (ST-Hebung) zu den Kriterien für die Diagnose „Myokardinfarkt“. Bei nicht-typischem EKG (non-ST-Hebungsinfarkt) ist die Zunahme von kardialen Troponinen im Blut bei typischer Klinik das entscheidende Kriterium für die Diagnose „Myokardinfarkt“. Die gegenwärtig allgemeinverfügbaren Assays zur Bestimmung kardialer Troponine besitzen eine Empfindlichkeit, die ausreicht, den Untergang von ca. 1 g Myokardgewebe anzuzeigen. Bereits mit diesen Assays, insbesondere aber mit Neuentwicklungen, in denen z.T. eine um den Faktor 10 höhere Sensitivität erreicht wird, wurden Troponin-Erhöhungen über die 99. Perzentile der Referenzpopulation hinaus im Blut beobachtet, die nicht einem Myokardinfarkt zugeordnet werden können. So fanden sich erhöhte Troponinwerte bei traumatischer Herzbeeinflussung, Entzündung, toxischer Herzschädigung, Hypertonie und bei vielen anderen pathologischen Zuständen mit Herzbeeinflussung.¹⁵¹

Auch bei koronarer Herzkrankheit ohne Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz ließen sich gegenüber Gesunden höhere Troponinwerte nachweisen.^{101,152,153}

Gezeigt wurde sogar, dass physische Stresssituationen, wie sie ein Marathonlauf für das Herz darstellt, zu Troponinerhöhungen im Blut führen, ohne dass dabei ein Untergang von Herzgewebe angenommen werden kann. Erklärt werden solche Troponin-Erhöhungen mit passagerer oder permanenter Zunahme der Durchlässigkeit von Herzzellmembranen, wobei häufig Oxidativer Stress induziert durch entzündliche Prozesse, als Ursache diskutiert wurde.^{102,154}

Ausgehend von den Befunden zur nicht-nekrotischen Troponin-Zunahme im Blut als Marker für pathologische Prozesse, lag es nahe, die Chagas-Patienten unserer Studie im Hinblick auf eine Troponinerhöhung zu prüfen. Bisher sind nur zwei Studien und eine Einzelpatientenbeobachtung zu kardialen Troponin bei Chagas-Herzkrankheit publiziert, dabei jedoch keine krankheitsspezifischen Zunahmen von Troponin beobachtet worden.^{98,99,100}

Die fehlende Sensitivität der genutzten Assays könnte eine Ursache sein. Dies würde in Einklang mit unseren Resultaten stehen, die zeigen, dass auch in unseren Patienten mit dem gegenwärtig verfügbaren cTnT-Test keine unterschiedlichen cTnT-Konzentrationen in den gesunden Kontrollen und den verschiedenen Chagas-Gruppen nachweisbar waren. Vollständig anders stellte sich die Situation beim Einsatz eines mit ca. zehnfach höherer Empfindlichkeit messenden cTnT-Assays dar. Im Vergleich zu den Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie wurden signifikant niedrigere cTnT-Werte in der Kontrollgruppe, Latenz-Gruppe und Megakolon-Gruppe gefunden. Der Unterschied in der cTnT-Konzentration zwischen den Kardiomyopathie-Gruppen einerseits und den anderen Gruppen andererseits, zeigt sich auch, wenn die cTnT-Werte klassifiziert werden. In der überwiegenden Zahl von Patienten in der Kontrollgruppe, Latenz-Gruppe und etwas weniger deutlich in der Megakolon-Gruppe war cTnT nicht messbar. Dagegen war in den beiden Kardiomyopathie-Gruppen bei 27 % bzw. 47 % der Patienten cTnT messbar, dabei wurden bei 13 % bzw. 12 % sogar Werte oberhalb der 99. Perzentile der Referenzpopulation gefunden. Zusätzlich fanden wir eine deutliche Korrelation der cTnT-Konzentration zum Schweregrad. Wir konnten damit zeigen, dass mit einem hochempfindlichen cTnT-Assay Patienten ohne und mit unterschiedlichen Manifestationsformen signifikant voneinander unterschieden werden können und dass zusätzlich eine Differenzierung im Hinblick auf den Schweregrad der Kardiomyopathie möglich ist.

Gegenwärtig wird diskutiert, dass jeder messbare cTnT-Wert eine pathophysiologische Korrelation besitzen könnte und damit die untere Nachweisgrenze (UNG) für cTnT ein optimaler cut off zur Differenzierung von „tatsächlich“ Herz-Gesunden und Probanden mit entweder passagerer (Marathonläufer) oder permanenter „Herzbelastung“ darstellen sollte.¹⁵⁴

Basierend auf den vorgelegten Ergebnissen könnten danach durch die cTnT-Bestimmung mit dem hochsensitiven Assay bereits im Stadium der milden/moderaten Kardiomyopathie ca. 30 % der Patienten an ihren messbaren cTnT-Werte erkannt werden und diese bereits in diesem Stadium gezielt einer weiterführenden Diagnostik und Therapie zugeführt werden.

Mit dem cTnT, gemessen mit einem hochsensitiven Assay, liegt damit neben den B-Typ-natriuretischen Peptiden ein weiterer laboratoriumsmedizinischer Marker bereit, der unter den Bedingungen Südamerikas, wie für das NT-proBNP bereits diskutiert, einen wesentlichen Beitrag zur Diagnostik und zum Monitoring von chronischen Chagas-Patienten erbringen könnte. Nach unseren Ergebnissen kann durch die Kombination von NT-proBNP und cTnT-Bestimmung insbesondere bei asymptomatischen Patienten eine höhere diagnostische Sensitivität im Hinblick auf den frühzeitigen Nachweis einer Herzschädigung erzielt werden. Hierzu sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere solche, bei denen die Herzmarker auf dem Hintergrund einer exakten echokardiographischen Charakterisierung der asymptomatischen Patienten bestimmt werden.

6. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die von uns vorgelegten Ergebnisse zum Autoantikörper-Muster von Patienten mit chronischer Chagas-Erkrankung und Kardiomyopathie bzw. Megakolon und das Auffinden solcher Muster bei 30 % der asymptomatischen Patienten stärkt einerseits die Autoimmunhypothese der chronischen Chagas-Erkrankung und weist darüber hinaus darauf hin, dass die Bestimmung der Autoantikörper in asymptomatischen Chagas-Patienten eine Möglichkeit darstellen könnte, deren Risiko für die Manifestation von Kardiomyopathie und Megakolon anzuzeigen. Zukünftig muss dieses diagnostische Konzept in prospektiven Studien geprüft werden. Notwendige Voraussetzung dafür ist die Etablierung von Assays für die Autoantikörper (z.B. ELISA), die kostengünstiger, ohne den hohen personellen und zeitlichen Aufwand des Bioassay und automatisierbar durchzuführen sind. Die untersuchten Entzündungsmarker und Marker des Oxidativen Stress weisen auf die entzündliche Komponente in der Genese der manifesten chronischen Chagas-Erkrankung hin. Der Einsatz als Frühmarker zur Diagnostik des Überganges von der asymptomatischen zur symptomatischen Chagas-Erkrankung ist jedoch nach unseren Untersuchungen nicht möglich. Dagegen ist die Bestimmung der Herzmarker NT-proBNP und cTnT geeignet, bereits milde Schweregrade der Kardiomyopathie bei Chagas-Patienten zu diagnostizieren und damit die Möglichkeit zu eröffnen, diese Patienten frühzeitig in ein Kontroll- und Therapieprogramm einzuschließen. Durch die Herzmarker-Bestimmung werden Patienten der Diagnostik zugänglich, für die ausgehend von den ökonomischen und logistischen Bedingungen im Verbreitungsgebiet der Chagas-Erkrankung andere Diagnosemöglichkeiten (EKG, Echokardiographie) nur äußerst begrenzt oder nicht zugänglich sind.

7. ZUSAMMENFASSUNG

7.1. Einleitung und theoretischer Teil

Die Chagas-Erkrankung als endemisch primär in Lateinamerika vorkommende Infektionskrankheit wird durch *Trypanosoma cruzi*, die hauptsächlich durch Raubwanzenkot von Tier zu Mensch und über Bluttransfusion von Mensch zu Mensch übertragen werden, verursacht.

Nach WHO-Angaben leben ca. 100 Millionen Einwohner bzw. 25 % der Gesamtbevölkerung Lateinamerikas in endemischen Gebieten, wovon nach Angaben aus dem Jahre 2000 11 Millionen Menschen chronisch infiziert waren, was zu mehr als 21 000 Todesfällen im Jahr führte.

Diaplazentale und perinatale Übertragung von *Trypanosoma cruzi*, Übertragungen durch verunreinigte Lebens- und Genussmittel sowie durch Organspende sind ebenfalls beschrieben. Durch zunehmende Migrationsprozesse und Tourismus beginnt die Chagas-Erkrankung, ein weltweites Problem zu werden

Die unmittelbar der Infektion folgende akute Krankheitsphase ist in der Regel unspektakulär. Symptomatisch wird die akute Phase vorwiegend bei Kindern insbesondere durch Myokarditis und Meningoenzephalitis, was mit einer Mortalität von 2-6 % verbunden ist.

In der anschließenden chronischen Chagas-Erkrankung bleiben trotz der lebenslangen Parasitenpersistenz 70 % der Patienten klinisch unauffällig (asymptomatische Phase, Indeterminate Phase, Latenz-Phase), bei den restlichen 30 % der Patienten manifestiert sich die chronische Chagas-Erkrankung als Erkrankung des Herzens (ca. 90 % der Patienten), hauptsächlich als Kardiomyopathie sowie als Erkrankung des Intestinaltraktes (Megakolon, Megaösophagus) und des Nervensystems (Demenz).

Die chronische Chagas-Erkrankung stellt damit für die betroffenen Länder Lateinamerikas ein gewaltiges sozio-ökonomisches Problem dar. Beispielhaft für Brasilien berechnet, ergibt sich aus Therapiekosten und Lebensarbeitszeitverlust ein finanzieller Verlust von ca. 240 Mill. US Dollar jährlich.

Bei der Hauptmanifestationsform der chronischen Chagas-Erkrankung, der Chagas-Herzkrankheit, stehen Rhythmusstörungen, Thromboembolien, plötzlicher Herztod und

Kardiomyopathie im Vordergrund. Mikroskopisch lassen sich fokale, später diffuse Entzündungsprozesse und interstitielle Fibrose in allen Herzarealen nachweisen.

Typisches radiologisches Zeichen von Megakolon und Megaösophagus ist deren Dilatation. Klinisches Zeichen für das Megakolon ist die chronische Obstipation als Folge der Darmhypokinesie.

Die Pathogenese der Chagas-Manifestationsformen wird heute hauptsächlich als Zusammenspiel von inflammatorischen, immunologischen und autoimmunologischen Mechanismen gesehen. Insbesondere für die Chagas-Kardiomyopathie aber auch immer mehr für das Megakolon werden autoimmune Schädigungsmechanismen in den Mittelpunkt der Pathogenese gerückt. Diskutiert wird, dass durch *T. cruzi* spezifische Antigene Auto-Antikörper induziert werden, die sich gegen kreuzreagierende Wirtsantigene richten (Molekulares Mimicry) und/oder Antigene des Wirtes im Verlauf der Parasiten-induzierten Gewebeschädigung dem Immunsystem zugänglich werden und zur Produktion von Auto-Antikörpern führen (Bystander-Aktivierung).

Unter den Auto-Antikörpern werden zunehmend solche als pathogen angesehen, die gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gerichtet sind, insbesondere gegen beta1-, beta2-Adrenorezeptor (beta1-AAK, beta2-AAK) und muscarinergen M2-Rezeptor M2-AAK).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören zu den Transmembranproteinen. Sie sind an der Signalverarbeitung von Sinnesreizen aber auch bei Entzündungsprozessen, Chemotaxie, Endo- und Exozytose, Zellwachstum und -differenzierung sowie an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt und damit zentrale Stellglieder sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse. Die transmembranöse Signalübertragung von Katecholaminen und Acetylcholin wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Eindrucksvoll lässt sich die Wirkung von beta1-AAK, beta2-AAK und M2-AAK an ihrer positiven bzw. negativen Chronotropie auf neonale Rattenkardiomyozyten zeigen.

7.2. Problemstellung

Gegenwärtig existiert kein kausales therapeutisches Konzept, um den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase der Chagas-Erkrankung zu verhindern. Deshalb wäre es notwendig, die Patienten in der asymptomatischen Phase

herauszufinden, die ein hohes Risiko für die Entwicklung von Chagas-Herzkrankheit und intestinaler Krankheit besitzen. Diese Patienten sollten frühzeitig auf den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen chronischen Chagas-Erkrankung getestet werden, um sie früher als bisher den etablierten Therapieverfahren für Kardiomyopathie und Megakolon zuzuführen.

Ausgehend von der Autoimmunhypothese der chronischen Chagas-Erkrankung und speziell von der pathogenetischen Funktion von beta1-AAK, beta2-AAK und M2-AAK postulieren wir, dass sich Chagas-Herzkrankheit und intestinale Krankheit durch ein unterschiedliches Auto-Antikörpermuster unterscheiden sollten. Solche Muster könnten dann bereits in der asymptomatischen Phase sichtbar sein und so Risikopatienten für den Übergang in die manifeste Phase kennzeichnen.

In Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb das Muster beta1- und beta2- und M2-AAK in asymptomatischen chronischen Chagas-Patienten (Indeterminate Phase) und symptomatischen Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie und Megakolon bestimmt.

Im Hinblick auf die frühzeitige Diagnose des Überganges von der asymptomatischen zur symptomatischen chronischen Chagas-Erkrankung wurde geprüft, ob laboratoriumsmedizinische Untersuchungen einen Beitrag dazu leisten können. Untersucht wurden Herzmarker (B-Typ-natriuretisches Peptid; Troponin), Entzündungsmarker (CRP, Interleukine, TNF α , Myeloperoxidase) und Marker für Oxidativen Stress (Myeloperoxidase, Malondialdehyd, Lipidperoxide).

7.3. Material und Methoden

Von 2005 bis 2007 wurden insgesamt 228 Patienten mit dem Nachweis von Antikörpern gegen *Trypanosoma cruzi* und zusätzlich 29 gesunde Probanden als Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden nach Anamnese, EKG und radiologischer Diagnostik der Latenz- (96 Patienten), Kardiomyopathie (57), Megakolon- (30) und Megakolon plus Kardiomyopathie-Gruppe (45) zugeordnet. Die Patienten mit Kardiomyopathie wurden zusätzlich nach dem Schweregrad subklassifiziert. Von den Studienteilnehmern wurde Blut gewonnen, portioniert und bei -20 °C bis zur Bestimmung gelagert.

Die Bestimmung der Autoantikörper-Aktivität erfolgte in einem von uns zuvor standardisierten Bioassay, in dem die Änderung der Schlagfrequenz von kultivierten spontan schlagenden neonatalen Rattenherzzellen nach Zugabe der Serum-IgG-Präparation der Patienten gemessen wurde. Durch selektive Zugabe von Antagonisten zum Bioassay wurden die verschiedenen AAK-Aktivitäten differenziert.

Die Bestimmung der laboratoriumsmedizinischen Messgrößen erfolgte automatisiert bzw. halbautomatisiert mit kommerziell verfügbaren Analysengeräten und Assays.

7.4. Ergebnisse

Unter den Studienteilnehmern waren 156 Frauen und 101 Männer. In der Kontrollgruppe, der Latenz- und Megakolon-Gruppe überwogen Frauen. In der Kardiomyopathie-Gruppe überwogen Männer. Ein Einfluss des Geschlechts auf die Untersuchungsergebnisse wurde nicht festgestellt. Nach Analyse von Geburts- und Wohnort zeigte sich die für Südamerika typische Bevölkerungsbewegung in die Städte.

Obwohl die Studienteilnehmer der Kontrollgruppe und der Latenz-Gruppe jünger als die Patienten der anderen Gruppen waren, wurden keine altersabhängigen Einflüsse auf die untersuchten Parameter festgestellt.

Von den 102 Patienten mit Kardiomyopathie hatten 8 Patienten eine milde, 52 eine moderate Kardiomyopathie und 42 eine schwere Kardiomyopathie.

Die Blutabnahme erfolgte bei einem Teil der Patienten mit manifester chronischer Chagas-Erkrankung nach einer chirurgischen Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie). Für diese Patienten wurde jeweils der Einfluss der chirurgischen Intervention auf die untersuchten Parameter geprüft und wenn notwendig diese Patienten von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Basierend auf dem von uns in Voruntersuchungen ermittelten cut off von 4 U für beta1- und beta2-AAK und -4 U für M2-AAK waren von den Patienten mit Kardiomyopathie 100 % positiv für beta1-AAK, 89 % für beta2-AAK und 98 % für M2-AAK. Unter den Megakolon-Patienten zeigten 97 % Positivität für beta2-AAK, 100 % für M2-AAK aber nur zu 38 % für beta1-AAK. Damit bestand ein signifikanter Unterschied im Auftreten von

beta1-AAK bei den Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon. Patienten mit Megakolon und Kardiomyopathie besaßen alle 3 Auto-Antikörper zu nahezu 100 %.

Das typische Zeichen für Patienten mit Kardiomyopathie war damit das Auftreten von beta1-AAK gemeinsam mit M2-AAK, für die Patienten der Megakolon-Gruppe der Nachweis von beta2-AAK gemeinsam mit M2-AAK.

In der Latenz-Gruppe sind 34 % für beta1-AAK, 33 % für beta2-AAK und 42 % für M2-AAK positiv. Im Hinblick auf die Kombinationen beta1-/M2-AAK und/oder beta2-/M2-AAK waren 34 % der latenten Patienten positiv.

Zusätzlich zum unterschiedlichen AAK-Muster wiesen die Kardiomyopathie-Patienten im Vergleich zu den Megakolon-Patienten höhere beta1-AAK- und M2-AAK-Aktivitäten auf, während bei letzteren höhere beta2-Aktivität gefunden wurde.

Dabei trennte ein cut off von 9,6 U für die beta1-AAK-Aktivität mit höchster Effizienz Kardiomyopathie und Megakolon-Patienten.

Wendet man den cut off von 9,6 U für beta1-AAK zur Unterscheidung von Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon nun auf die 34 % der Patienten der Latenz-Gruppe an, für die wir aufgrund ihres AAK-Musters ein Risiko für die Entwicklung von Spätschäden postuliert haben, lassen sich 85 % dieser Risiko-Patienten dem Kardiomyopathie-Muster und 15 % dem Megakolonmuster zuordnen.

In den Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie korrelierte insbesondere die beta1-AAK-Aktivität mit dem Schweregrad der Kardiomyopathie.

Zusammenfassend zeigten sich für die Entzündungsmarker höhere Werte in der Kardiomyopathie und Megakolon/Kardiomyopathie-Gruppe verglichen mit der Latenz-Gruppe und der Gruppe mit Megakolon. Zusätzlich existierte eine Korrelation der Entzündungsmarker zum Schweregrad der Kardiomyopathie.

Wenig aussagekräftig sind die Ergebnisse zur Myeloperoxidase, die sowohl als Entzündungsmarker und Marker für den Oxidativen Stress gilt. Auch die eigentlichen Marker für den Oxidativen Stress liefern keine Hinweise, dass deren Bestimmung frühzeitig den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase anzeigen kann. Entweder wurden keine Unterschiede in den verschiedenen Patientengruppen gefunden oder aber Hinweise auf gesteigerten Oxidativen Stress vor

allem in der Latenz-Gruppe. Die Megakolon-Gruppe scheint unter den verschiedenen Patientengruppen am wenigsten von Oxidativem Stress betroffen zu sein.

Patienten mit Kardiomyopathie sowie Megakolon und Kardiomyopathie wiesen höhere NT-proBNP-Konzentrationen als die Patienten der Latenz-Gruppe und der Megakolon-Gruppe auf. Dabei hatten Patienten mit schwerer Kardiomyopathie höhere NT-proBNP-Werte als Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie. Wurde ein cut off von 125 pg/ml zugrunde gelegt, ließen sich 35 % der Patienten der Gruppe mit milder/moderater Kardiomyopathie mit diesem Herzmarker identifizieren. Allerdings besaßen auch 4 und 8 % der Patienten der Latenz-Gruppe und der Megakolon-Gruppe NT-proBNP über der Nachweisgrenze. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine Herzschädigung bei diesen Patienten, die mit der zur Patienteneinteilung genutzten EKG-Diagnostik nicht erkannt wurde.

Mit Hilfe eines hochsensitiven Testes zur Bestimmung von cTnT wurden die höchsten Konzentrationen für diesen Herzmarker in den Patientengruppen mit Kardiomyopathie gefunden, wobei eine Beziehung zum Schweregrad der Kardiomyopathie offensichtlich war. 30 % der Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie ließen sich identifizieren, wenn die untere Nachweisgrenze des Assays als cut off gewählt wurde.

5 bzw. 8 % der Patienten der Latenz-Gruppe und der Megakolon-Gruppe hatten ebenfalls cTnT-Werte über dem gewählten cut off, was wiederum als Zeichen von bisher nicht erkannter Herzschädigung gewertet werden könnte.

Werden NT-proBNP- und cTnT-Bestimmung kombiniert, lässt sich der Anteil an Marker-positiven Patienten insbesondere in der Latenz- und Megakolon-Gruppe steigern.

7.5. Diskussion und Zusammenfassung

Die von uns beschriebenen unterschiedlichen AAK-Muster bei Chagas-Kardiomyopathie und Megakolon und der Nachweis derartiger Muster bereits in der asymptomatischen Phase der Erkrankung stützen die Autoimmunhypothese der symptomatischen Chagas-Erkrankung.

Das gezeigte Auftreten von AAK-Mustern bei ca. 30 % der Patienten in der asymptomatischen Phase steht in guter Übereinstimmung mit epidemiologischen Daten,

die belegen, dass 30 % der mit *Trypanosoma cruzi* infizierten Patienten eine symptomatische Chagas-Erkrankung entwickeln.

Mit Hilfe der beta1-AAK-Aktivität (cut off 9,6 U) konnten wir die AAK positiven Patienten der asymptomatischen Phase zu ca.85 % dem Kardiomyopathie-spezifischen Muster zuordnen, den Rest zum Megakolon-spezifischen Muster. Auch dies stimmt gut mit den epidemiologischen Daten überein, nach denen der überwiegende Teil der symptomatisch werdenden Patienten eine Kardiomyopathie entwickelt, während nur ca. 10 % eine gastrointestinale Schädigung herausbilden.

Die Bestimmung des AAK-Musters in den asymptomatischen Patienten könnte damit eine Möglichkeit darstellen, die Patienten mit dem Risiko für die Entwicklung von Kardiomyopathie und Megakolon zu identifizieren und so frühzeitig in Kontrollprogramme einzuschließen.

Zukünftig muss die Validität dieses von uns postulierten Konzeptes in prospektiven Studien geprüft werden.

Die Ergebnisse zu den Entzündungsmarkern weisen auf die Kardiomyopathie als die Chagas-Manifestation hin, bei der eine entzündliche Komponente in der Pathogenese besonders deutlich sichtbar wird. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Reihe bereits vorliegender Untersuchungen.

Mit Hilfe der Herzmarker NT-proBNP und cTnT konnte ein erheblicher Teil der Patienten, die wir aufgrund der EKG-Diagnostik der Gruppe mit milder/moderater Kardiomyopathie zugeordnet hatten, erkannt werden. Dies erscheint umso wichtiger, als in der Regel milde/moderate Kardiomyopathie nicht bekannt sind, da die logistischen und ökonomischen Bedingungen in Südamerika es gegenwärtig nicht zulassen, flächendeckend mittels EKG oder besser noch mittels Echokardiographie *T. cruzi*-infizierte Personen flächendeckend nach frühen Zeichen für eine Herzmanifestation der Chagas-Erkrankung zu untersuchen.

Im Gegensatz dazu ist die Bestimmung der Herzmarker zur Diagnostik der milden/moderaten Form der Kardiomyopathie, wie allgemein auch zum Therapiemonitoring der Kardiomyopathie, eine praktikable, der kosten- und personalintensiven Diagnostik mittels EKG und Echokardiographie überlegene Möglichkeit. Die klinisch-chemische Diagnostik erlaubt eine für den Patienten

kostengünstige dezentrale Probengewinnung in unmittelbarer örtlicher Nähe des Patienten (keine Reise zum Untersuchungsort), kombiniert mit einer hochstandardisierten und zentralisierten, damit qualitätsgesicherten und kostenminimierten, Marker-Analytik in wenigen Zentren.

8. LITERATUR

1. Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America- A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002; 97:603-612.
2. Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003; 98:5
3. Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2006;100:663-677.
4. Chagas disease-devolution in the Tropics. (Accessed October 22, 2008, at http://images.google.de/imgres?imgurl=http://eyesonbrazil.files.wordpress.com/2008/07/carte_maladie_chagas.png&imgrefurl=http://eyesonbrazil.wordpress.com/2008/07/10/chagas-disease-devolution-in-the-tropics/&usq=__g8RY0iXYUHDyt9EK9PrAq_r7wFc=&h=385&w=397&sz=15&hl=de&start=3&um=1&tbnid=pswj86TxyqHqbM:&tbnh=120&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Deyesonbrazil.files.wordpress.com/%26um%3D1%26hl%3Dde%26sa%3DN)
5. Teixeira ARL, Nitz N, Guimaro MC, et al. Chagas disease. *Posgrad Med* 2006; 82:788-798.
6. Azogue E. Women and congenital Chagas' disease in Santa Cruz, Bolivia: epidemiological and sociocultural aspects. *Soc Sci Med.* 1993; 37:503-511.
7. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infect Dis* 2001; 1:92-100.
8. Schmuñis GA. Risk of Chagas disease through transfusions in the Americans. *Medicina (B Aires)* 1999; 59:125-134.
9. Dias JCP, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Men Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:103-121.
10. Schmuñis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:75-86.
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Blood donor screening for Chagas disease--United States 2006-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 56:141-3.
12. Chocair PR, Sabbaga E, Amato Neto V, et al. Kidney transplantation: a new way of transmitting Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1981; 23:280-282.
13. Prata A. Chagas' disease. *Infect Dis Clin North Am* 1994; 8:61-76.
14. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: A case for molecular mimicry. *Autoimmunity* 2006; 39:41-54.
15. (Accessed May 25, 2008, at <http://ciencianet.com.ar/files/images/chagas.post.jpg>)

-
16. Elias F. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA and análisis of the B cells in the heart tissue of patients with chronic Chagas' heart disease. Dissertation, Freien Universität Berlín, 2000.
17. The kiss of death. Chagas' disease in the Americas. (Accessed April 22, 2009, at <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>)
18. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP et al. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2004; 99:1-12.
19. Manoel-Caetano Fda S, Silva AE. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cad Saude Publica, Rio de Janeiro 2007; 23:2263-74.
20. Röllingthoff M, Bogdan C, Gessner A, et al. Immunity to protozoa 2001. Encyclopedia of Life Sciences.
21. Gironés N, Cuervo H und Fresno M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. Curr Top Microbiol Immunol. 2005; 296: 89-123.
22. Chagas disease: Clinical course. (Accessed November 08, 2008, at www.itg.be/itg/DistanceLearning/LectureNotesVandenEndenE/04_Chagas_diseasep8.htm)
23. Louis V Kirchhoff. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). (Accessed February 15, 2009, at <http://www.emedicine.com/med/topic327.htm>)
24. Yacoub S, Birks EJ, Slavik Z, et al. Early detection of myocardial dysfunction in Chagas disease using novel echocardiographic indices. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97:528-34.
25. Torrico F, Castro M. La Enfermedad de Chagas – Control y Manejo. Cochabamba Bolivia. Tercera Edición 2002.
26. Hernández-Becerril N, Nava A, Reyes PA, et al. IgG subclasses reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. Archivos de Cardiología de México 2001; 71:199-205.
27. Medicina Tropical CD-ROM. 2002. ITGPRESS ISBN 90-76070-23-7
28. Doença de Chagas. (Accessed September 6, 2008, at www.ipecc.fiocruz.br/pepes/dc/dc.htm)
29. Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. Mem Inst. Oswaldo Cruz 2006; 101:463-491.
30. Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Acta Trop 2002; 81:123-132.
31. Reis DD, Gazzinelli TR, Gazzinelli G, et al. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. The Journal of Immunology 1993; 150:1611-1618.

-
- 32.** Levin MJ, Hoebeke J. Cross-talk between anti-beta1-adrenoceptor antibodies in dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. *Autoimmunity* 2008; 41:429-433.
- 33.** Jahns R, Boivin M, Triebel S, et al. The induction of activating beta1-receptor antibodies results in progressing dilation and functional restriction of the left ventricle in rats. 68 Annual Session of the German Society of Cardiology, 2002; http://www.dgkardio.de/%7Ehoare/f02_main.htm: April, 4, 2002;V235.
- 34.** Wallukat G, Müller J, Hetzer R. Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies directed against cardiac proteins from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *New Englang Journal of Medicine* 2002;347.
- 35.** Müller J, Wallukat G, Dangel M, et al. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101:385-391.
- 36.** Elies R, Ferrari I, Wallukat G, et al. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *Journal of Immunology* 1996; 157:4203-4211.
- 37.** Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, et al. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 35:1590-1598.
- 38.** Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, et al. Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz* 2000; 25:261-266.
- 39.** Wallukat G, Nissen E, Müller J, et al. The pathophysiological role of autoantibodies directed to G-protein coupled receptors and therapeutic strategies of antibody removal. Roland Brinkmann and Rudolf Kunze. *Periodical of the Afina Academy* 2002; 1:1.
- 40.** Masuda MO, Levin M, Farias de Oliveira S, et al. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J* 1998; 12:1551-1558.
- 41.** Gouldson PR, Higgs C, Smith RE, et al. Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* 2000; 23:60-77.
- 42.** Elies R, Fu LX, Eftekhari P, et al. Immunochemical and functional characterization of an agonist-like monoclonal antibody against the M2 acetylcholine receptor. *European Journal of Biochemistry* 1998; 251:659-666.
- 43.** Sterin-Borda L, Cantore M, Pascual J, et al. Chagasic IgG binds and interacts with cardiac beta adrenoceptor-coupled adenylate cyclase system. *Int. J. Immunopharmacol* 1986; 8:581-588.
- 44.** Labovsky V, Smulski RC, Gómez K, et al. Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies with chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148:440-449.
- 45.** Sterin-Borda L, Perez Leiros C, Wald M, et al. Antibodies to beta 1 beta 2 adrenoceptors in Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 1988; 74:349-354.

-
46. Jahns R, Boivin V, Krapf T, et al. Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 36:1280-1287.
47. Rios CD, Jordan BA, Gomes, et al. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacology and Therapeutics* 2001; 92:71-87.
48. Christ T, Wettwer E, Dobrev D, et al. Autoantibodies against the beta1 adrenoceptor from patients with dilated cardiomyopathy prolong action potential duration and enhance contractility in isolated cardiomyocytes. *J. Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1515-1525.
49. Trautwein W, Hescheler J. Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Annu Rev Physiol* 1990; 52:257-274.
50. Hernandez CCQ, Barcellos LC, Giménez LE, et al. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca²⁺ current. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 55-65.
51. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, et al. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of autoantibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 1994; 89:2760-2767.
52. Krause EG, Bartel S, Beyerdorfer I, et al. Activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiomyocytes by anti-beta 1-adrenoceptor autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Blood Press Suppl* 1996; 3:37-40.
53. Ford CE, Skiba NP, Bae H, et al. Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* 1998; 280:1271-1274.
54. Goin JC, Leiros CP, Borda E, et al. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *FASEB J* 1997; 11:77-83.
55. Goin JC, Sterin-Borda L, Bilder CR, et al. Functional implications of circulating muscarinic cholinergic receptor autoantibodies in Chagasic patients with achalasia. *Gastroenterology* 1999; 117:798-805.
56. Sterin-Borda L, Goin JC, Bilder CR, et al. Interaction of human chagasic IgG with human colon muscarinic acetylcholine receptor: molecular and functional evidence. *Gut* 2001; 49:699-705.
57. Leiros CP, Sterin-Borda L, Borda ES, et al. Desensitization and sequestration of human m2 muscarinic acetylcholine receptors by autoantibodies from patients with Chagas' disease. *J Biol Chem* 1997; 272:12989-12993.
58. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, et al. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 48:211-221.
59. Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46:616-623.
60. Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, et al. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1171-1175.

-
61. Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, et al. Serodiagnosis of chronic and Akute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: Results of a collaborative study in six Latin American countries. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:449-452.
62. Bazzino O. Valor pronóstico de la determinación de la proteína C-reactiva en la Angina Inestable. *Revista Española de Cardiología* 2001; 54:1-6.
63. Melo Coutinho CM, Cavalcanti GH, Bonaldo MC, et al. *Trypanosoma cruzi*: Detection of surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. *Experimental Parasitology* 1998; 90:143-53
64. Medrano-Mercado N, Luz MR, Torrico F, et al. Acute-phase proteins and serologic profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54:154-61.
65. López L, Arai K, Giménez E, et al. C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. *Rev. Esp. Cardiolgia* 2006; 59:50-6.
66. Moretti E, Basso B, Cervetta L, et al. Patterns of cytokines ynd soluble cellular receptors in the sera of children with acute Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:1324-1327.
67. Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Faé KC, et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *The Journal of Infectious Diseases* 2006; 193:1394-1399.
68. Pascale JM, Sousa OE, Orn A. Determination of soluble interleukin-2 receptor in patients with american trypanosomiasis in Panama. *Rev Med Panama* 1992; 17:12-16.
69. Pascale JM, Sosa CE, Orn A. Evaluation of interleukin-2 soluble receptor in patients with tripanosomiasis Americana in Panama. *Rev Med Panama* 1991; 16:184-188.
70. Villalta F, Kierszenbaum F. Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease' I. Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (Amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils. *The Journal of Immunology* 1983; 31:1504-1510.
71. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994; 56:672-686.
72. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109:33-44.
73. de Oliveira TB, Pedrosa RC, Filho DW. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *Int J Cardiol* 2007; 116:357-363.
74. Macao LB, Fihlo DW, Pedrosa RC, et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated whit Chagas' disease. *Int J Cardiol* 2007; 123:43-49.

-
- 75.** Michowitz Y, Kisil S, Guzner-Gur H, et al. Usefulness of serum myeloperoxidase in prediction of mortality in patients with severe heart failure. *Isr Med Assoc J* 2008; 10:884-888.
- 76.** Palhares PE, Fontana Júnior P, Schaffer GM, et al. Tissue damage markers in experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 1988; 21:957-959.
- 77.** Palhares PE, Marcondes NS, Fontana Júnior P, et al. Correlation between tissue damage and malondialdehydemia in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Med Biol Res* 1987;20:795-798.
- 78.** Palhares PE, Marcondes NS, Fontana Júnior P, et al. Malondialdehydemia and parasitemia during acute phase of experimental Chagas' disease in mice. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20:799-801.
- 79.** Mitták M und Karlík T. Diagnostics of intestinal isquemia. Influence of surgery on plasma levels of I-FABP as the marker of enterocyte injury. *Rozhl Chir* 2008; 87:16-20.
- 80.** Cronk DR, Houseworth TP, Cuadrado DG, et al. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) for the detection of strangulated mechanical small bowel obstruction. *Curr Surg* 2006; 63:322-325.
- 81.** Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2000; 21:1502-1513
- 82.** Hunt SA; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:e1-82.
- 83.** Daniels LB, Laughlin GA, Clopton P, et al. Minimally elevated cardiac troponin T and elevated N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predict mortality in older adults: results from the Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:458-459.
- 84.** Hassan AK, Bergheanu SC, Hasan-Ali H, et al. Usefulness of peak troponin-T to predict infarct size and long-term outcome in patients with first acute myocardial infarction after primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2009; 103:779-784.
- 85.** Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332:78-81.
- 86.** Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, et al. Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155:726-32
- 87.** Munagala VK, Burnett JC Jr, Redfield MM. The natriuretic peptides in cardiovascular medicine. *Curr Probl Cardiol* 2004; 29:707-69.

-
- 88.** Becerra de Melo R, Oliveira Parente GB, Guimarães VE. Determinação do peptídeo natriurético cerebral humano em portadores da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2005; 84:2.
- 89.** Ribeiro AL, dos Reis AM, Barros MV, et al. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagas' disease. *Lancet* 2002; 360:461-462.
- 90.** Talvani A, Rocha OCM, Cogan J, et al. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:645-649.
- 91.** Ribeiro AL, Teixeira MM, Reis AM, et al. Brain natriuretic peptide based strategy to detect left ventricular dysfunction in Chagas disease: a comparison with the conventional approach. *Int J Cardiol* 2006;109:34-40.
- 92.** Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, et al. Invasive and noninvasive correlations of B-type natriuretic peptide in patients with heart failure due to Chagas cardiomyopathy. *Congest Heart Fail* 2008; 14:121-126.
- 93.** Marques DS, Canesin MF, Barutta Júnior F, et al. Evaluation of asymptomatic patients with chronic Chagas disease through ambulatory electrocardiogram, echocardiogram and B-Type natriuretic peptide analyses. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87:336-343.
- 94.** Moreira Mda C, Heringer-Walther S, Wessel N, et al. Prognostic value of natriuretic peptides in Chagas' disease: a 3-year follow-up investigation. *Cardiology* 2008; 110:217-225.
- 95.** Heringer-Walther S, Moreira Mda C, Wessel N, et al. Does the C-type natriuretic peptide have prognostic value in chagas disease and other dilated cardiomyopathies? *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 48:293-298.
- 96.** Scharhag J, George K, Shave R, et al. Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40:1408-1415.
- 97.** van Bockel EA, Tulleken JE, Ligtenberg JJ, et al. The significance of elevated troponin levels in the absence of acute cardiac ischaemia. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005; 149:1879-1883.
- 98.** Machado MN, Suzuki FA, Mouco OC, et al. Positive troponin T in a chagasic patient with sustained ventricular tachycardia and no obstructive lesions on cine coronary angiography. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:182-184.
- 99.** Basquiera AL, Capra R, Omelianiuk M, et al. Serum troponin T in patients with chronic Chagas disease. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56:742-744.
- 100.** Aras R, Bastos C, Mota G, et al. Troponin in chagas disease. *Braz J Infect Dis* 2003; 7:358-359.
- 101.** Schulz O, Kirpal K, Stein J, et al. Importance of low concentrations of cardiac troponins. *Clin Chem* 2006; 52:1614-1615.
- 102.** Mingels A, Jacobs L, Michielsen E, et al. Reference population and marathon runner sera assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and I assays. *Clin Chem* 2009; 55:101-108.

-
- 103.** Gallerano RH, Marr JJ und Sosa RR. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43:159-166.
- 104.** Rocha MO, Ribeiro AL, Teixeira MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci* 2003; 8:e44-54.
- 105.** Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5:727-743.
- 106.** Wurderlich N, Burchard G. Tropenerkrankungen des Herzens: Chagas-Erkrankung und Echinokokkose. *Kardiologie* 2008; 2:239-250.
- 107.** Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chromotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim Acta* 1987;46:S634-9.
- 108.** Sánchez-Guillén Mdel C, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, et al. Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:733-740.
- 109.** Nikolaev VO, Boivin V, Störk S, et al. A novel fluorescence method for the rapid detection of functional beta1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:423-431.
- 110.** Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, et al. Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces beta-adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* 2001; 88:578-586.
- 111.** Jahns R, Boivin V, Siegmund C, et al. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation* 1999; 99:649-654.
- 112.** Del Corso C, de Carvalho AC, Martino HF, et al. Sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy decrease I_{Ca} in cardiomyocytes isolated from rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H1928-1936.
- 113.** Andersen LE. Rural-Urban migration in Bolivia: Advantages and disadvantages. Institute for Socio-Economic Research. Univesidad Católica Boliviana. La Paz-Bolivia. 2002.
- 114.** Sterin-Borda L, Perez Leiros C, Wald M, et al. Antibodies to beta 1 and beta 2 adrenoceptors in Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 1988; 74:349-354.
- 115.** Goin JC, Borda E, Segovia A, et al. Distribution of antibodies against beta-adrenoceptors in the course of human *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 197:186-192.
- 116.** Goin Jc, Borda ES, Auger S, et al. Cardiac M2 muscarinic cholinceptor activation by human chagasic autoantibodies: association with bradycardia. *Heart* 1999; 82:273-278.

-
- 117.** Goin JC, Sterin-Borda L, Bilder CR, et al. Functional implications of circulating muscarinic cholinergic receptor autoantibodies in chagasic patients with achalasia. *Gastroenterology* 1999; 117:798-805
- 118.** Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, et al. Levels of anti-M2 and anti-beta1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' disease. *Microbes Infect* 2006; 8:2459-2464.
- 119.** Chiale PA, Ferrari I, Mahler E, et al. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 2001; 103:1765–1771.
- 120.** Mahler E, Hoebeke J, Levin MJ. Structural and functional complexity of the humoral response against the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 β protein in patients with chronic Chagas' heart disease. *Clin Exp Immunol* 2004; 136:527-534.
- 121.** Sterin-Borda L, Borda E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:273-80.
- 122.** Borda ES, Sterin Borda L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996; 54:149-156.
- 123.** Escobar AI, Fernández-Gómez R, Peter JC, et al. IgGs and Mabs against the beta2-adrenoreceptor block A-V conduction in Mouse hearts: A possible role in the patogenesis of ventricular arrhythmias. *J Mol cell Cardiol* 2006; 40:829-837.
- 124.** Chiale PA, Rosenbaum MB, Elizari MV, et al. High prevalence of antibodies against β 1- and β 2-adrenoceptors in patients with primary electrical abnormalities. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:864-869.
- 125.** Nasser Y, Ho W, Sharkey KA. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J Comp Neurol* 2006; 495:529-53.
- 126.** Roenspeck W, Kunze R, Wallukat G, et al. Peptide against autoantibodies elicited by DCM. EP19990118630; 09/21/1999.
- 127.** Bilate AM, Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50:67-74.
- 128.** Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res* 2003; 60:96-107.
- 129.** Corbett CE, Ribeiro U Jr, Prianti MG, et al. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:993-998.
- 130.** Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. Reis DD, Corrêa-Oliveira R. *Lancet* 1996;348:891-892.

-
- 131.** Rodrigues DB, Correia D, Marra MD, et al. Cytokine serum levels in patients infected by human immunodeficiency virus with and without *Trypanosoma cruzi* coinfection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38:483-487.
- 132.** Cetron MS, Basilio FP, Moraes AP, et al. Humoral and cellular immune response of adults from northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to T. cruzi antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49:370-382.
- 133.** Mocelin AO, Issa VS, Bacal F, et al. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2005; 7:869-873.
- 134.** Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:407-411.
- 135.** Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 2004; 38:943-950.
- 136.** Pérez-Fuentes R, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, et al. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2007; 101:123-132.
- 137.** Ward LS, Guariento ME, Fernandes GA, et al. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32:285-289.
- 138.** Crema E, Monteiro Ide O, Gomes MG, et al. Evaluation of cytokines (MIG, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-5, and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy. *Clin Immunol* 2006; 119:213-218.
- 139.** Pakianathan DR, Kuhn RE. Interleukin-2 receptors in experimental Chagas' disease. *Infect Immun* 1992; 60:3904-3908.
- 140.** Wen JJ, Vyatkina G, Garg N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1821-1833.
- 141.** Palhares PE, Marcondes NS, Fontana Júnior P, et al. Correlation between tissue damage and malondialdehydemia in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20:795-798.
- 142.** Palhares PE, Fontana Júnior P, Schaffer GM, et al. Tissue damage markers in experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 1988; 21:957-959.
- 143.** Pérez-Fuentes R, Guégan JF, Barnabé C, et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol* 2003; 33:293-299.

-
- 144.** Dhiman M, Estrada-Franco JG, Pando JM, et al. Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16:660-666.
- 145.** Zacks MA, Wen JJ, Vyatkina G, et al. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad Bras Cienc* 2005; 77:695-715.
- 146.** Pérez-Fuentes R, Torres-Rasgado E, Salgado-Rosas H, et al. The anti-oxidant defence response in individuals with the indeterminate form of Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2008; 102:189-197
- 147.** The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for Redefinition of Myocardial Infarction. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2000; 21:1502-1513.
- 148.** Maisel A, Mueller C, Adams K Jr et al. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail* 2008; 10:824-839.
- 149.** Melo RB, Parente GB, Victor EG. Measurement of human brain natriuretic peptide in patients with Chagas' disease][Article in Portuguese. *Arq Bras Cardiol* 2005; 84:137-140.
- 150.** Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, et al. Invasive and noninvasive correlations of B-type natriuretic peptide in patients with heart failure due to Chagas cardiomyopathy. *Congest Heart Fail* 2008; 14:121-126.
- 151.** Jaffe AS. Elevations in cardiac troponin measurements: false false-positives: the real truth. *Cardiovasc Toxicol* 2001; 1:87-92.
- 152.** Schulz O, Paul-Walter C, Lehmann M, et al. Usefulness of detectable levels of troponin, below the 99th percentile of the normal range, as a clue to the presence of underlying coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2007; 100:764-769.
- 153.** Ilva T, Lassus J, Siirilä-Waris K, et al. Clinical significance of cardiac troponins I and T in acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008; 10:772-779.
- 154.** Knebel F, Schimke I, Schroeckh S, et al. Myocardial function in older male amateur marathon runners: assessment by tissue Doppler echocardiography, speckle tracking, and cardiac biomarkers. *J Am Soc Echocardiogr* 2009; 22:803-809.

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

Danksagung

Mein allerherzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ingolf Schimke, für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine kompetente Betreuung und Unterstützung während der Entstehungszeit dieser Arbeit. Herrn Dr. Gerd Wallukat danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Unterstützung in der Autoantikörperanalytik. Ich danke der Stiftung Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin für die Zuerkennung des Heinz-Breuer-Stipendiums, durch das mein Aufenthalt in Deutschland ermöglicht wurde. Der Charité – Universitätsmedizin Berlin danke ich für die freundliche Aufnahme in ihren Laboratorien. Frau MS Diana Duchén, Herrn Dr. Raul Araujo und Herrn Dr. Gregorio Valda, Santa Bárbara Hospital Sucre, Instituto Gastroenterológico Boliviano-Japonés Sucre, danke ich für Ihre Unterstützung bei der Patientenrekrutierung. Dem Direktor des Santa Barbara Hospital Sucre, Herrn Dr. Marcelo Medina gilt mein Dank für die Möglichkeit zur Durchführung der Patientenrekrutierung.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich danken, dass sie mich moralisch unterstützt und ermutigt haben.

Erklärung

„Ich, Silvia Gilka Muñoz Saravia, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Chronische Chagas-Erkrankung: Auto-Antikörper gegen den beta1-Adrenorezeptor, beta2-Adrenorezeptor und muscarinergen Rezeptor M2 sowie Entzündungsmarker, Marker für Oxidativen Stress und Herzmarker zur Risikoabschätzung, Diagnostik und zum Monitoring; selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, September 2009

Unterschrift

Silvia Gilka Muñoz Saravia