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

DISSERTATION

**Untersuchung des kardialen Remodelings bei Patienten
mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM)**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mathias Bock

aus Perleberg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Pauschinger
 2. Prof. Dr. med. C. Tschöpe
 3. Prof. Dr. med. H. Ince

Datum der Promotion: 04.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Die dilatative Kardiomyopathie (DCM).....	7
1.1.1.	Epidemiologie und Ätiologie.....	7
1.1.2.	Die Klinik der DCM.....	7
1.1.3.	Das kollagene Netzwerk.....	8
1.1.4.	Unterformen der dilatativen Kardiomyopathie (DCM/DCMi).....	9
1.2.	Myokardiale Entzündungsreaktionen als Ursache einer DCM.....	9
1.3.	DCM versus DCMi.....	10
1.3.1.	Immunhistologische Kriterien zur Diagnosestellung DCMi.....	11
1.3.2.	Die Entstehung einer DCMi aus einer Virusmyokarditis.....	11
1.4.	Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.....	12
1.4.1.	Physiologische Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz.....	13
1.4.2.	Therapie der Herzinsuffizienz und der DCM.....	14
1.4.3.	Behandlungsstrategien bei chronischer Inflammation.....	16
1.5.	Die extrazelluläre Matrix (EZM).....	17
1.5.1.	Die Matrixmetalloproteinasen (MMP's).....	19
1.5.1.1.	Die Regulation der MMP-Expression.....	20
1.5.1.2.	Die Aktivierung der latenten MMP's.....	21
1.5.1.3.	Endogene MMP-Inhibition.....	22
1.5.1.4.	Die Rolle der MMP's im physiologischen und pathologischen System.....	23
1.5.1.5.	MMP-Regulation nach einem akuten Myokardinfarkt.....	24
1.5.1.6.	TIMP-Regulation bei Herzkrankheiten.....	26
1.5.1.7.	MMP-Inhibitoren als neuer Therapieansatz.....	26
1.6.	Herleitung der Aufgabenstellung.....	27
2.	Methoden und Materialien	29
2.1.	Materialien.....	29
2.1.1.	Geräte.....	29
2.1.2.	Kits und Antikörper.....	30
2.1.3.	Chemikalien und Reagenzien.....	31
2.2.	Das Patientenkollektiv.....	32

2.2.1.	Einteilung der Gruppen.....	32
2.3.	Retrospektive Datenerhebung aus Patientenakten.....	34
2.3.1.	Aktenstudium und Paraklinik.....	34
2.3.2.	Medikation.....	34
2.4.	Datenerhebung im Rahmen der klinischen Diagnostik.....	35
2.4.1.	Ruhe-EKG.....	35
2.4.2.	Echokardiographie in Ruhe.....	35
2.4.3.	Linksherzkatheteruntersuchung.....	35
2.4.4.	Rechtsherzkatheteruntersuchung mit Probeentnahmen.....	35
2.4.5.	Routine-Immunhistologie.....	36
2.4.6.	Molekularbiologie.....	36
2.4.7.	Paraklinische Daten.....	37
2.5.	Zusätzliche Serumuntersuchungen im Rahmen der Studie.....	37
2.5.1.	Serumelisa.....	37
2.5.1.1.	Human Activity Assay MMP-1, -3 und -9.....	38
2.5.1.2.	TIMP-1 Human Assay.....	39
2.5.1.3.	ICTP Human EIA.....	39
2.5.1.4.	UPA-Activity Assay.....	40
2.5.1.5.	Bio-Plex Cytokine Assay.....	40
2.5.2.	Zusätzliche histologische und immunhistologische Färbungen an endomyokardialen Gewebeschnitten im Rahmen der Studie.....	41
2.5.2.1.	Sirius-Red Färbung.....	41
2.5.2.2.	Immunohistochemische Färbungen.....	41
2.6.	Statistische Methoden.....	43
2.6.1.	Auswertung der Daten.....	43
2.7.	Ethikvotum.....	43
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Das Patientenkollektiv.....	44
3.1.1.	Demographische Datenlage.....	44
3.1.2.	Hämodynamische Daten.....	46
3.1.3.	Die Medikation.....	47
3.1.4.	Virusgenomnachweis.....	49
3.2.	Versuchsreihen.....	49

3.2.1.	Serumparameter (MMP's, TIMP-1, Zytokine und pro-BNP).....	49
3.2.1.1.	TIMP-1.....	49
3.2.1.2.	MMP-1.....	50
3.2.1.3.	MMP-3.....	51
3.2.1.4.	MMP-9.....	51
3.2.1.5.	ICTP.....	52
3.2.1.6.	uPA.....	53
3.2.1.7.	Zytokinmessungen im Serum.....	54
3.2.1.8.	pro-BNP.....	58
3.2.2.	Histologie.....	58
3.2.2.1.	Sirius-Red- Färbung.....	58
3.2.2.2.	Immunhistologische Färbungen.....	59
3.2.2.2.1.	CD3.....	59
3.2.2.2.2.	MMP-2.....	60
3.2.2.2.3.	MMP-9.....	60
3.2.2.2.4.	MMP-3.....	61
3.2.2.2.5.	TIMP-1.....	62
3.2.2.2.6.	TIMP-4.....	62
3.3.	Korrelationen.....	63
3.3.1.	EF – MMP-1.....	63
3.3.2.	LVEDD – MMP-9.....	64
3.3.3.	MMP-1 – IL-6.....	64
3.3.4.	IL-6 – LVEDP.....	65
3.3.5.	CD3 ⁺ – SiriusRed.....	65
3.3.6.	CD3 ⁺ – MMP-2 Immunhistologie.....	66
3.3.7.	IL-8 – MMP-1.....	66
3.3.8.	IL-8 – MMP-3.....	67
3.3.9.	IL-8 – SiriusRed.....	67
3.3.10.	MMP-1 – MMP-3 / MMP-1 – MMP-9.....	67
4.	Diskussion und Zusammenfassung	68
4.1.	Hämodynamische Parameter.....	69
4.2.	Umbau der kardialen extrazellulären Matrix.....	70
4.2.1.	Matrixmetalloproteinasen.....	70

4.2.2.	Tissueinhibitoren der MMP's.....	74
4.3.	Zytokine.....	77
4.4.	Myokardiale Entzündung und Herzmuskelfibrose.....	79
4.5.	uPA als MMP-Aktivator.....	81
4.6.	Zusammenfassung.....	82
5.	Literatur	84
6.	Anlagen	97

1. Einleitung

1.1. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die dilatative Kardiomyopathie ist eine häufige Erkrankung des Herzmuskels, die durch eine Dilatation und Ausdünnung des linken oder aber beider Ventrikel, einer herabgesetzten systolischen Pumpfunktion und einer Verminderung der diastolischen Compliance definiert ist. Aus ihr heraus entwickelt sich häufig eine schwere Herzinsuffizienz, die bis zu einer Transplantationspflichtigkeit des Patienten führen kann, wobei sie mit 40% derzeit die führende Indikation, neben der Koronaren Herzkrankheit, zur Herztransplantation darstellt.

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Die Prävalenz beträgt derzeit 36/100000, die Inzidenz liegt bei 6 pro 100000 Einwohner. Der Häufigkeitsgipfel findet sich vor allem zwischen der 3. und 5. Lebensdekade. Männer sind in einem Verhältnis von 2:1 bevorzugt betroffen und außerdem wird ein 2,5fach erhöhtes Erkrankungsrisiko für afroamerikanische Rassen beschrieben. (Mestroni, Miani et al. 1990)

1.1.2. Die Klinik der DCM

Trotz vieler neuer moderner Therapieansätze ist die Prognose dieser Erkrankung, die meist durch Komplikationen wie kardiale Dekompensation und Herzrhythmusstörungen bestimmt wird, ziemlich schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt nur bei ca. 50%. Die Klinik äußert sich bei herabgesetzter Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel mit einem Vorwärts- und/oder Rückwärtsversagen. Als Leitsymptome dominieren die Dyspnoe und eine körperliche Schwäche, deren Ausprägungsgrade der NYHA-Klassifikation zugeordnet werden können (Hoppe, Bohm et al. 2005). Aber auch die Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz wie Unterschenkelödeme, Stauungshepatopathie, Stauungsniere und Stauungsgastritis sind nicht selten klinisch anzutreffen. Viele Patienten geben subjektiv eine atypische *Angina pectoris* Symptomatik an, die bei bestehender Dilatation der Ventrikel auf eine relative koronare Minderperfusion der kleinen Gefäße zurückzuführen ist. Rhythmusstörungen, wie sie bei der DCM sehr häufig auftreten, werden als Palpitationen beschrieben und sind dann mit der Gefahr des plötzlichen Herztodes verbunden. In Kombination mit einer herabgesetzten Ejektionsfraktion des Herzens ist die Entstehung von intrakardialen Thromben mit der möglichen Folge von pulmonalen oder systemischen Embolien gegeben.

Bei der klinischen Examination des Patienten können sich eine Verbreiterung des Herzens, ein dritter Herzton, zentralvenöse Stauungen, eine Hepatomegalie, pulmonale Stauungen und Pleuraergüsse, Aszites und Ödeme zeigen. Letztendlich aber unterscheidet sich die DCM in ihrer Klinik nicht von jeder anderen sekundären Herzinsuffizienz.

1.1.3. Das kollagene Netzwerk

Strukturelle Grundlage der verminderten kardialen Pumpleistung ist das myokardiale Remodeling. Lange Zeit war man der Meinung, dass ausschließlich eine Schädigung der Kardiomyozyten und des kontraktilen Apparates zu einer Herzinsuffizienz führen kann. Neuere Studien zeigen jedoch eindeutig, dass auch vielseitige Umbauprozesse der extrazellulären Matrix (EZM) an einer Entwicklung der Herzinsuffizienz maßgeblich beteiligt sind (Heymans, Luttun et al. 1999; Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002). Sie besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk, welches hauptsächlich aus Kollagen I und III aufgebaut ist und die Stabilität des Ventrikels sowie eine koordinierte, globale Kraftübertragung der Kardiomyozyten gewährleistet. Diese sind wellenartig von dem Kollagengerüst umschlossen, damit das Netzwerk optimal seine Kraft in der Systole, aber auch in der Diastole übertragen kann.

Die Synthese und Degradation der EZM wird durch ein System von proteolytisch wirksamen Enzymen, den Matrixmetalloproteasen und deren Inhibitoren, den TIMP's (Tissue Inhibitors of Metalloproteases), reguliert. Dieses, von vielen Faktoren abhängige System, ist im Rahmen einer Herzinsuffizienz dysreguliert, was zu einer Verschiebung des Verhältnisses von MMP's zu TIMP's führt. Damit werden Umbauprozesse in Gang gesetzt, die das bestehende Kollagennetzwerk degradieren und neu synthetisiertes, aber strukturell minderwertiges Kollagen in die EZM einbauen. Die Wände der Ventrikel dünnen aus, es kommt zu einer Gefügedilatation und eine suffiziente globale Kraftübertragung ist mit der minderwertigen EZM nicht mehr möglich, was dann zu einer eingeschränkten diastolischen und systolischen Pumpleistung des Herzen führt und wiederholt dokumentiert wurde.

Der Einfluss einer myokardialen Entzündungsreaktion auf die Aktivität der MMP's wurde bereits vielfach aufgezeigt und untersucht, wobei derzeit der genaue Pathomechanismus nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Immerhin wurde in ca. 50% der Endomyokardbiopsien von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine chronische myokardiale Entzündungsreaktion nachgewiesen (Pauschinger, Doerner et al. 1998).

1.1.4. Unterformen der dilatativen Kardiomyopathie (DCM/DCMi)

Die dilatative Kardiomyopathie wird daher in zwei Unterformen unterschieden: in eine DCM ohne Entzündung im Myokard (DCM) und jene mit einer aktiven Entzündung und/oder Virusinfektion im Myokard (DCMi), welche durch eine Anzahl von mehr als 7 CD3+ T-Lymphozyten pro mm², Expression von Zelladhäsionsmolekülen (V-CAM, I-CAM) und aktivierten Makrophagen entsprechend der WHO-Klassifikation von Kardiomyopathien definiert ist (Maron, Towbin et al. 2006).

Bei einem verbesserten Kenntnisstand über die spezifische Aktivierung der MMP's bei einer inflammatorischen DCM könnten sich mehrere kausale Therapieansätze ergeben, die das extrazelluläre, myokardiale Remodeling in bestimmten Zeitfenstern des Krankheitsprozesses positiv beeinflussen und somit die Progression der Herzinsuffizienz aufhalten.

Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass eine myokardiale Inflammation relevanten Einfluß auf die Prognose der Erkrankung hat (Kindermann, Kindermann et al. 2008). Inwieweit das durch eine Aktivierung von MMP's durch die myokardiale Inflammation mit konsekutivem myokardialen Remodeling zu erklären ist, müssen weitere Studien zeigen.

1.2. Myokardiale Entzündungsreaktionen als Ursache einer DCM

Das Krankheitsbild der entzündlichen Herzmuskelerkrankung ist seit mehreren Jahrhunderten bekannt (Hufnagel, Pankuweit et al. 1998) und wurde lange Zeit ausschließlich unter dem Begriff der Myokarditis abgehandelt, den Sobernheim bereits 1873 einführte (Sobernheim, 1873). Unter einer Myokarditis ist eine herdförmige oder diffuse Infiltration von Entzündungszellen in das Herzmuskelgewebe zu verstehen, die akut oder chronisch verlaufen kann. Die Ursache dieser Entzündungsreaktion ist durch eine Besiedelung des Herzmuskels mit kardiotropen Erregern, toxischen, chemischen und physikalischen Agenzien zugeschrieben (Schultheiss, Pauschinger et al. 1998). Heutzutage sind die kardiotropen Erreger die häufigste Ursache einer entzündlichen Herzmuskelerkrankung, da sich mit immer moderneren Nachweismethoden die Persistenz von Viren im Herzmuskelgewebe zeigt. Voraussetzung dafür ist die Entnahme von Endomyokardbiopsien (EMB) und die molekularbiologische Aufarbeitung durch ein erfahrenes Labor. Zur Diagnosestellung einer Myokarditis wurde bisher nach der Entnahme von mehreren EMB's eine konventionelle Färbung angefertigt und diese dann nach der Dallas Klassifikation ausgewertet. Die histologische Einteilung verfasste 1987 Aretz et al. (Aretz 1987; Aretz, Billingham et al. 1987)

Erst durch die Einführung von immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden gelang es bei fast 50% der DCM- Patienten chronische Entzündungsprozesse im Myokard nachzuweisen (Kuhl, Noutsias et al. 1996). Durch diese fundamentalen Neuerungen in der Analyse des Herzgewebes wurde das Verständnis über die Pathophysiologie und der Pathomechanismen der entzündlichen Herzerkrankungen erweitert und ergaben völlig neue Möglichkeiten zur Diagnostik und zur differenzialdiagnostischen Abgrenzung der einzelnen Inflammationsprozesse. Aufgrund dieser neuen Entwicklung wird die inflammatorische Kardiomyopathie in der aktuellen Klassifikation der WHO von 2006 aufgenommen (Maron, Towbin et al. 2006). Hier ist der Begriff der inflammatorischen Kardiomyopathie erstmals als Äquivalent einer chronischen Myokarditis mit Zeichen der kardialen Dysfunktion beschrieben (Richardson, McKenna et al. 1996). Wie bei der akuten Myokarditis werden auch hier idiopathische, autoimmune und infektiöse Formen unterschieden (Maisch 1998). Durch diese Fortschritte ist es nun möglich, die chronisch entzündlichen Herzkrankheiten an einem kausalen Punkt anzugehen.

1.3. DCM versus DCMi

Die immunhistologischen und molekularbiologischen Verfahren sind so gut etabliert, dass es möglich ist, die kongestiven Herzkrankheiten hinsichtlich ihrer Ätiopathogenese genauer zu differenzieren. Mittlerweile wird das Krankheitsbild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) nach der Entnahme einer Endomyokardbiopsie (EMB) und nachfolgender immunhistologischer und molekularbiologischer Aufarbeitung grob in eine dilatative Kardiomyopathie ohne histologisch nachweisbare Entzündung, die DCM, und in eine dilatative Kardiomyopathie mit einer intramyokardialen Entzündung, der DCMi, eingeordnet. Bei einer DCM per se ohne nachweisbare floride oder stattgehabte Entzündung ist die Pathogenese unklar und man bleibt bei dem Begriff der idiopathischen DCM. Vermutlich handelt es sich hierbei nicht um ein einheitliches Krankheitsbild, sondern um den Endzustand vieler Herzmuskelerkrankungen mit unterschiedlichster Ätiologie. Jedoch wird bei einem Großteil der Patienten mit einer manifesten DCM eine entzündliche Genese vermutet (Dec, Palacios et al. 1985; Salvi, Di Lenarda et al. 1989). Zudem spielen bei der Entstehung einer DCM sicherlich auch genetische Faktoren eine Rolle und werden seit einigen Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen diskutiert (Hufnagel, Pankuweit et al. 1998). Die Diagnose einer DCM ist nur nach einer invasiven Diagnostik und nachfolgendem Ausschluss aller anderen Ursachen zulässig. Histologisch ist lediglich eine Zellhypertrophie sowie degenerative Zellveränderungen und eine fibrotische Veränderung des myokardialen

Bindegewebes sichtbar (Kunkel, Schneider et al. 1982). Die Therapie ist symptomatisch orientiert und entspricht weitestgehend der einer Herzinsuffizienz.

1.3.1 Immunhistologische Kriterien zur Diagnosestellung DCMi

Die immunhistologischen Kriterien, die erfüllt sein müssen um eine intramyokardiale Entzündungsreaktion zu bestätigen, sind wie folgt (Noutsias, Seeberg et al. 1999; Noutsias, Pauschinger et al. 2003; Noutsias, Pauschinger et al. 2003): Die Anzahl der CD3 – T-Lymphozyten pro mm² in einer Endomyokardbiopsie muss größer oder gleich 7 sein, damit definitionsgemäß eine intramyokardiale Entzündung vorliegt. Weiterhin gehört auch die Anfärbung von Perforinen, V-CAM's, I-CAM's, aktivierten Makrophagen und MAC-1 Zellen zur immunhistologischen Diagnostik. Die Betrachtung mehrerer Marker bei der Diagnosestellung einer Entzündungsreaktion im Herzmuskel ist durchaus sinnvoll, da der alleinige Nachweis von CD3 – Zellen in einigen Ausnahmefällen eine falsche Diagnosestellung mit sich bringen könnte. CD3 – Zellen treten in manchen Herzmuskelarealen in so genannten „Nestern“ auf, in denen dann ihre Anzahl deutlich erhöht ist, wohingegen in anderen Arealen dann nur wenige oder keine CD3 – Zellen nachweisbar sind. Andere Entzündungsmarker wie V-CAM und I-CAM sind bei intramyokardialen Entzündungsreaktionen homogener im Gewebe verteilt, so dass ihre immunhistologische Anfärbung zusätzlich zu der CD3-Quantität die Diagnose stützen oder modifizieren kann.

1.3.2. Die Entstehung einer DCMi aus einer Virusmyokarditis

Die These, dass aus einer akuten Virusmyokarditis später eine DCMi entstehen kann, wurde in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten beleuchtet. So konnte in einer tierexperimentellen Studie von Matsumori bei einer Virusmyokarditis die Progression der ventrikulären Dilatation und Dysfunktion beobachtet werden (Matsumori and Kawai 1982). Beim Menschen wurde selbige Entwicklung abhängig von der Studie in einem Prozentsatz zwischen 14 und 52% nachgewiesen (Sekiguchi et al., 1994; Quigley, 1987). Eine Metanalyse von D'Ambrosio et al. (2001) ergab den Übergang einer akuten Virusmyokarditis in eine DCM bei 21% aller betroffenen Patienten. Allein dieser hohe Prozentsatz legt die Vermutung nahe, dass eine persistierende Entzündungsreaktion im Myokard Vorgänge induziert, die mit den Umbauprozessen der extrazellulären Matrix beginnen und mit dem Vollbild einer dilatativen Kardiomyopathie enden können. Der genaue Pathomechanismus ist bislang jedoch ungeklärt (Sigusch, Reinhardt et al. 1998). Auch wie eine Viruspersistenz im Myokard eine Konversion von einer Myokarditis hin zu einer Kardiomyopathie bewirken kann und welche Bedingungen

dann die Konversion begünstigen, ist nicht geklärt (Heim, Stille-Siegener et al. 1994; Caforio, Baboonian et al. 1997). Der Nachweis einer Viruspersistenz im Myokard könnte für die Entstehung und Progression einer Kardiomyopathie von unabhängiger Bedeutung sein, andererseits ist durch eine Virusinfektion ohne Persistenz eine Induktion von autoimmunologischen Prozessen möglich, die dann im weiteren Verlauf für die Fortschreitung der Krankheit verantwortlich sind (Schultheiss, Pauschinger et al. 1998). Gestützt wird die These der inflammatorischen Kardiomyopathie als postmyokardiale Spätform durch den Nachweis von myokardialen zellulären Infiltrationen, dem Auftreten von Autoantikörpern gegen kardiales Antigen, in der Detektion von viralem Genom und den fibrotischen Gewebeeränderungen (Bowles, Richardson et al. 1986); (Kawai, Kasuya et al. 1988); (Levi, Scalvini et al. 1988; Kuhl, Daun et al. 1992; Pankuweit, Portig et al. 2002) (Pauschinger, Bowles et al. 1999) (Pauschinger, Doerner et al. 1999) (Why, Archard et al. 1994; Why, Meany et al. 1994).

1.4. Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist als « terminale Läsion » klinisch definiert und man versteht darunter das Unvermögen, trotz ausreichend venösen Blutangebotes, den Organismus seinen Bedürfnissen entsprechend mit Blut zu versorgen. Ein wichtiger Indikator für die Pumpleistung ist das Herzzeitvolumen (HZV), welches sich aus dem Schlagvolumen (SV) und der Herzfrequenz (HF) zusammensetzt. Die dafür genutzte Formel lautet: $\text{HZV [l/min]} = \text{SV [l]} \times \text{HF [1/min]}$. Die Pumpfunktion ist dabei abhängig von der Kontraktilität (Inotropie), der Nachlast und der HF. Die Inotropie des Herzens wird durch die Vorlast, welche den Frank-Starling-Mechanismus beeinflusst, der HF (Bowditch Effekt) und der Aktivierung durch das sympathoadrenerge System abhängig. Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt den Zusammenhang zwischen LVEDP und dem SV, weshalb bei ansteigendem LVEDP eine vermehrte Vordehnung der Muskelfasern erreicht wird, die zu einem erhöhten SV führt (Busse, 1995). Dieser Mechanismus funktioniert jedoch nur bei einem gesunden Herzen einwandfrei und benötigt bei einem insuffizienten Herzen weitaus höhere Drücke um das SV überhaupt anzuheben. Daher ist die hämodynamische Messung des LVEDP's mittels Herzkatheter eine gute Methode zur Einstufung einer Herzinsuffizienz.

Der Bowditcheffekt beschreibt die Kraft-Frequenz-Beziehung am Herzen und sagt aus, dass am gesunden Herzen bei steigender HF die Kontraktionskraft zunimmt. Bei einem insuffizienten Herzen führt dies im ungünstigsten Fall zum Gegenteil mit nachfolgender

Aktivierung des sympathoadrenergen Systems und dadurch Herunterregulation der Beta-Rezeptoren.

Der Zusammenhang zwischen verminderter Pumpfunktion und massiver Herzvergrößerung, wie es bei der DCM der Fall ist, wird vom Laplace-Gesetz erklärt: $K = (p \times r) / 2 d$. Das besagt, dass zur Erzeugung eines bestimmten intraventrikulären Druckes umso mehr Kraft aufgewendet werden muss, je größer der Innendurchmesser des Ventrikels ist. Weiterhin ist das SV von der Nachlast, die vom totalen peripheren Widerstand und dem HZV bestimmt wird, abhängig ($RR = HZV \times TPR$). Steigt diese an, muss der Ventrikel gegen einen erhöhten Auswurfwiderstand anpumpen, wobei ein gesundes Herz das SV im breiten Rahmen konstant halten kann. Beim insuffizienten Herzen führt hingegen schon ein geringer Anstieg der Nachlast zu einer deutlichen Abnahme des SV.

1.4.1. Physiologische Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz

Um bei einer unzureichenden Förderleistung des Herzens die Perfusion der inneren Organe aufrecht zu erhalten, treten folgende kardiale und periphere zirkulatorische Kompensationsmechanismen in Kraft:

Die *kardialen* Mechanismen, bestehend aus dem Frank-Starling-Mechanismus, der Katecholaminausschüttung und der myokardialen Hypertrophie.

Die *peripheren* Mechanismen werden durch die Vasokonstriktion, der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) und Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie der Regulation von Zytokinen beschrieben.

Der Frank-Starling- Mechanismus greift bei einem Anstieg des totalen peripheren Widerstandes ein, was im Grunde genommen zur Aufrechterhaltung des Perfusionsdrucks von Vorteil ist, jedoch mit Erhöhung der Nachlast einhergeht und dadurch das Schlagvolumen vermindert. Zudem nimmt bei erhöhtem Venentonus das Blutangebot an das Herz zu, was zu einer Steigerung der Vorlast führt und einhergehend zur Zunahme des LVEDP's führt. Dies führt bei zunehmender Herzinsuffizienz jedoch nicht mehr zu einer gesteigerten Inotropie im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus (Francis 2001).

Des Weiteren ist die myokardiale Hypertrophie eine Anpassungsreaktion des Herzmuskels, die schnell zu einer Überschreitung des kritischen Herzgewichts von 500g führen kann, welches die optimale Blutversorgung gefährdet und schließlich zu einem chronischen Sauerstoffmangel mit allen seinen Folgen führt.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird als peripherer Kompensationsmechanismus ebenfalls zur Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks

aktiviert. Bei vermindertem zirkulierenden Blutvolumen und dem damit verbundenen Abfall der Nierenperfusion kommt es zu einer gesteigerten Reninfreisetzung. Das dadurch vermehrt gebildete Angiotensin-II erhöht durch seine stark vasokonstriktorische Wirkung die Nachlast und induziert außerdem die Freisetzung von Aldosteron. Aldosteron steigert die renale Wasserretention und hebt dadurch das Plasmavolumen an, wodurch wiederum die Vorlast steigt. Weiterhin hat Aldosteron neben seiner Mineralkortikoiden Wirkung auch direkte, fördernde Effekte auf das kardiale Remodeling (Cohn, Ferrari et al. 2000).

Als wichtige Gegenspieler des RAAS und des sympathoadrenergen Systems wurden die kardialen Gewebshormone ANP (atrialess natriuretisches Peptid) und BNP (brain natriuretic peptide) dokumentiert, die bei Dehnung von Vorhöfen (ANP) bzw. Kammern (BNP) sezerniert werden und dann vasodilatatorisch und natriuretisch-diuretisch an der Niere wirken und zentral das RAAS und das zentrale Nervensystem hemmen (Schrier and Abraham 1999). Diese peripheren, ursprünglich sinnvollen, Mechanismen tragen dazu bei, einen adäquaten Perfusionsdruck der lebenswichtigen Organe aufrecht zu erhalten. Die erhöhte Nachlast erschwert jedoch die Förderleistung des Herzens und trägt somit zu Progression der Herzinsuffizienz bei. Sobald diese kompensatorischen Mechanismen nicht mehr ausreichen und/oder sich auf andere Organsysteme auswirken, wird klinisch das Syndrom der Herzinsuffizienz manifest. So steigert die Erhöhung des diastolischen Kammervolumens und –drucks über den Frank-Starling-Mechanismus die Herzleistung, zieht aber gleichzeitig bei Linksherzinsuffizienz eine systematische Blutstauung nach sich. Dieser Zustand wird im angloamerikanischen Raum dann als „Congestive Heart Failure“ bezeichnet. Felix et al. bezeichnete diese hämodynamisch ungünstige Konstellation von Zunahme der Vorlast und begleitend gesteigerter Nachlast auch „Afterloadmismatch“ (Felix 1996). Das insuffiziente Herz erfährt weitere Schädigung und es entsteht ein sich selbst induzierender Kreislauf, der, wenn er nicht therapeutisch unterbrochen wird, zu einer fortlaufenden Verschlechterung der Herzinsuffizienz führt.

1.4.2. Therapie der Herzinsuffizienz und der DCM

Da sich die dilatative Kardiomyopathie, gleich welcher Ätiologie, als Herzinsuffizienz manifestiert, ist zumindest initial die symptomatische Therapie angezeigt. Ein an das Stadium der Herzinsuffizienz angepasster medikamentöser Therapieplan, bestehend aus einem ACE-Hemmer bzw. einem Angiotensin II-Rezeptor I-Blocker (Sartane), einem β -Blocker, Digitalis, einem Diuretikum und Spironolacton, sollte jedem Patienten zugute kommen (Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie).

ACE-Hemmer greifen in den Mechanismus des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ein, indem sie die Konversion von Angiotensin-I zu Angiotensin-II inhibieren. Hiermit durchbrechen sie mehrere Pathomechanismen der Herzinsuffizienz. Zum Ersten wird durch das verminderte Vorhandensein von Angiotensin-II die Nachlast verringert und zum anderen ist bei herabgesetzter Aldosteronwirkung und dadurch geminderter Wasser- und Natriumretention die Vorlast gesenkt. Zusätzlich wird das durch Aldosteron induzierte myokardiale Remodeling gebremst und damit ein wichtiger Faktor für die Myokardschädigung herunterreguliert (Brilla, Rupp et al. 1995; Grimm, Kromer et al. 1998). Unabhängig davon kann die Anwendung von ACE-Hemmern zu einer Reduktion der Mortalität und Morbidität sowie zu einer Prognoseverbesserung beitragen (CONSENSUS (1987)).

Eine neuere Medikamentenklasse, die Angiotensin II-Rezeptor I-Blocker, wirken direkt am Erfolgsorgan und erhalten trotz dessen die positiven Angiotensin-II Effekte, welche über den Rezeptor II vermittelt werden. In klinischen Studien ergaben sich aber keine signifikanten Vorteile gegenüber der Behandlung mit ACE-Hemmern, sodass sich der Einsatz der AT-I Blocker lediglich bei ACE-Hemmer Unverträglichkeiten erfolgen sollte (ELITE II - (Pitt, Poole-Wilson et al. 1999)).

In dem aktuellen Maron Added Trial wird bei schwerer Herzinsuffizienz die Kombination eines ACE-Hemmers mit einem AT-I-Blocker empfohlen. Für diese Medikamentenkombination ist eine signifikante Reduktion der Hospitalisierungsrate sowie der Mortalität beschrieben (Maron Added Trial).

Die Beta-Blocker waren in der Vergangenheit bei der Therapie der Herzinsuffizienz obsolet, da man lange Zeit der Ansicht war, dass man durch Hemmung des kompensatorisch erhöhten Sympathikotonus ein Vorwärtsversagen provoziert und den Patienten dadurch vital gefährdet. Mittlerweile wurde durch mehrere Studien nachgewiesen (Waagstein, Bristow et al. 1993; 1994), dass bei langfristiger Anwendung unter einschleichender Aufdosierung eine verbesserte Myokardfunktion zu erreichen ist. Weiterhin ist unter Anwendung von Beta-Blockern mehrfach eine hochsignifikante Reduktion der Letalität beschrieben worden (COPERNIKUS (1999; 1999)), was sogar für das NYHA Stadium IV zutrifft. Durch den beschriebenen kompensatorisch erhöhten Sympathikotonus werden die β -Rezeptoren am Herzen langfristig herunterreguliert, was sich als ungünstig in der Progredienz der

Erkrankung erweist. Unter einschleichender Gabe von Beta-Blockern wirkt man diesem Effekt gezielt entgegen.

Da ACE-Hemmer die Aldosteronsynthese nur inkomplett hemmen, ist es pathophysiologisch sinnvoll den Therapieplan mit einem Aldosteronantagonisten zu ergänzen. Sie erlebten nach Beendigung der RALES-Studie eine Renaissance in der Therapie der Herzinsuffizienz, nachdem dort eine deutliche Verbesserung der Beschwerdesymptomatik und eine Reduktion der Gesamtmortalität nachgewiesen wurde (Pitt, Zannad et al. 1999; Weber 1999).

Der Einsatz von Digitalisglykosiden ist in den fortgeschrittenen NYHA Klassen durchaus sinnvoll, da sie über eine Hemmung der Na/K – ATPase positiv inotrop und negativ chronotrop wirken. Ihr Einsatz führt zu einer Verbesserung der Symptomatik und Belastbarkeit sowie zu einer signifikanten Verminderung der Krankenhausaufenthalte bei Herzinsuffizienz (RADIANCE, (Packer, Gheorghide et al. 1993); PROVED, (Uretsky, Young et al. 1993). Die Gesamtmortalität wird jedoch durch ihre Verabreichung nicht gemindert (DIG).

Die Diuretikatherapie verbessert nach dem derzeitigen Wissensstand zwar nicht die Überlebensrate, kann jedoch einige Symptome der Herzinsuffizienz bessern, wie die Dyspnoe lindern oder periphere Ödeme mobilisieren.

1.4.3. Behandlungsstrategien bei chronischer Inflammation

Da man lange Zeit die Ursachen der DCM nicht eruieren konnte, blieb es meist bei dieser Behandlungsstrategie. Erst nach der Auftrennung der DCM nach ihrer Ätiologie wurden neue kausale Therapiestrategien entwickelt (Hufnagel, Pankuweit et al. 1998; Hufnagel, Pankuweit et al. 2000). Bei einer chronischen Entzündungsreaktion im Myokard, jedoch ohne jeglichen Nachweis einer Viruspersistenz, konnte in einer randomisierten Studie eine signifikante Verbesserung der Ejektionsfraktion unter einer immunsuppressiven Therapie, bestehend aus Kortikosteroiden und Azathioprin, nachgewiesen werden (Wojnicz, Nowalany-Kozielska et al. 2001). Ist molekularbiologisch ein Virus nachgewiesen worden, ist es möglich, eine antivirale Therapie mit Interferon- β einzuleiten (Kuhl, Pauschinger et al. 2003; Noutsias, Pauschinger et al. 2003). Die Wirksamkeit konnte in der multizentrisch angelegten BICC-Studie gezeigt werden (Mollmann, Nef et al. 2009).

1.5. Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Die aus mehreren Komponenten zusammengesetzte extrazelluläre Matrix (EZM) des Herzens spielt eine bedeutende Rolle für den Erhalt der Integrität und der Funktion des Herzens. In verschiedenen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass es sowohl bei der Herzinsuffizienz als auch bei der DCM zu einer Umgestaltung, dem so genannten Remodeling, der EZM kommt. Der Fibroseindex nimmt zu und es werden Kollagene gespalten, abgebaut und dann durch neue minderwertige Kollagenstrukturen ersetzt (Pauschinger, Doerner et al. 1998; Pauschinger, Knopf et al. 1999). Die exakten Mechanismen, die für das Remodeling der EZM von Bedeutung sind, konnten bisher noch nicht eindeutig aufgeschlüsselt werden. So ist es bis heute auch noch nicht geklärt, welchen Einfluss die chronische myokardiale Entzündung, die bislang bei ca. 50% der Patienten mit DCM nachgewiesen werden konnte, auf die Umbauvorgänge der EZM hat. Auch die Veränderungen der nicht kollagenen Komponenten der EZM konnten bei der DCM bislang nicht ausreichend geklärt werden.

Da seit langer Zeit hauptsächlich eine Veränderung der Kardiomyozyten und des kontraktilen Apparates für die Entstehung einer Herzinsuffizienz verantwortlich gemacht wurde, war es umso erstaunlicher, als man in mehreren Studien beweisen konnte, dass dem Remodeling der EZM ebenso eine tragende Rolle bei der Genese der Herzinsuffizienz zukommt (Pauschinger, Knopf et al. 1999). In den Studien wurde gezeigt, dass eine Veränderung der Struktur und der Funktion der EZM zu einer Veränderung der Herzgeometrie mit konsekutiver Störung der Myozytenfunktion führt. Die Bestandteile der EZM, vor allem Kollagen Typ I und Typ III, aber auch Fibronectin, Laminin und verschiedene Proteoglykane sind als komplexes dreidimensionales Netzwerk um die Myozyten angeordnet und gewährleisten so eine globale Kraftübertragung bei deren Kontraktion und ebenso eine fließende Relaxation des Ventrikels. Diese Hauptkomponenten der EZM bestimmen somit die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzens (Weber, Sun et al. 1994), die hinsichtlich ihrer Degradation sehr sensibel reguliert sind. Die Kollagensynthese geschieht durch kardiale Fibroblasten und wird auf zellulärer Ebene reguliert, wohingegen der Abbau der Matrixbestandteile durch die Ausgewogenheit des MMP/TIMP-Systems gesteuert wird. Vorrangiger Ort der Synthese der MMP's sind infiltrierende Entzündungszellen, im wesentlichen Makrophagen und neutrophile Granulozyten, so dass ein Zusammenhang mit einer chronischen Entzündungsreaktion im Herzen und der Matrixdegradation anzunehmen ist, denn es ist bereits bekannt, dass diese chronische Entzündungsaktivität bei ca. 50% der DCM-Patienten nachgewiesen werden kann

(Kuhl, Noutsias et al. 1994; Noutsias, Pauschinger et al. 2002). Diese intramyokardiale Entzündungsreaktion führt zu einer gesteigerten Expression von Zytokinen, die ihrerseits möglicherweise durch parakrine und autokrine Mechanismen zu einer vermehrten Expression von MMP's bzw. verminderten TIMP-Expression führen und somit ein Ungleichgewicht im gesamten MMP/TIMP-System hervorrufen. Dieses Ungleichgewicht führt dann zu relevanten Umbauvorgängen der EZM mit einer konsekutiven Störung der Herzfunktion.

Im Myokard existieren fünf verschiedene Kollagensubtypen, Typ I, Typ III, Typ IV, V und VI. Das steife Kollagen Typ I ist mit 80% und das elastische Kollagen Typ III mit 10% des gesamten Kollagengehaltes im Myokard die am häufigsten vertretenen Subtypen. Die fibrillären Kollagene werden als Prokollagen in den myokardialen Fibroblasten synthetisiert (Eghbali, Tomek et al. 1991), wobei nach Sekretion das N- und C- terminale Propeptid durch spezifische Proteinase abgespalten wird (Prockop and Kivirikko 1995) und später sogar im peripheren Blut zirkuliert. Ihre Quantität im Serum spiegelt den ungefähren Kollagenneuaufbau im menschlichen Organismus wieder. Die derzeit gängigen laborchemischen Marker sind das PICP (c-terminales Propeptid Kollagen I), das PINP (n-terminales Propeptid Kollagen I) und das PIIINP (n-terminales Propeptid Kollagen III). Des Weiteren synthetisieren die Fibroblasten noch einige andere Matrixproteine, wie z.Bsp. Fibronectin. Die Kollagensynthese wird durch viele Faktoren wie Zytokine (Interleukin 1 β), Wachstumsfaktoren (Platelet-Derived-Growth Factor, PDGF), Transforming Growth Factor (TGF- β), Angiotensin II, Aldosteron und mechanischen Stretch beeinflusst (Eghbali, Tomek et al. 1991; Eghbali 1992; Simm, Nestler et al. 1998; Lee, Delhaas et al. 1999; Siwik, Chang et al. 2000; Lijnen, Petrov et al. 2001; Neumann, Huse et al. 2002).

unstabileren Fragmente gespalten, welche ihre dreifach-helix Struktur verlieren und in einzelne Stränge zerfallen. Diese nennt man Gelatinfragmente, die dann wiederum durch die zweite Gruppe von Proteasen, den Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) weiter aufgespalten werden können. Weiterhin können diese Gelatinasen auch das Kollagen IV der Basalmembran spalten. Gruppe drei fasst die Stromelysins (MMP-3, MMP-10 und MMP-11) zusammen, die ein großes Spektrum an EZM-Bestandteilen, z.Bsp. Fibronectin, Vitronectin und einige Kollagentypen abbauen und darüber hinaus auch eine Reihe anderer MMP's aktivieren können. In der vierten Gruppe werden die jüngst entdeckten MT-MMP's (*membran-type*) subsumiert, welche hauptsächlich durch ihre Membranbindung eine lokale Degradation der Matrix bewirken.

Diese substratgebundene Unterscheidung der MMP's basierte auf dem Wissensstand von vor einigen Jahren und hat sich damals als sinnvoll erwiesen. Lange Zeit dachte man, der Abbau der Matrix wird vom Expressionsgrad der Kollagenasen diktiert. Inzwischen ist bekannt, dass durchaus auch Gelatinasen in der Lage sind, dreifach helikale Kollagenstränge zu denaturieren (Aimes and Quigley 1995; Okada, Naka et al. 1995). Mit dieser neu entdeckten Eigenschaft spielen die Gelatinasen eine noch bedeutendere Rolle im Kollagenstoffwechsel als bisher angenommen (Kahari and Saarialho-Kere 1997) und die alte Einteilung der MMP's wäre praktisch hinfällig.

1.5.1.1. Die Regulation der MMP-Expression

Die Regulation des Matrixremodelings über das MMP/TIMP- System ist ein weiterer wichtiger Punkt, der auf drei Ebenen abläuft: erstens über die Transkription, zweitens über die Aktivierung der Proenzyme und drittens über die Inhibition der aktiven MMP's über deren Inhibitoren, den TIMP's.

Die Expression der MMP's im gesunden Organismus ist auf einem sehr niedrigen Level angesiedelt und wird bei physiologischen oder pathologischen Prozessen heraufreguliert. Die Induktion und Stimulation auf der Transkriptionsstufe wird über inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6, INF- γ), Hormone und Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β) fein reguliert. So wies die Arbeitsgruppe von Feldman et al. in einem transgenen Tiermodell mit myokardialer Überexpression von TNF- α nach, dass die Tiere eine Herzfunktionsstörung im Sinne einer DCM entwickelten. Diese Veränderungen des Zytokinprofils sowie der Myokardfunktion waren verbunden mit einer erhöhten MMP-Aktivität in Kombination mit einer Umgestaltung der EZM (Kubota, McTiernan et al. 1997; Li, Feng et al. 2000; Li, Kadokami et al. 2002).

Weiterhin existiert ein Zelloberflächenprotein, EMMPRIN („*extracellular matrix metalloproteinase inducer*“), welches die MMP-Expression induzieren kann und im gesunden sowie im kranken Herzgewebe identifiziert werden konnte (Spinale, Coker et al. 2000). Für andere Faktoren wie IL-4, Kortikosteroide, Heparin und Retinoidsäure konnte eine hemmende Wirkung auf die Genexpression der MMP's nachgewiesen werden (Wassenaar, Verschuur et al. 1999).

Jedoch nicht alle MMP's reagieren identisch auf denselben Stimulus. So aktiviert TGF- β die MMP-2 und MMP-9, hemmt aber die MMP-1 und MMP-3- Synthese (Mauviel 1993). Bei Interferon- γ ist die Wirkung sogar Zelltyp spezifisch. So aktiviert es die MMP-1- Expression in Keratinozyten und hemmt sie in Makrophagen und Fibroblasten (Makela, Salo et al. 1998).

1.5.1.2. Die Aktivierung der latenten MMP's

Die Aktivierung der latenten MMP's ist die zweite Ebene, auf der ihre Wirkung reguliert werden kann. Hier wurden drei verschiedene Aktivitätsmechanismen beschrieben, auf deren Weise die pro-MMP's in aktive Proteinase gespalten werden:

Der erste Weg ist die schrittweise Aktivierung, der zweite die Aktivierung über die Zelloberflächen-Proteasen wie den MT-MMP's und drittens über intrazelluläre Aktivierung (Nagase 1997). Der erste Schritt, bei dem die MMP's sukzessive aktiviert werden, wird durch Enzyme wie Plasmin, Trypsin, Elastin und Kallikrein gesteuert, wobei Plasmin der bedeutendste physiologische Aktivator *in vivo* ist (Murphy, Willenbrock et al. 1994). Plasmin bewirkt eine Konformationsänderung an der Propeptid-Region des MMP-Moleküls, an welcher später durch eine andere Protease, beispielsweise eine andere MMP, das Propeptid abgespalten wird und das MMP-Molekül somit aktiviert ist (Nagase 1997). Diese zuvor durch Plasmin abgewickelte Konformationsänderung und damit die Erleichterung der Aktivierung könnte eine deutliche Beschleunigung bei der MMP -Aktivierung bewirken. Die Entwicklung von Plasminogen zu Plasmin durch die Plasminogenaktivatoren ist an der Zelloberfläche lokalisiert, an der sich die Rezeptoren für den Plasminogenaktivator befinden (uPARs).

Die an der Zelloberfläche lokalisierte Aktivierung der MMP's ist äußerst wichtig bei der Degradation der EZM um die Zelle herum, wenn beispielsweise eine Zellmigration durch die EZM stattfinden muss. Diese zelloberflächliche Aktivierung wird oftmals durch die MT-MMP's vorgenommen, die erstmals 1994 von Sato et al. (Sato, Takino et al. 1994; Sato, Takino et al. 1996) geklont wurden (MT1-MMP) und als Aktivator von MMP-2 identifiziert werden konnten. Mittlerweile sind fünf verschiedene MT-MMP's bekannt und es konnte

gezeigt werden, dass durch sie eine Reihe von MMP's gespalten und aktiviert werden (Knauper, Cowell et al. 1997; Nagase 1997).

1.5.1.3. Endogene MMP-Inhibition

Sind die MMP's erstmal vollständig aktiviert, können sie nur noch auf der Ebene der direkten Inhibition durch ihre spezifischen Inhibitoren, den TIMP's, reguliert werden (Baker et al., 1998; Edwards et al., 1996; Li YY et al., 1999; Woessner et al., 2000) (Greene, Wang et al. 1996). Von ihnen sind mittlerweile vier verschiedene Subtypen identifiziert worden: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 (Spinale 2002). Alle TIMP's haben eine ähnliche molekulare Struktur, inklusive einer N-terminalen Domäne, die direkt mit dem aktiven zink-bindenden Zentrum der MMP's interagieren kann. Diese Interaktion führt zur direkten Hemmung der MMP-Aktivität, wobei MMP-TIMP-Komplexe im molekularen Verhältnis von 1:1 entstehen. TIMP-1 kann Komplexe mit MMP-3 und MMP-9 bilden (Gomis-Ruth, Maskos et al. 1997; Spinale, Coker et al. 2000). TIMP-4 kann ebenso MMP-3 und MMP-9 sehr effektiv inhibieren (Liu, Wang et al. 1997) und ist innerhalb des Myokards vorrangig vertreten (Li, Feldman et al. 1998). TIMP-2 ist ein potentieller Inhibitor von vielen der dort vertretenen MMP's, außer von MMP-9. Weiterhin kann TIMP-2 auch Komplexe mit MT1-MMP an der Zellmembranoberfläche bilden und spielt damit eine wichtige Rolle in der weiteren Aktivierungskette für MMP-2, da diese vorrangig durch MT1-MMP aktiviert wird. Für den MMP Inhibitor TIMP-3 konnte mehrfach eine Komplexbildung mit den MMP's -1, -2, -3, -9 und -13 nachgewiesen werden.

Die Regulation der TIMP's auf Ebene der Transkription wird von Zytokinen wie IL-1 und IL-6 übernommen (Mauviel 1993). TGF- β hat eine weit größere Bedeutung, da es in der Lage ist die Expression von MMP-2, MMP-9 und den TIMP's hoch zu regulieren und gleichzeitig die von MMP-1 und MMP-13 herunterzuregulieren (Mauviel 1993). Somit sind die TIMP's relevante Inhibitoren der MMP's innerhalb des Myokards und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Umbauprozesse der EZM im Myokard. Zudem haben die Untersuchungen der TIMP's in letzter Zeit aufgedeckt, dass sie noch weitere Funktionen im biologischen System einnehmen, als lediglich die Blockierung der MMP's. TIMP-1 und TIMP-2 fördern die Aktivität des TGF und hemmen die Angiogenese (Hayakawa, Yamashita et al. 1992; Hayakawa, Yamashita et al. 1994; Thorgeirsson, Yoshiji et al. 1996), wohingegen TIMP-3 eine Rolle im Apoptosesystem spielt (Baker, Zaltsman et al. 1998).

Die Hemmung der MMP's kann schließlich auch noch durch andere Proteine, wie zum Beispiel alpha-Macroglobulin, erfolgen. Es ist ein in der Leber produziertes Protein mit einem hohen Molekulargewicht (750 kDa) und ist in der Lage vier Klassen von Proteinase zu inhibieren, wie Cysteine, Asparaginase, Serinproteasen und MMP's. Doch aufgrund der Molekülgröße von alpha-Macroglobulin und der damit einhergehenden verlangsamten Gewebepenetration wird die Bedeutung im Kollagenstoffwechsel nicht mit der der TIMP's zu vergleichen sein.

1.5.1.4. Die Rolle der MMP's im physiologischen und pathologischen System

Der Kollagenstoffwechsel der EZM ist ein grundlegender Mechanismus für die Entwicklung, die Morphogenese und Gewebeumbauprozesse. Es ist bekannt, dass die MMP's an vielen physiologischen Um- und Aufbauprozessen wie der Embryonalentwicklung, der Ovulation, dem Knochenumbau und der Wundheilung beteiligt sind. Bei einer Reihe von pathologischen Prozessen sind sie ebenfalls involviert. So konnte ihre Aktivität bei zahlreichen Krankheiten wie der Arthritis, tumorösen Prozessen, Parodontose, Arteriosklerose und Herzkrankheiten wie der DCM oder nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen werden.

In verschiedenen Studien wurde die Verbindung der MMP-Aktivität und einer Umgestaltung der Matrix mit nachfolgender Myokardfunktionsstörung aufgezeigt. Darüber hinaus ließen sich mittels Hemmung der MMP's durch synthetische MMP-Inhibitoren die Entstehung einer Herzinsuffizienz sowie das Remodeling der EZM verhindern. Spinale et al. haben bereits gezeigt, dass an einem tachykardieinduzierten Herzinsuffizienzmodell ein Zusammenhang zwischen der Expression kardialer MMP's und der Progression einer Herzinsuffizienz besteht (Spinale, Coker et al. 1999). Diese tachykardieinduzierte Störung war begleitet von einer Umstrukturierung der Matrix und einem signifikanten Anstieg der MMP's. Die Bedeutung eines absoluten Anstieges von MMP's wurde in einem transgenen Mausmodell untersucht, die aufgrund ihrer genetischen Veränderungen eine myokardiale MMP-1 Expression vorwies, welche unter normalen Umständen nicht im Mausgewebe zu finden ist. Die Mäuse bekamen nach sechs Monaten eine linksventrikuläre Hypertrophie und Hyperkontraktilität, nach zwölf Monaten zeichnete sich dann eine Umstrukturierung des myokardialen Kollagens ab mit einer Störung der systolischen und diastolischen Funktion (Kim, Dalal et al. 2000). Zusammenfassend hat die Studie eine Beziehung zwischen vermehrter proteolytischen Aktivität, dem Remodeling bis hin zur Zerstörung der EZM, die schließlich einhergeht mit einer herabgesetzten Herzfunktion, aufgezeigt.

1.5.1.5. MMP-Regulation nach einem akuten Myokardinfarkt

In zahlreichen Studien wurde die ansteigende Expression und Aktivität von MMP-1, -2, -3 und -9 in Menschen-, Ratten- und Schweineherzen nach einem Myokardinfarkt belegt (Sato, Ashraf et al. 1983; Cleutjens, Kandala et al. 1995; Tyagi, Kumar et al. 1996; Carlyle, Jacobson et al. 1997; Danielsen, Wiggers et al. 1998). Nach weniger als einem Tag nach Myokardinfarkt beginnt die Aktivität der MMP's erheblich anzusteigen, was nahe legt, dass MMP's in den Reparaturprozess nach dem Infarkt ereignis stark eingebunden sind. Angenommen wird eine vorrangige Beteiligung der MMP's an Abläufen, die für eine Infarktabheilung notwendig sind. Dazu gehören die frühe Kollagenverdauung, Zellmigrationsprozesse der inflammatorischen Zellen und der Fibroblasten, die Angiogenese, das Remodeling des neuen Ersatzgewebes und der Regulation der *growth-factor* Aktivität. Die Funktion der MMP's während der Heilungsprozesse nach Infarkt wurde in mehreren Tierstudien und dem Einsatz von speziellen *broad-range* MMP-Inhibitoren (unspezifische MMP-Hemmer) belegt und somit in einem modifiziertem Tiermodell die frühe LV-Dilatation vier Tage nach Infarkt signifikant reduziert (Rohde, Ducharme et al. 1999). Auch wurde dort der Heilungsvorgang 1 bis 2 Wochen nach Infarkt unter ständiger Gabe der MMP-Inhibitoren untersucht und ebenfalls eine signifikante Reduktion der späten LV-Dilatation erhoben (Creemers, Cleutjens et al. 2001). Eine Verabreichung von MMP-Inhibitoren ruft jedoch größere Nekroseareale hervor (56%), dickere Infarktzwände (32%), weniger Zelldichte (inflammatorische Zellen und Fibroblasten) im Infarktreal (37%) und eine Reduktion der Kollagendisposition (68%). Diese Effekte der MMP-Hemmung und des LV-Remodelings sind am 7. Tag nach dem Infarkt am stärksten ausgeprägt. Somit ist die verminderte LV-Dilatation nach MMP-Inhibitor Gabe auf eine gewisse Erhaltung der Infarktzone zurückzuführen, die jedoch zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach dem Infarkt ereignis relevant ist. Eine verlangsamte Wundheilung nach Hemmung der MMP-Aktivität wurde in vaskulären und dermatologischen Wunden nachgewiesen und ist mit einer erschwerten Migration der Entzündungszellen und der glatten Muskelzellen in die Wunde zu erklären (Bendeck, Irvin et al. 1996; Strauss, Robinson et al. 1996; Witte, Thornton et al. 1998). Diese negativen Effekte der MMP-Blockierung mögen im ersten Moment paradox erscheinen, weil durch eine Hemmung der MMP's die Degradation der Matrix und somit ein Schutz des gesamten Gewebeverbandes zu erwarten ist. Jedoch ist eine verminderte Migration der Entzündungszellen sowie der Myofibroblasten in bestimmten Stadien der Wundheilung als sehr ungünstig anzusehen, da eingewanderte Entzündungszellen vorhandene Nekroseareale phagozytieren müssen und Fibroblasten mit der Synthese von neuen Kollagenfibrillen, die an

dieser Stelle als Narbengewebe dienen, beginnen. Zudem regulieren die MMP's, wie bereits erwähnt, die Aktivität von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , TNF- α und IL-1 β (Gearing, Beckett et al. 1994; Schonbeck, Mach et al. 1998) und ziehen somit, bei reduzierter Aktivität, eine verminderte Synthese von neuem Kollagen nach sich (Narayanan, Page et al. 1989). Diese bereits gewonnenen Erkenntnisse machen es nachvollziehbar, dass eine Hemmung der MMP- Aktivität nach einem Myokardinfarkt nur bedingt oder nur in einigen zeitlichen Abschnitten der Infarktabheilung sinnvoll ist.

Zwei Studien haben bereits die Wichtigkeit von MMP-9 während der Infarkttheilung untersucht. In der ersten Studie haben Heymans et al. nachgewiesen, dass ein Mangel an MMP-9 in einem Mausmodell nach Myokardinfarkt die Wundheilung erheblich verlängert, eine verminderte Leukozyteninfiltration in das Gewebe und größere Restnekroseareale nach sich zieht (Heymans, Lutun et al. 1999). Zudem aber zeigte die Studie auch, dass ein gewisser Mangel an MMP-9 nach einem Infarkt die Gefahr der Ventrikelruptur, die dann vorrangig am zweiten Tag auftritt, auf ein Minimum reduziert. Gerade um diesen zweiten Tag herum wurden Spitzenkonzentrationen von MMP-9 im Herzmuskel nachgewiesen, was mit dem dazu einhergehenden Anstieg von Entzündungszellen wie Leukozyten und Makrophagen zu erklären ist, die die hauptsächlichen Produzenten der MMP-9 sind. In einer zweiten Studie konnten Ducharme et al. an einem Mausmodell aufzeigen, dass eine gezielte Ausschaltung von MMP-9 die Ventrikeldilatation nach einem Myokardinfarkt deutlich reduzieren kann (Ducharme, Frantz et al. 2000). Diese mildere Dilatation geht mit einer reduzierten inflammatorischen Immunantwort und einer geringeren Kollagenfehlordnung einher. Diese Erkenntnisse könnten neue Therapieansätze hinsichtlich der Faktoren bringen, die die Prognose des akuten Myokardinfarktes deutlich mitbestimmen. Die Ventrikelruptur einige Tage nach dem Ereignis, die Ventrikelaneurysmenbildung oder auch die Entstehung einer Herzinsuffizienz aufgrund einer zu starken LV-Dilatation sind ernst zu nehmende Probleme, die es auszuschalten gilt (Pfeffer and Braunwald 1990).

Interessanterweise wurden bereits Polymorphismen, welche auf die Promotoren von MMP-1, -3, -9 und -12 Einfluss haben, identifiziert (Ye 2000). Diese Polymorphismen stehen im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von kardiovaskulären Erkrankungen wie der KHK oder dem Aortenaneurysma (Zhang, Ye et al. 1999; Ye 2000). Die weiteren Untersuchungen der Expression von MMP's ergaben Unterschiede, die mit dem Auftreten von schwerwiegenden Komplikationen wie der Ventrikelruptur oder der Entstehung einer Herzinsuffizienz der Patienten nach einem Infarktereignis korrelierten. Damit ist klar, dass die

Infarktheilung sowie das LV-Remodeling bei den Patienten unterschiedlich stark ablaufen und somit auch geringfügig anders reguliert werden.

Weiterhin wurden Korrelationen des Serumlevels von TIMP-1 und der Ejektionsfraktionen sowie des LVESD's gefunden. Die Beobachtung, dass sich die MMP- und TIMP-Level im Serum nach dem Infarkt stark verändern und darüber hinaus mit hämodynamischen Parametern korrelieren, könnte in Zukunft die Möglichkeit offen legen, die Prognose der Patienten aufgrund der Interpretation dieser Parameter abzuschätzen (Hirohata, Kusachi et al. 1997; Kai, Ikeda et al. 1998).

1.5.1.6. TIMP-Regulation bei Herzkrankheiten

Die bisherige Studienlage zeigte in Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie einen Anstieg der MMP Aktivität und einem signifikanten Abfall der TIMP-1, -3 und -4 Aktivität, während die Expression von TIMP-2 unverändert blieb (Tyagi, Campbell et al. 1996; Li, Feldman et al. 1998; Thomas, Coker et al. 1998). Die funktionelle Rolle von TIMP-1 hinsichtlich der LV-Geometrie wurde in einem TIMP-1 Knockout-Mausmodell untersucht, mit dem Ergebnis, dass man einen signifikanten Unterschied in der LV-Masse (38%) als auch im LVEDD (18%) nach 4 Monaten fand. Daher liegt es nahe, dass ein gewisser Schutz durch die Anwesenheit von TIMP-1 im Herzmuskelgewebe ausgehen muss, welcher die Degradation von Kollagen verhindert und somit die normale Ventrikelstruktur aufrechterhält, als auch die LV-Dilatation aufzuhalten vermag (Roten, Nemoto et al. 2000). Auch in einem Myokardinfarkt-Mausmodell wurde die Funktion von TIMP-1 näher untersucht. Nach dem Infarkt ereignis wurde durch Virusgenom eine TIMP-1 Überexpression verursacht und daraufhin eine verminderte Leukozyteneinwanderung, größere persistierende Nekroseareale, weniger Neovaskularisationen und eine verminderte Kollagenneubildung im Infarktreal beobachtet. Damit ist gezeigt worden, dass eine Überexpression von TIMP-1 die Infarktheilung stark verzögert und zugleich das Risiko von schwerwiegenden Komplikationen wie die Ventrikelruptur mindert. In dieser Studie erlitten 30% der Kontrolltiere ohne TIMP-1 Überexpression eine LV-Ruptur (Heymans, Lutun et al. 1999). Diese Studien zeigen zusammen, dass TIMP-1 ein sehr wichtiger endogener Inhibitor der myokardialen MMP's ist.

1.5.1.7. MMP-Inhibitoren als neuer Therapieansatz

Die positiven Effekte der MMP-Hemmung auf die LV-Dilatation in den verschiedenen Tierstudien verleiten dazu, künftig solche als festes Therapiekonzept für Patienten mit einem erlittenen Herzinfarkt zu etablieren. Möglicherweise könnte auch bei chronischen Prozessen

wie der Myokarditis oder der DCMi eine gewisse Hemmung der MMP-Aktivität von Nutzen sein. Doch bevor daran zu denken ist, müssen mehrere Punkte viel intensiver beleuchtet werden, um einen möglichst positiven Effekt zu erhalten und das Risiko negativer Resultate zu minimieren. Zum einen sollte das gesamte Ausmaß der MMP-inhibitorischen Behandlung auf die Herzfunktion genau untersucht sein. Weiterhin die Vor- und Nachteile einer kurz- oder längerfristigen MMP-Hemmung dargelegt sowie mögliche Fehlerquellen bei der Übertragung von murinen Studienergebnissen auf den Menschen ausgeschlossen werden.

Ferner müssen genauer die Vor- und Nachteile einer selektiven gegenüber der unselektiven (*broad-range inhibition*) MMP-Blockade verglichen werden.

Es ist bereits mehrfach nach alleiniger Genausschaltung von MMP-9 im Mausmodell eine deutliche Reduktion der LV-Dilatation nach einem Myokardinfarkt aber auch eine verminderte Rupturgefahr des linken Ventrikels beschrieben worden (Spinale, Coker et al. 1999; Ducharme, Frantz et al. 2000). Aber auch die negativen Eigenschaften einer solchen MMP-Inhibierung auf andere Organsysteme, wie zum Beispiel dem muskuloskelettalen System, wie es in einer Studie unter der Behandlung mit Marimastat beschrieben wurde, müssen näher untersucht werden (Drummond, Beckett et al. 1999).

Es ist jedoch sicher, dass die Entwicklung von selektiven MMP-Inhibitoren für alle Arten von MMP's eines der größten Projekte der Pharmaindustrie in den nächsten Jahren sein wird, bis jedoch damit eine etablierte Therapie begonnen werden kann, ist es sicherlich noch ein langer Weg.

1.6. Herleitung der Aufgabenstellung

Die dilatative Kardiomyopathie ist eine der häufigsten Herzmuskelerkrankungen und führt oftmals zu einer Transplantationspflichtigkeit, da die Therapiekonzepte aufgrund der zum Teil unverstandenen Ätiopathogenese häufig nur symptomatisch und nicht kausal erfolgen können. Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, die zur Dysbalance im System der Degradationsenzyme führen können. Dazu gehören unter anderem Zytokine, Neurohormone, aber auch mechanische Einflußfaktoren. Die Disparität der matrixregulierenden Enzyme bei dem Krankheitsbild der DCM sowie der Myokarditis wurde bereits an mehreren Tiermodellen untersucht und publiziert.

Der Einfluss einer chronischen Entzündungsreaktion auf den Umbau der EZM ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt, obwohl bei bis zu 50% der Patienten mit einer DCM entzündliche Infiltrate im Myokardgewebe nachgewiesen werden. Inwieweit jedoch die chronische Entzündungsreaktion über den Weg der Zytokinregulation dazu beiträgt, soll

Gegenstand dieser Studie sein. Dazu wurden rechtsventrikuläre Myokardbiopsien aufgearbeitet und Serumproben von den Patienten gewonnen.

Zum besseren Verständnis der Genese der dilatativen Kardiomyopathie sowie der damit einhergehenden Kollagen Degradation durch die Komponenten des MMP-TIMP-Systems versucht die Studie folgende Fragen zu klären:

1. Welchen Einfluss hat die myokardiale Entzündungsreaktion, wie sie bei der inflammatorischen Kardiomyopathie zu finden ist, auf die Regulation des MMP-TIMP-Systems und das damit einhergehende Remodeling der extrazellulären Matrix?
2. In welchem Zusammenhang stehen die an der myokardialen extrazellulären Matrix stattfindenden Umbauvorgänge mit der Pumpfunktion des Herzens?
3. Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede zeigen sich hinsichtlich des kardialen Remodelings sowie der Dysregulation im MMP/TIMP-System zwischen den beiden Krankheitsentitäten der DCM/DCMi und des akuten Myokardinfarktes?
4. Wie lassen sich die im Serum bestimmten Zytokinlevel im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie und beim Myokardinfarkt in Zusammenhang mit den Matrixdegradationsenzymen und den hämodynamischen Parametern der Herzen bringen?
5. Sind einige der von uns benutzten Serummarker in Zukunft möglicherweise in der klinischen Routinediagnostik einsetzbar? Können diese Marker für prognostische Aussagen hinsichtlich des Krankheitsprozesses herangezogen werden?

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Auflistung aller benötigten Arbeitsgeräte dieser Studie mit Modellbezeichnung und Bezugsquelle bzw. Herstellerfirma.

<u>Arbeitsgerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezug</u>
250° Ofen		Heraeus
Autoklaviergerät		Hartmann
Betriebssystem	Windows 2000 Professional	Microsoft
Computer	Pentium III	Asus
Computer	Nikon P90	Nikon
Tintenstrahldrucker	Epson D870	Epson
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Elektronische Waage	TE 214S	Sartorius
Präzisionswaage		Sartorius
Kühlschrank -20°C	Economic super	Bosch
Kühlschrank 4°C	Cooler	Bosch
Kühltruhe -80°C		
Magnetrühr- und Erwärmungsplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik
Mikrowelle	Microwave 800	Severin
Netzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick
Polarisationsmikroskop	Nikon Eclipse E600 Pol	Nikon
Mikroskop	Leitz DMRBE	Leica
Auswertungsprogramm	Lucia G 3.51a	Laboratory Ing.
Pipetten	Reference	Eppendorf
Schüttler	SM25	Edmund Bühler
SPSS 11.0	Statistical Package for the Social Sciences	
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf

Vortexgerät	MS-2 Minishaker	IKA-Labortechnik
Zentrifuge	Varifuge 3.0	Heraeus
Heizplatte	Hotplate magnetic Stirrer	Cenco Instrument MU
Elisareader	Sunrise RC-TC	Tecan
Bio-Plex Microplate Shaker	Model 4625	Bio-Rad
Bio-Plex Vacuum Pumpe	Aurum Vacuum Manifold	Bio-Rad
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf
Spitzen für Multipipette	Ritips	Eppendorf
Tube-Misch-Rotator	Multi-Axlr Rotator A257	Denley Instr. LTD.
Objektträger	76x26mm/3x1 inch	R.Langenbrinck
Deckgläser	24x50mm	Menzel-Glaser
Inkubator	Feuchtinkubator für Histologiefärbungen	Nalgene

2.1.2. Kits und Antikörper

Tabelle 2: Auflistung der für die Studie verwendeten Antikörper und Elisa-Kits mit Chargennummer und Bezugsquelle bzw. Herstellerfirma.

Assay bzw Antikörper	Bezeichnung/Nr.	Bezug
Human anti - MMP-2	AB19167	Chemicon
Human anti - MMP-3	MAB13412	Chemicon
Human anti - MMP-9	IM61	Calbiochem
Human anti - TIMP-1	IM63	Calbiochem
Human anti - TIMP-4	AB19168	Chemicon
Human Acitivity Assay System MMP-1 Biotrak	RPN 2629	Amersham
Human Acitivity Assay System MMP-3 Biotrak	RPN 2639	Amersham
Human Activity Assay System MMP-9 Biotrak	RPN 2634	Amersham
Human Biotrak System TIMP-1	RPN 2611	Amersham
Uni Q – ICTP EIA	Cat.N.05892	Orion Diagnostica/Matritech

UPA-Human Assay		Chemicon
Bio-Plex Cytokine Assay		Bio-Rad Laboratory, Inc.

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Auflistung der für die Studie verwendeten Chemikalien und Reagenzien, mit vollständiger Bezeichnung und der Bezugsquelle bzw. Herstellerfirma.

Name/Abkürzung	vollständiger Name	Bezug
Flaschenwasser	Aqua dest.	B.Braun
Aceton	pro analysis	Merck
Ethanol absolut	pro analysis	Merck
Wasserstoffperoxid 30%	H ₂ O ₂ 30%	Merck/VWR
NaCl	Natriumchlorid	Merck/VWR
Envision Zweitantikörper	Envision anit-Rabbit und anit-Mouse + HRP	Dako
Xylol		T.J.Baker
Hämalaun		VWR
Tissue Tec		Sakura
Carbazol	3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma
Glyceringelatine	Kaiser´s Glyceringelatine für die Mikroskopie	Merck/VWR
N,N-Dimethylformamid		Merck
Essigsäure		Merck/VWR
Envision Zweitantikörper	Envision anti-Rabbit + HRP	Dako
PBS Dulbecco		PAA
Sirius Red	Sirius Red Farbstoff	Polysciences Inc.
Corbit-Balsam	Zum Eindeckeln	I.Hecht
Natriumacetat		
Pikrinsäure		Merck
HCL		
FCS		

2.2. Das Patientenkollektiv

2.2.1. Einteilung der Gruppen

Da die Studie einen Vergleich hinsichtlich des EZM Remodelings bei Patienten mit einer DCM und einer inflammatorischen Kardiomyopathie näher untersuchen soll, wurden retrospektiv aus einer Datenbank die für die jeweilige Gruppencharakteristik definierten Patienten herausgesucht. Das Serum sowie die Biopsien der Patienten lagerten in dafür vorgesehenen Tubes bzw. Behältern bei einer Temperatur von -80°C .

Für die im Rahmen der Studie geplanten Versuche wurden vier Gruppen definiert und in den Versuchen gegenübergestellt:

Die erste, altersmäßig sehr homogene Gruppe, bestand aus 26 klinisch gesunden Blutspendern (SK-Gruppe), die als Kontrollgruppe für die Serumversuche zur Verfügung stehen sollte. Bei allen Blutspendern wurden vorab anamnestisch floride Infektionen, Herzerkrankungen, Malignomkrankungen, Stoffwechsel- sowie Leber-, Nieren- und Knochenstoffwechselerkrankungen ausgeschlossen.

Die folgenden beiden Gruppen bestanden aus einem großen Kollektiv von Patienten mit der gesicherten Diagnose einer dilatativen Kardiomyopathie. Unterschieden wurden sie in eine Gruppe mit einer DCM ohne Inflammation und in einer Gruppe mit inflammatorische Kardiomyopathie (DCMi). Erstere bestand aus 20 Patienten, die zweite aus 29. Beide DCM-Gruppen mussten klinisch über eine manifeste Herzinsuffizienz mit pathologisch verschobenen hämodynamischen Parametern verfügen. Zwischen den beiden Gruppen sollte es hinsichtlich der kardialen Pumpeigenschaften keine signifikanten Unterschiede geben. Um das zu gewährleisten, sollte die Ejektionsfraktion bei beiden Gruppen unter 45% liegen, wobei der Mittelwert nicht wesentlich differieren sollte. Ferner sollte der LVEDD mindestens 60 mm betragen, damit per definitionem eine Dilatation des Ventrikels vorliegt, und letztlich der LVEDP über 10 mmHg betragen. Nebenerkrankungen, wie sie bereits bei der Blutspendergruppe ausgeschlossen wurden, sollten hier ebenfalls nicht vorliegen. Kardiomyopathien, die nach der Definition der Kardiomyopathien von 2006 nicht zu den Kardiomyopathien unbekannter Ursache gerechnet werden können, wurden schon im Vorfeld durch das diagnostische Spektrum herausgefiltert. Hierzu zählen solche Kardiomyopathien, bei denen sich eine Ursache eruieren lässt (Cor hypertensivum, hämodynamisch relevante Vitien und die Koronare Herzkrankheit).

Eine vierte Gruppe, die nur im Rahmen der Serumversuche als Positivkontrolle agieren soll, setzt sich aus 10 Patienten zusammen, die sich am Tag vier nach stattgehabtem

Myokardinfarkt befinden. Voraussetzung für den Einschluss in die Gruppe war ein mindestens einmaliges Aufweisen einer Serum-Creatinkinase von minimal 800 U/l im Krankheitsverlauf, um eine bestimmte Größe des Infarktareals zu gewährleisten. Auch diese Patienten wiesen anamnestisch keine der oben genannten Nebenerkrankungen auf, die Einfluss auf den Kollagenstoffwechsel nehmen können. Für diese Gruppe liegen uns zwar hämodynamische Daten vor, welche jedoch lediglich zum Vergleich dienen sollten und sich in keinem vorgegebenen Rahmen bewegen mussten.

Die Serumversuchsreihen wurden mit allen vier Gruppen durchgeführt und anschließend statistisch ausgewertet. Die histologischen Versuchsreihen konnten aus ethischen Gründen nur an der DCM- und der DCMi-Gruppe durchgeführt werden.

Alle Patienten hatten entsprechend dem Ethikvotum für den SFB eine Einverständniserklärung unterzeichnet, womit zusätzliche Untersuchungen an Blut, Serum und Herzmuskelprobenmaterial vorgenommen werden konnten, welches nach der klinisch notwendigen Diagnostik noch zur Verfügung stand.

Tabelle 4: Darstellung der vier Patientengruppen unserer Studie. Die hämodynamischen Werte wurden lediglich von den beiden DCM-Gruppen bestimmt. Die Werte der Kontrollgruppe stehen in Klammern und kennzeichnen die Grenzen von nicht pathologisch veränderten hämodynamischen Werten gesunder Personen (siehe Anmerkung).

Gruppe	Kontrollgruppe	DCM	DCMi	AMI
Anzahl (n)	n=26	n=20	n=29	n=10
Alter	44,88±1,84	51,45±3,15	48,48±2,39	61,5±3,49
Geschlecht (w/m)	3/23	7/13	7/22	1/9
EF%	(>70)	<=45	<=45	-
LVEDD mm	(<56)	>=60	>=60	-
LVEDP mmHg	(<10)	>10	>10	-
CD3- Zellen/mm ²	(<7)	< 7	> 7	-

*Anmerkung: Die histologischen und hämodynamischen Werte der Kontrollgruppe wurden aus ethischen Gründen nicht ermittelt und werden von uns als Idealzustand gemutmaßt, da diese Gruppe keinerlei klinische und anamnestische Anhaltspunkte einer Pumpschwäche gab. Des Weiteren wurden nicht von jedem Patienten der Herzinfarktgruppe konsequent alle

häodynamischen Daten erfasst, so dass hier eine statistische Auswertung gegen die beiden DCM-Gruppen möglich ist. Da es sich hier aber lediglich in Hinblick auf die Inflammation um eine Positivkontrolle handelt, ist die häodynamische Situation dieser Gruppe eher von untergeordneter Bedeutung.

Die statistischen Auswertungen der Gruppencharakteristika sind im Ergebnisteil zu finden.

2.3. Retrospektive Datenerhebung aus Patientenakten

2.3.1. Aktenstudium und Paraklinik

Vor Beginn der Studie wurden von den ausgewählten Patienten die Krankenakten angefordert, damit die oben genannten Zusatzerkrankungen aus den Anamnesebögen ausgeschlossen werden konnten. Zusätzlich diente das Aktenstudium dem weiteren anamnestischen und demographischen Informationsgewinn. Eine zusätzliche Befragung der Patienten war daher nicht mehr notwendig. Die Laborparameter des Krankenhausaufenthaltes während der Herzprobeentnahme wurden ausgewertet, um sicher zu gehen, dass alle Patienten zu diesem Zeitpunkt eine adäquate Nierenfunktion besaßen, keine periphere Hyper- oder Hypothyreose hatten, keine akute Lebererkrankung, welche die Transaminasen um ein Vielfaches erhöhen würde (leichte Transaminasenerhöhungen sind durchaus im Rahmen der Herzinsuffizienz mit hepatischer Rückstauung zu erklären) und auch keine anderen Stoffwechsel- oder Knochenerkrankungen aufwiesen.

2.3.2. Medikation

Weiterhin wurde zum Biopsiezeitpunkt die aktuelle Herzinsuffizienzmedikation dokumentiert (Beta-Blocker, ACE-Hemmer oder AT1-Antagonisten, Diuretika, Spironolacton, Digitalis).

Vor der Entnahme der Biopsien wurden die Patienten routinemäßig mehreren kardiologischen Untersuchungen zugeführt. Dazu gehörte nach den engmaschigen Blutentnahmen eine Ruhe-EKG, eine Echokardiographie, eine Linksherzkatheteruntersuchung mit Laevographie und Koronarangiographie, zum Ausschluss einer Koronaren Herzkrankheit. Danach erst erfolgte die Rechtsherzkatheteruntersuchung mit mehreren Probeentnahmen aus der rechtsventrikulären Septumwand. Alle Untersuchungsergebnisse zusammen wurden zur Einschätzung der linksventrikulären Pumpeinschränkung herangezogen. Somit konnten Erkrankungen wie die Koronare Herzkrankheit, ein häodynamisch bedeutsames Vitium oder ein Cor hypertensivum als Ursache für die dilatative Kardiomyopathie ausgeschlossen werden.

2.4. Datenerhebung im Rahmen der klinischen Diagnostik

2.4.1. Ruhe - EKG

Als Standarduntersuchung bei Aufnahme auf eine kardiologische Station wurde ein 12-Kanal –Ruhe- EKG durchgeführt, die Brustwandableitungen nach Goldberg und die Extremitätenableitungen nach Einthoven. Hiermit konnten Aussagen über den Herzrhythmus, Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen sowie über Repolarisationsstörungen gemacht werden. Besonderes Augenmerk wurde auf das Auftreten von Vorhofflimmern, ventrikulären Extrasystolen, Schenkelblöcken und ST-Strecken-Veränderungen gelegt.

2.4.2. Echokardiographie in Ruhe

Die Echokardiographie ist eine nichtinvasive Untersuchungsmethode, bei der mittels sonographischer Technik die Anatomie und Funktion des Herzens beurteilt werden kann. Bei dieser Untersuchung interessieren vorrangig die Ausmaße der Herzhöhlen. Hierzu wurde der Linksventrikuläre Enddiastolische Durchmesser (LVEDD) und der Linksventrikuläre Endsystolische Durchmesser (LVESD) vermessen und in Millimetern angegeben. Voraussetzung für den Einschluss in die DCM- bzw. DCMi-Gruppe war ein LVEDD von größer gleich 60 mm. Des Weiteren wurde die Ejektionsfraktion (EF %) nach Simpson bestimmt und der Klappenapparat genau beurteilt, um ein Klappenvitium ausschließen zu können.

2.4.3. Linksherzkatheteruntersuchung

Im Rahmen der Linksherzkatheteruntersuchung wurde Kontrastmittel in den linken Ventrikel (Laevographie) und in die Koronararterien (Coronarangiographie) injiziert. Dadurch konnten hämodynamisch wirksame Stenosen der Koronargefäße und somit eine Koronare Herzkrankheit als Ursache der DCM ausgeschlossen werden. Mittels Laevographie konnten hämodynamisch wirksame Ventildefekte erkannt und ausgeschlossen werden, die Ejektionsfraktion planimetrisch bestimmt werden und der Linksventrikuläre Enddiastolische Druck (LVEDP in mmHg) angegeben werden.

2.4.4. Rechtsherzkatheteruntersuchung mit Probeentnahmen

Bei der Rechtsherzkatheteruntersuchung kann mittels Einschwemmkatheter eine Druckmessung im Niederdrucksystem erfolgen. So kann der pulmo-kapilläre Verschlussdruck (PCWP in mmHg) nach Okklusion der pulmonalarteriellen Strombahn über das distale Lumen

eines pulmonalarteriellen Katheters bestimmt werden. Weiterhin kann über die Thermodilutionsmethode das Herzzeitvolumen (HZV in l/min) erfasst werden und bezogen auf die Körperoberfläche wird der Cardiac Index (CI in l/min/m²) errechnet. Der Schlagvolumenindex (SVI) wird in Relation zum CI auf die Herzfrequenz ermittelt und in Litern pro Körperoberfläche (l/m²) angegeben.

Die Probeentnahmen werden transvenös an der rechtsventrikulären Septumwand entnommen und anschließend in Stickstoff bei – 200 °C eingelagert oder sofort für die Routinediagnostik aufgearbeitet. Zusätzlich werden bei der Katheteruntersuchung mehrere Serumröhrchen mit venösem Blut gefüllt, welches sofort nach der Abnahme über 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert wird. Das gewonnene Serum wird in Eppendorf-Tubes abpipettiert und bei – 80 °C bis zum weiteren Gebrauch eingelagert.

2.4.5. Routine - Immunhistologie

Die Endomyokardbiopsien wurden nach der Entnahme sofort im flüssigen Stickstoff bei -195 bis -210 °C eingelagert und bis zur Weiterverarbeitung dort belassen. Danach werden die Biopsiestücke, welche in Tissue-Tec eingebettet sind, am Kryostaten in mehrere ca. 5µm starke Scheiben geschnitten und auf Objektträger platziert. Für die klinische Routinediagnostik folgen nun die immunhistologischen Färbungen mittels monoklonaler Antikörper gegen Antigene der CD3-, CD4- und CD8-Zellen sowie aktivierte Makrophagen und die MHC-Moleküle V-CAM und I-CAM. Die zellulären Infiltrate wurden als statistisches Mittel pro Gesichtsfeld bei einer 400fachen Vergrößerung gezählt (*High Power field* = HPF). Die Auswertung erfolgte im Mäandermuster. Als pathologisch im Sinne einer intramyokardialen Entzündung wurden Biopsien gewertet, welche mehr als zwei CD3-, CD2-, CD8- Zellen oder aktivierte Makrophagen pro HPF bewertet, was einer Anzahl von 7/mm² bei 400facher Vergrößerung entsprach. Die Expression der MHC-Moleküle auf den interstitiellen Zellen wurde semiquantitativ mit der Abstufung Grad eins als normale und Grad zwei als verstärkte Immunreaktion evaluiert (Kuhl, Noutsias et al. 1995; Kuhl, Noutsias et al. 1996).

2.4.6. Molekularbiologie

Weiterhin wurden alle Endomyokardbiopsien molekularbiologisch ausgearbeitet und mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auf das Vorhandensein von viraler RNA untersucht. Routinemäßig wurde hierbei die Persistenz von Parvovirus B19, Coxsackievirus A und B, Adenovirus, Enterovirus, Humanes Herpes Virus 6 und Echoviren beurteilt. Das Vorhandensein von Virusgenom in den Biopsien und deren statistische

Verteilung innerhalb der beiden DCM-Gruppen war für unsere Studie nicht maßgeblich von Bedeutung und sollte deshalb an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden.

2.4.7. Paraklinische Daten

Die für unsere Studie relevanten Werte der Laborchemie waren das CRP, das pro-BNP, die Herzenzyme wie CK, CK-MB und das Troponin T. Zum Ausschluss einer Nierenfunktionsstörung wurde das Kreatinin im Serum bestimmt. Die Höhe der Transaminasen gaben Auskunft über eine Leberfunktionsstörung und das TSH zur Beurteilung der Schilddrüsenfunktion. Diese Laborparameter wurden vom Institut für Klinische Chemie im Klinikum Steglitz während der Routine bestimmt.

2.5. Zusätzliche Serumuntersuchungen im Rahmen der Studie

2.5.1. Serumelisa

Das Prinzip eines Elisa's (enzyme-linked immunosorbent assay) ist das Antikörper-Antigenprinzip, welches bei allen immunologischen Nachweisverfahren zum Tragen kommt. Die Ag-Ak-Reaktion basiert auf dem Schlüssel-Schloß-Prinzip, bei dem zu einem bestimmten Antigen nur ein bestimmter Antikörper passt, welcher letztendlich die Spezifität des Testes ausmacht. Jene monoklonalen Antikörper (Capture Antikörper) befinden sich in einer Vielzahl an der Wand des jeweiligen Well's, in welches zu Testbeginn dann das Serum in reiner oder verdünnter Form hinzugegeben wird. Danach beginnt die Antikörper-Antigen-Reaktion, welche je nach Elisatyp nach einer gewissen Zeitspanne gestoppt wird. Bei jedem Elisa läuft generell eine Standardreihe in Doppelbestimmung mit, bei der das zu bestimmende Antigen in Reinstform in einer Verdünnungsreihe mit Negativkontrolle in die Well's pipettiert wird. Die Standardreihe macht Aussagen darüber, ob der Elisa wie gewünscht auf die Antigene reagiert und man berechnet später mit Hilfe der Standardkurve die gesuchte Proteinmenge in den Well's mit dem Patientenserum. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, empfiehlt es sich, die Inkubationszeit nicht zu lang zu wählen und darüber hinaus wird die Platte nach der ersten Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem speziell mitgelieferten Waschpuffer mehrmals gewaschen und ausgeklopft. Nach diesem Schritt wird nach dem Sandwichprinzip ein zweiter enzymmarkierter Antikörper (meist Biotin als Enzym) auf die Platte gegeben, welcher sich an den bereits gebundenen Antigenen an jedoch einem anderen Epitop anlagert. Danach wird ein Substrat (HRP – Avidin-Horseradish-Peroxidase) und Chromogen dazugegeben, welche durch das Enzym an dem

enzymmarkierten Zweitantikörper umgesetzt werden. Darunter ist eine Farbreaktion zu beobachten, welche mit ihrer Intensität proportional zum ursprünglich gebundenen Antigen ist. Bei der abschließenden fotometrischen Messung im Elisa-Reader wird die Farbintensität einer für den jeweiligen Elisa vorgegebenen Wellenlänge gemessen und mit Hilfe eines Softwareprogrammes und der bekannten Proteinmenge der Standardkurve die gesuchte Proteinmenge der anderen Well's errechnet.

Da es für die Errechnung eines validen Ergebnisses wichtig ist, dass sich die Rohdaten der Patienten nicht über dem höchsten Wert bzw. unter dem kleinsten Wert der Standardkurve befinden, müssen die Patientenseren idealerweise so verdünnt werden, dass sich die Rohdaten im Umfang der Standardkurve wiederfinden. Abhängig vom Elisatyp kamen sehr unterschiedliche Verdünnungen zum Einsatz. Verdünnt würde mit Assaypuffer (MMP-1, -3, -9 und TIMP-1) oder mit NaCl 0,9% (ICTP). Der Assaypuffer war als vorgefertigtes Konzentrat im Zubehör des Elisas enthalten und konnte in einer vorgegebenen Verdünnung mit 0,9% NaCl gemischt werden und war somit dann gebrauchsfertig.

Tabelle 5: Kurzübersicht über die von uns verwendeten Serumelisa mit etablierter Serumverdünnung und zu verwendender Verdünnungssubstanz.

Elisa	Verdünnung der Seren	Ausnahmen	Verdünnungssubstanz
MMP-1	1:10		Assay-Puffer
MMP-3	1:8		Assay-Puffer
MMP-9	1:50 (DCM/DCMi)	1:100 (AMI und Kontrollen)	Assay-Puffer
TIMP-1	1:40 (DCM/DCMi)	1:50 (AMI oder hochexpremierte DCM/DCMi-Seren)	Assay-Puffer
ICTP	1:2		NaCl
UPA	unverdünnt		keine

2.5.1.1. Human Activity Assay MMP-1, -3 und -9

Die Assay's für den Nachweis der Matrixmetalloproteinasen -1, -3 und -9 im Serum werden bereits „gecoated“ geliefert, was bedeutet, dass der Capture Antikörper bereits in den Well's platziert ist. Es wird eine Standardreihe mit dem Reinstantigen und einer Negativkontrolle

vorbereitet und das Patientenserum in einer zuvor etablierten Verdünnung angesetzt. Der Verdünnungsfaktor ist für jeden Assay etwas unterschiedlich etabliert. Nach dem Auftragen der Proben und der Standardreihe auf die Platte folgt eine Inkubation bei 4°C über Nacht, in der die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfinden kann. Am nächsten Tag folgt der Waschschritt um möglichst alle unspezifischen Bindungen herauszuwaschen. Danach wird das Detektionsreagenz vorbereitet, welches den Zweitantikörper mit dem Enzym sowie Substrat und Chromogen enthält. Zusätzlich bietet der Assay die Möglichkeit bei Zugabe von Assaypuffer lediglich alle aktivierten MMP's oder alternativ nach Zugabe von APMA (p-Aminophenylmercuric Acetate) die inaktiven MMP's zu aktivieren und somit die aktiven und inaktiven als Gesamt-MMP's zu bestimmen. Nach Zugabe des Detektionsreagenz' und des APMA's bzw. des Assaypuffers wird die Extinktion fotometrisch zum Zeitpunkt t₀ (Beginn der Reaktion) und nach einer Reaktionszeit von 2 bis 4 Stunden (abhängig vom Elisatyp und der zu erwartenden MMP Menge) nochmals zum Zeitpunkt t_E ermittelt. Diese Rohdaten werden dann mit Hilfe eines Softwareprogramms so verarbeitet, dass die Ergebnisse für jeden Patienten in ng/ml ausgegeben werden. In die Berechnung fließt der Verdünnungsfaktor, die Inkubationszeit und die fotometrische Anfangs- und Endmessung mit ein.

2.5.1.2. TIMP-1 Human Assay

Der TIMP-1 Elisa unterscheidet sich in zwei wesentlichen Punkten von den MMP-Elisa. Erstens kann man nicht in aktive und inaktive TIMP-1-Moleküle unterscheiden, sondern misst den Gesamtgehalt der TIMP's im Serum. Zweitens ist es nicht notwendig die erste Inkubationszeit über Nacht laufen zu lassen, sondern verkürzt hier auf zwei Stunden bei Raumtemperatur. Der weitere Verlauf des Assays folgt dem gewohnten Schema wie oben beschrieben. Die fotometrische Messung erfolgt hier nur einmal am Ende der Reaktion nach Substratzugabe.

2.5.1.3. ICTP Human EIA

ICTP wird als trivalent quervernetztes Peptid beim Abbau von Kollagen Typ I freigesetzt. Das Prinzip des Testes ist der des quantitativen kompetitiven Enzymimmunoassays, was bedeutet, dass eine bekannte Menge an Peroxidase-markiertem ICTP mit einer unbekanntem Menge an nicht markiertem ICTP in der Probe um die limitierten Mengen vorhandener Bindungsstellen des Capture-Antikörpers konkurrieren. Ein zweiter, gegen den Primär-AK gerichteter und an die Festphase gebundener AK reagiert mit dem Komplex aus Primär-AK und Antigen und ermöglicht dadurch eine saubere Trennung von gebundenem und nicht

gebundenem Antigen. Nachdem das nicht gebundene Antigen dann ausgewaschen wurde, ist die Menge an markiertem ICTP in der Kavität umgekehrt proportional zur Menge an ICTP in der Probe. Die Menge an markiertem ICTP wird nach Inkubation mit dem Substrat auf einem Schüttler gemessen, wobei wiederum eine Farbreaktion abläuft, die schließlich als Endprodukt gemessen wird. Die ICTP-Konzentration der einzelnen Proben wird anschließend mit einer Software anhand der Standardkurve ermittelt.

2.5.1.4. UPA-Activity Assay

Beim uPA (Urokinase-type Plasminogen Activator) handelt es sich um eine Serinprotease, welche durch die Bindung an einen membranständigen Rezeptor aktiviert wird. Weiterhin wird seine Aktivität auch durch Cathepsin B und L getriggert. Die Aufgabe von uPA ist die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, welches wiederum die Matrixmetalloproteasen zu aktivieren vermag.

Das Assay-Prinzip besteht daraus, dass chromogenes Substrat, welches gleich zu Beginn mit der unbekanntem Serumprobe, Aqua dest. und Assay-Puffer in die Kavität pipettiert wird, durch das aktive uPA gespalten wird. Somit entsteht eine Farbreaktion, die proportional zur uPA Quantität in der Probe ist. Die Inkubationszeit beträgt 10 min. bei 37°C.

2.5.1.5. Bio-Plex Cytokine Assay

Der Zytokin-Assay von Bio-Plex eignet sich dazu, mit einer sehr geringen Probenmenge und in sehr kurzer Zeit ein komplettes Zytokinprofil des Patienten zu erstellen. Realisiert wird dies durch den Einsatz von so genannten Beads, welche mehrere Bindungsstellen für die jeweiligen Zytokine aufweisen. Von den unterschiedlichen Beads werden in einem Assay genau so viele zum Einsatz kommen, wie Moleküle gemessen werden sollen. Jedes Bead reagiert dann spezifisch mit einem Antigen/Zytokintyp, an welches es kovalent bindet. Zusätzlich wird wieder eine Standardreihe in Doppelbestimmung und Negativkontrolle mitgeführt, um anhand dieser die Konzentration der jeweiligen Proben zu berechnen. Der restliche Ablauf ist denen anderer Assay's ähnlich. Unspezifisch gebundene Proteine werden mittels mehrerer Waschschriffe entfernt, wobei jedoch diese Platte mit einem speziellen Absaugsystem gereinigt wird. Danach werden biotinylierte Zweitantikörper auf die Platte gegeben, die spezifisch an ein anderes Epitop des gleichen Antigens binden. Ein Reaktionsdetergenz aus Streptavidin-Phycoerythrin ist schließlich für die Farbreaktion verantwortlich, welche ihre Intensität proportional zur Quantität der Zytokine einstellt. Ein Cytometer-Flow-Laser misst die Extinktion und die Bio-Plex -Software berechnet anhand

dieser mit Bezug auf die Standardkurve das jeweilige Zytokinprofil in der Probe. Das Zytokinprofil des von uns verwendeten Assay bestand aus acht verschiedenen Zytokinen: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GMCSF, Inf- γ und TNF- α .

2.5.2. Zusätzliche histologische und immunhistologische Färbungen an endomyokardialen Gewebeschnitten im Rahmen der Studie

2.5.2.1. Sirius-Red-Färbung

Die Sirius-Red-Färbung dient zum ubiquitären Anfärben der Kollagenfaser, welche dann im polyspektralen Licht sichtbar gemacht werden können. Für den Färbeprozess werden die Gefrierschnitte fünf Minuten in Aqua dest gespült und dann eine Stunde in einer Sirius-Red - Färbelösung inkubiert. Diese Färbelösung enthält außer 1g Sirius-Red-Farbstoff auch 12g Pikrinsäure in 1000ml Aqua dest gelöst. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 2,0. Nach der Inkubation werden die Schnitte in einer prozentual aufsteigenden Alkoholreihe (2 min in 90% Ethanol, dann 2x2 min in 100% Ethanol) gewaschen und für 2x5 min in Xylol inkubiert, welches den Alkohol herauswäscht. Das Eindecken und Haltbarmachen erfolgt mit Corbitbalsam.

Die Auswertung erfolgt am Polyspektralmikroskop mit einer Computersoftware (Lucia G). Ausgewertet wird der ganze Schnitt ohne Artefakte und Freiflächen. Das angefärbte Kollagen wird schließlich vom Computer als Area-Fraction berechnet (Area-fraction = der durchschnittliche Kollagengehalt in % einer Biopsie gemessen an der Gesamtfläche). Das Ergebnis stellt den Fibrosegrad des Gewebes dar.

2.5.2.2. Immunhistochemische Färbungen

Für die spezielle Immunhistochemie verwendeten wir monoklonale Antikörper gegen MMP-2, -3, -9, TIMP-1 und TIMP-4. Jeder Antikörper wurde zuvor in einer für ihn optimalen Verdünnung etabliert (siehe Tab.).

Tabelle 6: Übersicht über die zur immunhistochemischen Anfärbung verwendeten Antikörper (Firma und Chargennummer), ihrer gebräuchlichen Verdünnung und des notwendigen Zweitantikörpers.

Antikörper	Firma	Spezies	VDG	2.AK	Spezies	VDG
MMP-2	Chemicon AB19167	Rabbit	1:75	EnVision	Anti Mouse und Rabbit	gebrauchsfertig

MMP-3	Chemicon MAB13412	Mouse	1:20	EnVision	Anti Mouse und Rabbit	gebrauchsfertig
MMP-9	Calbiochem IM61	Mouse	1:40	EnVision	Anti Mouse und Rabbit	gebrauchsfertig
TIMP-1	Calbiochem IM63	Mouse	1:50	EnVision	Anti Mouse und Rabbit	gebrauchsfertig
TIMP-4	Chemicon AB19168	Rabbit	1:40	EnVision	Anti Mouse und Rabbit	gebrauchsfertig

Nach dem Auftauen der Objektträger umrandet man die Schnitte mit einem Diamantkratzer oder einem Fettstift, damit, falls man zwei Antikörper auf einem Objektträger färben möchte, die Antikörperverdünnungen nicht ineinander verlaufen. Danach werden die Schnitte für fünf Minuten an das Puffermilieu in 1xPBS gewöhnt. Mit dem nächsten Schritt wird die endogene Peroxidase blockiert. Dazu müssen die Schnitte 5 Minuten in 0,075% H₂O₂ auf dem Schüttler inkubieren. Anschließend wird das H₂O₂ mit dem 25xPBS aus den Schnitten gewaschen. Der Erstantikörper wird nun in der oben aufgezeigten Verdünnung in einem Gemisch aus 1xPBS und 10%-FCS auf die jeweiligen Schnitte aufgetragen und in einer Feuchtkammer ca. eine Stunde lang inkubiert. Der Schnitt wird danach in 1xPBS für 2mal fünf Minuten gewaschen, damit unspezifische Bindungen herausgewaschen werden. Der Zweitantikörper (EnVision) ist bereits gebrauchsfertig und wird so auf die Schnitte pipettiert und wiederum in einer Feuchtkammer für ca. 30 Minuten inkubiert. Die Feuchtkammer dient zum Schutz gegen das Austrocknen der Schnitte während der Inkubation. Es folgt ein anschließender Waschschritt und dann wird die Peroxidase des 2.AK mit einer Carbazolmischung sichtbar gemacht. Diese besteht aus 50 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), 10 ml N,N-Dimethylamid (Salz der Ameisensäure in Alkohol gelöst), 15 ml Essigsäure, 35 ml 0,2 M Natriumacetat und 100 µl 30% H₂O₂, alles auf 200 ml Aqua dest. Nach 12 Minuten Inkubation im Dunkeln auf einem Schüttler wird nochmals gewaschen und dann eine Kernfärbung in Hämalaun über vier Minuten durchgeführt. Die Schnitte werden sechsmal mit kaltem, dann zehn Minuten unter heißem Leitungswasser gespült und dann mit flüssiger Glyceringelatine eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgt am Mikroskop mit einer Computersoftware (Lucia G). Die Schnitte werden komplett mit dem Mikroskop abgearbeitet, wobei jedoch Artefakte, Ränder und Leerräume ausgeschnitten werden. Die Software errechnet einen Mittelwert für den jeweiligen Schnitt in Objekte/mm². Vorteil dieser computermodifizierten Auswertung ist ein

objektiveres Ergebnis und damit eine sehr geringe „Interobserver-Variabilität“. Um mögliche Fehlerquellen so gering wie möglich zu halten, wird jeder Objektträger zweimal ausgewertet.

2.6. Statistische Methoden

Um Ergebnisse als statistisch signifikant zu deklarieren muss ein durch Zufall zustande gekommenes Ergebnis ausgeschlossen werden. Um dies zu gewährleisten sind statistische Testverfahren unerlässlich. Für die hier angewendeten Testverfahren wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $\leq 0,05$ als signifikantes Ergebnis gewertet, wobei jeweils das genaue Signifikanzniveau als p-Wert ausgegeben wurde. P-Werte größer als 0,05 werden als nicht signifikant (n.s.) angesehen.

2.6.1. Auswertung der Daten

Die Auswertung erfolgte mit einem SPSS-Programm, Version 11.0. Für die Auswertung der Signifikanzen zwischen den Gruppen ist der Man-Whitney-U Test angewendet worden. Lediglich bei der statistischen Auswertung der unterschiedlichen Medikamentengabe zwischen den Gruppen ist der fishers-exact-test benutzt worden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind im Ergebnisteil in den jeweiligen Tabellen und für jeden Versuch als Balkendiagramm dargestellt. Signifikante Ergebnisse sind in der Tabelle zusätzlich mit einem „*“ gekennzeichnet und im Balkendiagramm mit einer Spange und einem „*“, die zwei Gruppen mit signifikantem Unterschied bei einem Versuch verbindet.

2.7. Ethikvotum

Entsprechend der Versuche im Rahmen des SFB-Projektes (Sonderforschungsbereich) bestand ein Ethikvotum. Alle Patienten hatten entsprechend dem Ethikvotum für den SFB eine Einverständniserklärung unterzeichnet, womit zusätzliche Untersuchungen an Blut, Serum und Herzmuskelprobenmaterial vorgenommen werden konnten, welches nach der klinisch notwendigen Diagnostik noch zur Verfügung stand.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studie werden im folgenden Ergebnisteil dargestellt. Alle Ergebnisse der Studie wurden durch die oben beschriebenen statistischen Testverfahren abgesichert. Die Voraussetzungen für die Anwendung der statistischen Testverfahren wurden im Vorfeld alle erfüllt.

3.1. Das Patientenkollektiv

3.1.1. Demographische Datenlage

Das für die Studie verwendete Patientenkollektiv wurde anfangs hinsichtlich der demographischen Daten überprüft um weitestgehend homogene Gruppen zu erhalten. Leichte Abweichungen beim Alter oder der Geschlechterverteilung ließen sich im Vorfeld nicht komplett ausschließen, da bei Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt die Alters- und Geschlechterverteilung stark von der DCM abweicht. Auch fällt das Kollektiv der Blutspender im Altersdurchschnitt jünger aus als das der DCM-/DCMi-Patienten. Wir führten diese Abweichung auf eine deutlich größere Spenderbereitschaft und auch Spendertauglichkeit in den jüngeren Altersgruppen zurück.

Insgesamt schlossen wir 26 Blutspender für die Serumversuche in die Studie ein. Die Positivkontrollen für die Serumversuche stellte die Gruppe der 10 Patienten mit einem Zustand am vierten Tag nach Myokardinfarkt (AMI) dar. Der Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe lag bei $44,88 \pm 1,84$ Jahren, der der Myokardinfarktpatienten bei $61,5 \pm 3,49$ Jahren. Somit unterschieden sich diese beiden Gruppen signifikant in ihrer Altersverteilung, was bei der Betrachtung der Daten berücksichtigt werden muss. Die Geschlechterverteilung (f/m) war 3/23 bei den Kontrollpatienten und 1/9 bei den Infarktpatienten. Das prozentuale Überwiegen des männlichen Geschlechtes zieht sich in dieser Studie im Trend durch alle Gruppen und repräsentiert somit die reale demographische Prävalenz für diese kardiovaskulären Erkrankungen.

Die Gruppen der DCM- und DCMi - Patienten bestehen aus 20 bzw. 29 Patienten. Der Altersdurchschnitt dieser beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant und lag für die Gruppe der DCM-Patienten bei $51,45 \pm 3,15$ und bei der DCMi-Gruppe bei $48,48 \pm 2,39$. Auch die Geschlechterverteilung (f/m) unterschied sich mit 7/13 bei der DCM - Gruppe und 7/22

bei der DCMi - Gruppe nicht signifikant. Myokardgewebe konnte bei insgesamt 26 Patienten, 12 aus der DCM-Gruppe und 14 aus der DCMi-Gruppe, analysiert werden, das nicht bei allen Patienten nach der klinischen Routinediagnostik zur Verfügung stand. Die Anzahl der Patienten für die jeweiligen Versuche ist in Tabelle 7 angegeben. Aufgrund kleinerer Gruppengrößen bei der immunhistologischen Auswertung konnten nicht immer signifikante Ergebnisse produziert werden, so dass einige Daten nur im Trend erkennbar sind.

Tabelle 7: Die Tabelle zeigt die Anzahl, Alters- und Geschlechtsverteilung der an der Studie teilnehmenden Patienten. Liegt ein p-Wert im Signifikanzniveau (0,05), ist dieser Wert mit einem Sternchen gekennzeichnet.

	n	Alter	Gender (f/m)
Blutspender-Kontrollgruppe (SK)	26	26 / 44,88±1,84	3/23
DCM	20	20 / 51,45±3,15	7/13
DCMi	29	29 / 48,48±2,39	7/22
AMI (4.Tag)	10	10 / 61,5±3,49	1/9
p-value (SK vs. DCM)	-	0,0512	-
p-value (SK vs. DCMi)	-	0,1971	-
p-value (SK vs. AMI)	-	0,0006*	-
p-value (DCM vs. DCMi)	-	0,5417	-
p-value (DCM vs. AMI)	-	0,585	-
p-value (DCMi vs. AMI)	-	0,0047*	-

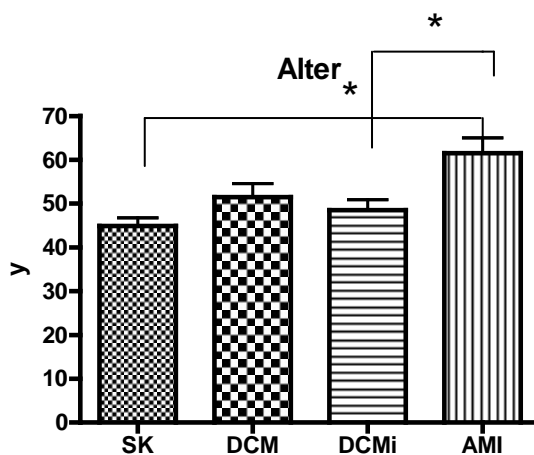


Abbildung 2: Die Altersverteilung der an der Studie teilnehmenden Patienten als Balkendiagramm. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet. Die y-Achse zeigt das Alter in Jahren an.

3.1.2. Hämodynamische Daten

Die hämodynamischen Daten wurden von den Gruppen der DCM-/DCMi- und der AMI-Patienten erhoben. Die Blutspender wurden anamnestisch als kardial gesund deklariert und wir gingen somit von einer physiologischen Pumpfunktion des Herzens aus. Eine echokardiographische Erhärtung dieser klinischen Einschätzung erfolgte nicht, da bei diesen Patienten keine kardiale Erkrankung vorlag.

Die DCM- und DCMi-Patienten glichen sich hinsichtlich ihrer hämodynamischen Daten weitestgehend, da die *p*-Werte beim Vergleich der Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufzeigten. Die Ejektionsfraktion lag bei der DCM – Gruppe bei $26\pm 2,99\%$ und bei der DCMi – Gruppe bei $25,86\pm 2,0\%$. Der LVEDD lag ebenfalls im gleichen Bereich mit $72,7\pm 2,2$ mm bei der DCM – Gruppe und $69,76\pm 1,05$ mm bei der DCMi – Gruppe. Der LVEDP befand sich bei den DCM – Patienten bei $14,24\pm 1,56$ mmHg (gemessen bei 17 der 20 Patienten) und mit $15,54\pm 1,82$ mmHg (gemessen bei 28 der 29 Patienten) im gleichen Bereich. Somit unterscheidet sich die hämodynamische Datenlage zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant und damit sind die Gruppen hinsichtlich ihrer Pumpfunktion des Herzens sehr gut miteinander vergleichbar. Alle Mittelwerte der hämodynamischen Werte der DCM-Gruppen sowie *p-value* sind in der Tabelle 8 zu finden. Weiterhin sind die hämodynamischen Werte in der Abbildung 3 – 5 graphisch abgebildet.

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht der hämodynamischen Parameter aller DCM- und DCMi-Patienten. *p*-value zeigt in diesem Falle keine signifikanten Unterschiede.

	LVEF	LVEDD	LVEDP
DCM (n=20)	20 / $26\pm 2,99$	20 / $72,7\pm 2,2$	17 / $14,24\pm 1,56$
DCMi (n=29)	29 / $25,86\pm 2,0$	29 / $69,76\pm 1,05$	28 / $15,54\pm 1,82$
p-value (DCM vs. DCMi)	0,699	0,101	0,760

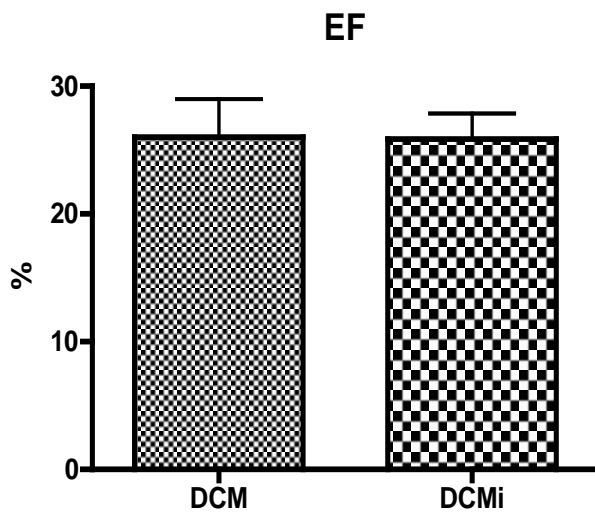


Abbildung 3: Darstellung der Ejektionsfraktion (Mittelwerte und Standardabweichungen) als Balkendiagramm. Gemessen wurden die Patienten der DCM- und der DCMi-Gruppe. Die y-Achse zeigt die Ejektionsfraktion in % an. Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

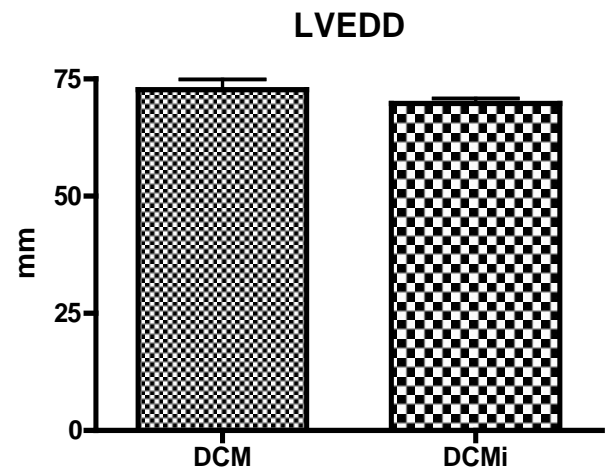


Abbildung 4: Darstellung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (Mittelwerte und Standardabweichung) als Balkendiagramm. Gemessen wurden alle Patienten der DCM- und DCMi-Gruppe. Die y-Achse gibt den LVEDD in mm an. Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

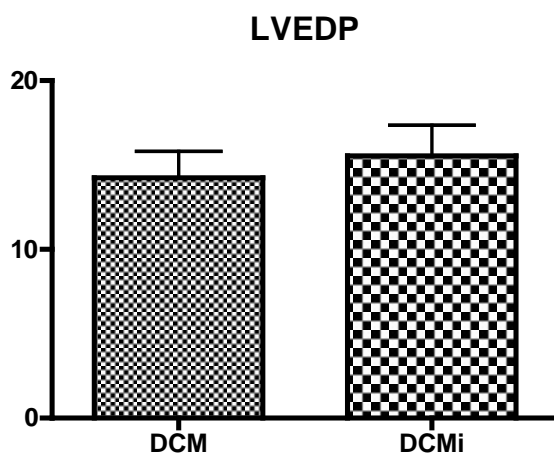


Abbildung 5: Darstellung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (Mittelwerte und Standardabweichung) als Balkendiagramm. Die y-Achse gibt den LVEDP in mmHg an. Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

3.1.3. Die Medikation

Bei der gesunden Kontrollgruppe wurde im Vorfeld anamnestisch sichergestellt, dass keiner der Blutspender eine kardiale Medikation einnahm.

Die Medikation der Patientengruppen wurde den Krankenakten entnommen und war auf dem Stand der Krankenhausentlassung in der Epikrise festgehalten. Zwischen den beiden DCM-

und DCMi – Patientenkollektiven war kein signifikanter Unterschied der Medikation mit ACE-Hemmern bzw. AT-1 Blockern, β -Blockern, Diuretika, Spironolacton und Digitalisglykosiden zu erkennen (siehe Tabelle 9).

Die Gruppe der AMI – Patienten unterschied sich von den beiden DCM – Gruppen signifikant hinsichtlich der Einnahme folgender Medikamente: Digitalisglykoside, Spironolactone und Diuretika (siehe Tabelle 9). Die Medikation mit ACE-Hemmern bzw. AT-1 Blockern und β -Blockern deckt sich weitestgehend mit den DCM – Gruppen.

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht über die Medikation der Patienten aller vier Studiengruppen. Signifikante Unterschiede in der medikamentösen Behandlung der Patienten zwischen den verschiedenen Gruppen sind mit * gekennzeichnet. Die Signifikanzen wurden mit dem fishers exact test bestimmt.

	Beta-Blocker	ACE-Hemmer bzw. AT1-Blocker	Diuretikum	Spironolacton	Digitalis
Blutspender-Kontrollgruppe (SK)	0/26	0/26	0/26	0/26	0/26
DCM	18/20	19/20	19/20	20/20	13/20
DCMi	26/29	27/29	24/29	26/29	23/29
AMI (4.Tag)	8/10	8/10	4/10	0/10	0/10
p-value (SK vs. DCM)	p<0,0001*	p<0,0001*	p<0,0001*	p<0,0001*	p<0,0001*
p-value (SK vs. DCMi)	p<0,0001*	p<0,0001*	p<0,0001*	p<0,0001*	p<0,0001*
p-value (SK vs. AMI)	p<0,0001*	p<0,0001*	p=0,0036*	p=1,000	p=1,000
p-value (DCM vs. DCMi)	p=1,000	p=1,000	p=0,379	p=0,260	p=0,331
p-value (DCM vs. AMI)	p=0,251	p=0,584	p=0,002*	p<0,0001*	p=0,001*
p-value (DCMi vs. AMI)	p=0,267	p=0,587	p=0,017*	p<0,0001*	p<0,0001*

3.1.4. Virusgenomnachweis

In der Routineverarbeitung der Biopsieproben und zu weiteren Forschungszwecken wurde mittels PCR versucht ein Virusgenom (Coxsackieviren, Adenoviren, Parvoviren etc.) zu isolieren. Es gelang bei 35% der DCM-Patienten und bei 62% der DCMi-Patienten ein Virusgenom mit der oben genannten Methode nachzuweisen. Der Unterschied ist mit $p=0,06$ nicht signifikant. Für unsere Studie ist das Vorhandensein von Virusgenom in den Herzmuskelproben nicht weiter von Bedeutung und wird, da statistisch nicht signifikant, die folgenden Versuchsreihen nicht beeinflussen.

3.2. Versuchsreihen

3.2.1. Serumparameter (MMP's, TIMP-1, Zytokine und pro-BNP)

3.2.1.1. TIMP-1

Die Bestimmung des *Tissueinhibitoren-1* der Matrixmetalloproteinasen im Serum der Patienten ergab folgende Resultate:

DCM vs. DCMi: Bei der DCM-Gruppe wurde ein TIMP-1 von $343,5 \pm 27,31$ ng/ml, bei der DCMi-Gruppe von $285,6 \pm 15,43$ ng/ml gemessen. Die beiden DCM- Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, jedoch ist ein tendenzieller Abfall von TIMP-1 in der DCMi-Gruppe gegenüber der DCM-Gruppe um 16,86% zu verzeichnen. Der p-Wert liegt mit 0,0628 nahe am Signifikanzniveau.

SK, DCM, DCMi, AMI: Die Blutspendergruppe hatte ein TIMP-1 von $218,75 \pm 9,155$ ng/ml im peripheren Blut und bei den Herzinfarktpatienten wurden $305,4 \pm 14,88$ ng/ml bestimmt.

Bei $p=0,475$ gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Blutspendern und der AMI-Gruppe.

Die Gruppen der DCMi-Patienten und AMI-Patienten heben sich signifikant zu den Blutspendern ab ($p=0,002^*$ und $p<0,0001^*$). Weiterhin gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den DCM- und AMI-Patienten mit $p<0,0001^*$. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 10 aufgeführt, die Abbildung 6 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

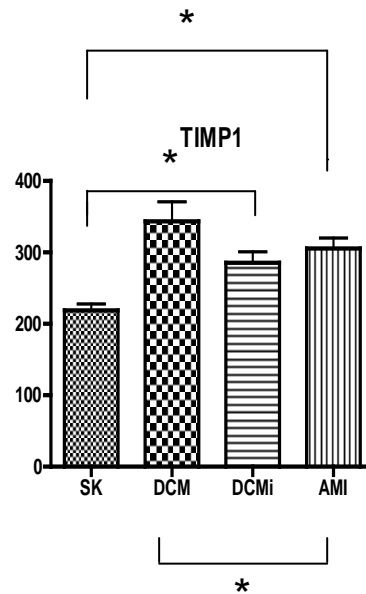


Abbildung 6: Darstellung der Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) der TIMP-1 Messparameter im Serum aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt den Messwert für TIMP-1 in ng/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mit * gekennzeichnet.

3.2.1.2. MMP-1

Die Messung der Kollagenase *MMP-1* im Serum der Patienten ergab:

DCM vs. DCMi: Die DCM-Gruppe hatte $3,88 \pm 0,37$ ng/ml MMP-1 im Serum, bei den DCMi-Patienten wurden $6,37 \pm 0,57$ ng/ml gemessen. Damit liegt der Serum-MMP-1 Wert der DCMi-Gruppe signifikant ($p=0,003^*$) über dem der DCM-Gruppe.

SK, DCM, DCMi, AMI: Bei den Blutspendern ist ein MMP-1 Messwert von $5,59 \pm 0,53$ ng/ml, bei der AMI-Gruppe $6,93 \pm 1,04$ ng/ml gefunden worden. Damit liegt der Messwert der Herzinfarktgruppe ebenfalls signifikant über der DCM-Gruppe ($p=0,024^*$). Der Myokardinfarkt, als Akutereignis liegt mit seinen Messwert über denen aller anderen Gruppen. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 10 aufgeführt, die Abbildung 7 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

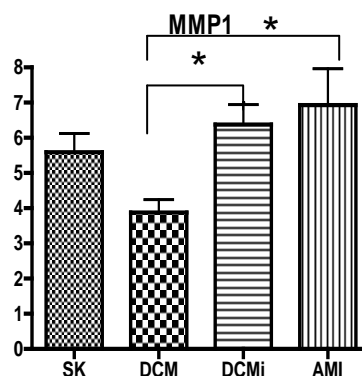


Abbildung 7: Darstellung der Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) der MMP-1 Messparameter im Serum aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt den Messwert für MMP-1 in ng/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mit * gekennzeichnet.

3.2.1.3. MMP-3

Die Bestimmung der *MMP-3* im Serum aller Patienten zeigte:

DCM vs. DCMi: Die DCM-Patienten hatten einen Mittelwert von $13,77 \pm 3,02$ ng/ml und die DCMi-Patienten $18,26 \pm 2,88$ ng/ml von *MMP-3* im Serum. Damit liegt die DCMi-Gruppe tendenziell, aber nicht statistisch signifikant ($p=0,542$), leicht über der DCM-Gruppe.

SK, DCM, DCMi, AMI: Die Blutspender zeigten $11,30 \pm 0,91$ ng/ml *MMP-3* im peripheren Blut, die Herzinfarktgruppe lag bei $17,59 \pm 5,35$ ng/ml. Die AMI-Gruppe liegt somit auf nahezu demselben Niveau wie die DCMi-Gruppe. Zwischen den Blutspendern als Negativkontrolle und der DCM-Gruppe ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,017^*$). Weiterhin liegen die AMI-Patienten als Positivkontrolle mit $p=0,055$ nahe am Signifikanzniveau über der Blutspendergruppe. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 10 aufgeführt, die Abbildung 8 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

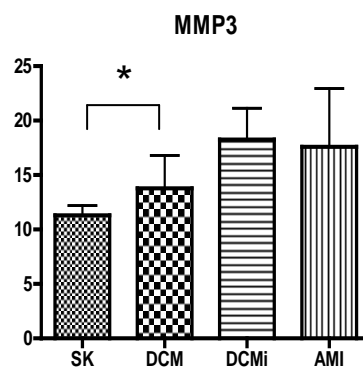


Abbildung 8 : Darstellung der Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) der *MMP-3* Messparameter im Serum aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt den Messwert für *MMP-3* in ng/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mit * gekennzeichnet.

3.2.1.4. MMP-9

Die Bestimmung der Gelatinase *MMP-9* im Serum erbrachte die folgenden Ergebnisse:

DCM vs. DCMi: Die DCM-Gruppe zeigte $32,44 \pm 3,45$ ng/ml, die DCMi-Gruppe $30,50 \pm 2,56$ ng/ml *MMP-9* im Serum. Damit liegen die beiden Gruppen in etwa auf dem gleichen Niveau und unterscheiden sich nicht signifikant ($p=0,669$).

SK, DCM, DCMi, AMI: Vergleicht man alle vier Patientengruppen miteinander, fällt auf, dass die Blutspender mit einem Mittelwert von $254,2 \pm 19,15$ ng/ml und die AMI-Patienten mit $354,8 \pm 33,91$ ng/ml signifikant über den beiden DCM-Gruppen liegen. Die entsprechenden Messparameter sowie die p-Werte sind in der Tabelle 10 zu finden. Die Abbildung 9 stellt die Messergebnisse der Gelatinase *MMP-9* graphisch dar.

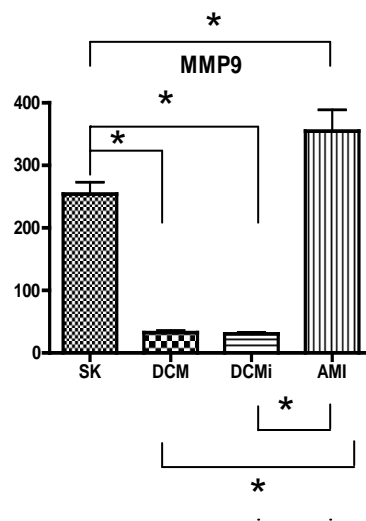


Abbildung 9 : Darstellung der Ergebnisse der MMP-9 Messparameter (Mittelwerte und Standardabweichung) im Serum aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt den Messwert für MMP-9 in ng/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mit * gekennzeichnet.

3.2.1.5. ICTP

Da dieser Elisa sich in der klinischen Routinediagnostik etabliert hat, existiert hier ein fest definierter Toleranzbereich für gesunde Menschen. Jeder unserer Blutspender befand sich mit seinen Messwerten für ICTP in diesem Toleranzbereich, was gleichzeitig als Kontrolle für die Genauigkeit unserer Messwerte diente und unsere Kontrollgruppe in ihrer Geeignetheit für diese Studie bestätigte.

Die Werte des Kollagenegradationsmarkers **ICTP** ergaben folgende Ergebnisse:

DCM vs. DCMi: Bei der DCM-Gruppe war das ICTP mit einem Mittelwert von $8,07 \pm 1,32$ $\mu\text{g/l}$. Die DCMi-Gruppe lag mit $6,13 \pm 0,88$ $\mu\text{g/l}$ nahe am Signifikanzniveau darunter ($p=0,067$).

SK, DCM, DCMi, AMI: Bei unserer Kontrollgruppe fand sich $2,92 \pm 0,02$ $\mu\text{g/l}$ ICTP im Serum und die Positivkontrolle AMI-Gruppe kam auf einen Mittelwert von $9,50 \pm 1,22$ $\mu\text{g/l}$. Statistisch signifikante Unterschiede wurden jeweils zwischen der Kontrollgruppe und den DCMi-Patienten ($p < 0,0001^*$), der Kontrollgruppe und AMI-Gruppe ($p < 0,0001^*$), der AMI-Gruppe und der DCM-Gruppe ($p < 0,0001^*$) sowie der AMI-Gruppe und der DCMi-Gruppe ($p=0,007^*$) gefunden. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 10 aufgeführt, die Abbildung 10 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

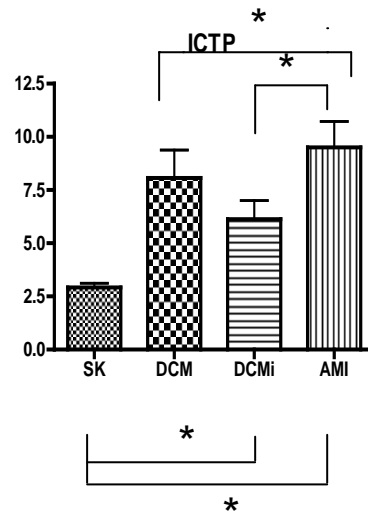


Abbildung 10 : Darstellung der Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) der ICTP Messparameter im Serum aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt den Messwert für ICTP in $\mu\text{g/ml}$ wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mit * gekennzeichnet.

3.2.1.6. uPA

Die Bestimmung von **uPA** im Serum zeigte folgende Ergebnisse:

DCM vs. DCMi: Bei der DCM-Gruppe fand man ein uPA im Serum von $5,55 \pm 0,76$ U/L, das nahe am Signifikanzniveau ($p=0,088$) über dem Mittelwert der DCMi-Patienten mit $4,15 \pm 0,51$ U/L lag.

SK, DCM, DCMi, AMI: Die Kontrollgruppe zeigte einen Wert von $4,04 \pm 0,27$ U/L und liegt damit annähernd auf dem gleichen Niveau mit den DCMi-Patienten und der AMI-Gruppe, die $3,55 \pm 0,85$ U/L im Serum aufweisen. Die Gruppe der DCM-Patienten unterscheidet sich signifikant von den Blutspendern ($p=0,044^*$) und befindet sich im Trend über den Werten der restlichen Gruppen. Die übrigen Gruppenvergleiche ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 10 aufgeführt, die Abbildung 11 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

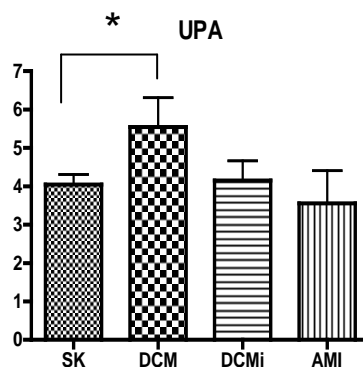


Abbildung 11 : Darstellung der Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) der uPA Messparameter im Serum aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt den Messwert für uPA in U/L wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mit * gekennzeichnet.

Tabelle 10: Übersicht über die Gruppengrößen, Mittelwerte (MMP's und TIMP-1 = ng/ml; ICTP=µg/ml; uPA= U/L) und Standardabweichungen für die einzelnen Serummessparameter. *P-value* beschreibt die Unterschiede zwischen zwei Patientengruppen und ist mit 0,05 (oder kleiner) im signifikanten Bereich und zusätzlich mit * gekennzeichnet.

	MMP-1	MMP-3	MMP-9	TIMP-1	ICTP	UPA
Blutspender-Kontrollgruppe (SK)	26/5,59±0,53	26/11,30± 0,91	26/254,2±19,15	26/218,75± 9,155	26/2,92±0 ,02	26/4,04± 0,27
DCM	20/3,88±0,37	20/13,77± 3,02	20/32,44±3,45	20/343,5± 27,31	20/8,07±1 ,32	20/5,55± 0,76
DCMi	29/6,37±0,57	29/18,26±2, 88	29/30,50±2,56	29/285,6±15, 43	29/6,13±0 ,88	29/4,15± 0,51
AMI (4.Tag)	10/6,93±1,04	10/17,59± 5,35	10/354,8±33,91	10/305,4± 14,88	10/9,50±1 ,22	10/3,55± 0,85
p-value (SK vs. DCM)	p=0,06	p=0,017*	p<0,0001*	p=0,475	p=0,183	p=0,044*
p-value (SK vs. DCMi)	p=0,372	p=0,567	p<0,0001*	p=0,002*	p<0,0001 *	p=0,321
p-value (SK vs. AMI)	p=0,148	p=0,055	p=0,013*	p<0,0001*	p<0,0001 *	p=0,061
p-value (DCM vs. DCMi)	p=0,003*	p=0,542	p=0,669	p=0,0628	p=0,067	p=0,088
p-value (DCM vs. AMI)	p=0,024*	p=0,112	p<0,0001*	p<0,0001*	p<0,0001 *	p=0,311
p-value (DCMi vs. AMI)	p=0,764	p=0,316	p<0,0001*	p=0,332	p=0,007*	p=0,155

3.2.1.7. Zytokinmessungen im Serum

Die Zytokinbestimmung im Serum der Patienten wurde mittels Bioplex Zytokinassay durchgeführt und umfasste mit einer Messung den Nachweis von IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, INF- γ und TNF- α . Die Zytokinbestimmungen im Serum funktionierten mit dem Bioplex Assay einwandfrei, doch da einige Patienten bei den Zytokinnachweisen unter oder über der Nachweisgrenze lagen und somit nicht miterfasst werden konnten, variiert die Gruppengröße innerhalb der Zytokinmessung leicht. Trotz dessen sind die Gruppen ausreichend groß um statistisch verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

Die Ergebnisse und das Signifikanzniveau werden in unten stehender Tabelle 11 aufgelistet und anschließend als Säulendiagramme (Abbildung 12-19) graphisch abgebildet.

Tabelle 11: Übersicht über die Gruppengrößen, Mittelwerte (pg/ml) und Standardabweichungen für die einzelnen Serummessparameter der Zytokine. *P-value* beschreibt die Unterschiede zwischen zwei Patientengruppen und ist mit 0,05 (oder kleiner) im signifikanten Bereich und zusätzlich mit * gekennzeichnet.

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	GMCSF	INF-y	TNF-a
Blutspender-Kontrollgruppe (SK)	24/ 11,12±3,13	24*/ 9,44±2,12	24*/ 49,95± 8,69	24*/ 3226± 633,9	24*/ 26,93± 4,48	24/5,05± 1,8	24/ 5,9±1,34	24*/ 6,77±1,6 7
DCM	14*/ 28,69±9,04	9*/15,34± 3,68	18*/ 86,58± 23,54	17/ 245,4± 100,1	18/ 47,25± 25,60	14/ 327,4± 177,1	17/ 57,58±23,62	17*/8,98 ±2,63
DCMi	27/ 35,49± 12,20	23/ 43,19± 19,28	28*/ 253,5± 57,58	28*/774,8± 108,6	28/ 121,8± 52,78	27/ 60,01± 28,45	28/ 41,12±20,75	29/ 31,33±1 4,86
AMI (4.Tag)	10*/ 2,11±0,97	10*/ 3,01±2,0	10*/ 138,8± 41,32	10*/ 304,7± 28,72	10/ 259,9± 180,41	10*/ 0,53± 0,63	10/ 2,63±1,87	10*/ 1,98±0,5 5
p-value (SK vs. DCM)	p=0,019*	p=0,004*	p=0,146	p=0,083	p=0,018*	p<0,0001 *	p<0,0001*	p=0,245
p-value (SK vs. DCMi)	p=0,023*	p=0,282	p<0,0001*	p=0,004*	p=0,010*	p=0,020*	p=0,019*	p=0,025 *
p-value (SK vs. AMI)	p=0,003*	p=0,010*	p=0,003*	p<0,0001*	p=0,238	p=0,008*	p=0,015*	p=0,003 *
p-value (DCM vs. DCMi)	p=0,783	p=0,476	p=0,006*	p=0,011*	p=0,011*	p=0,371	p=0,708	p=0,322
p-value (DCM vs. AMI)	p=0,482	p=0,090	p=0,741	p<0,0001*	p=0,024*	p=0,004*	p=0,049*	p=0,980
p-value (DCMi vs. AMI)	p<0,0001*	p=0,001*	p=0,546	p=0,023*	p=0,368	p<0,0001 *	p=0,001*	p=0,001 *

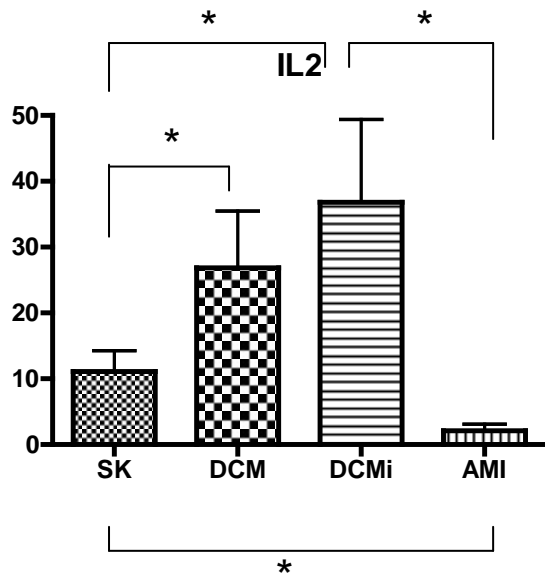


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für IL-2 aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

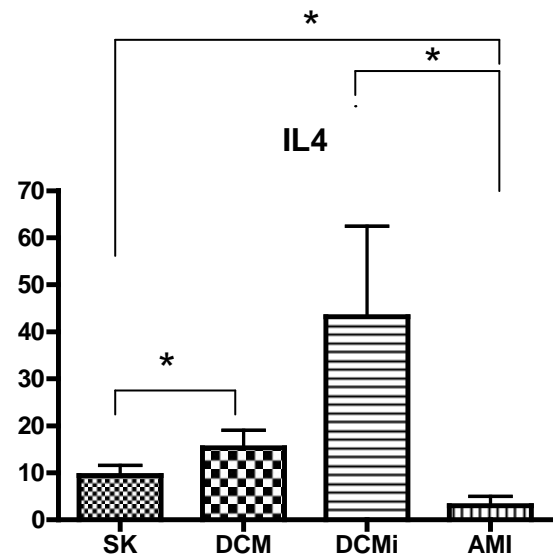


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für IL-4 aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

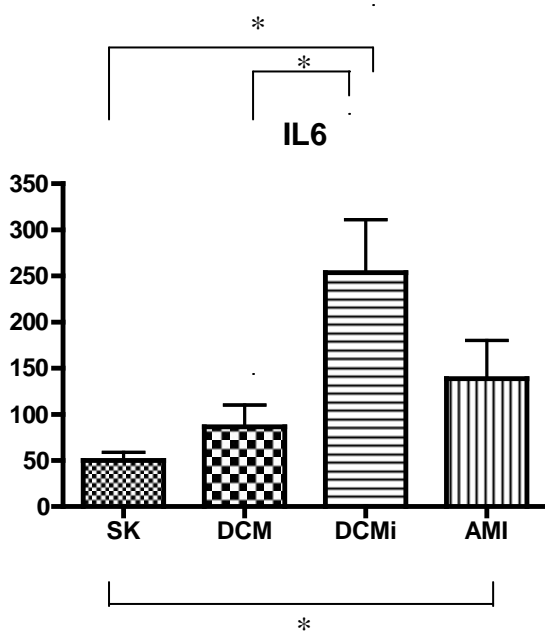


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für IL-6 aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

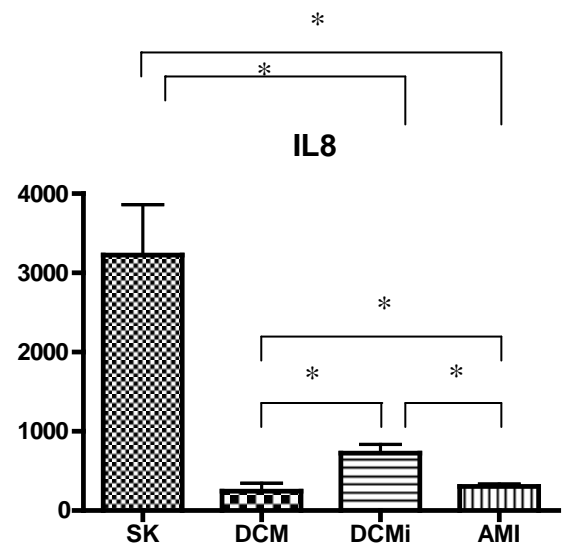


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für IL-8 aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

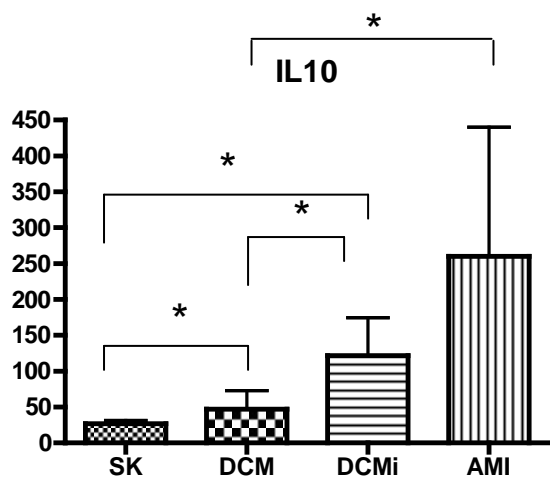


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für IL-10 aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

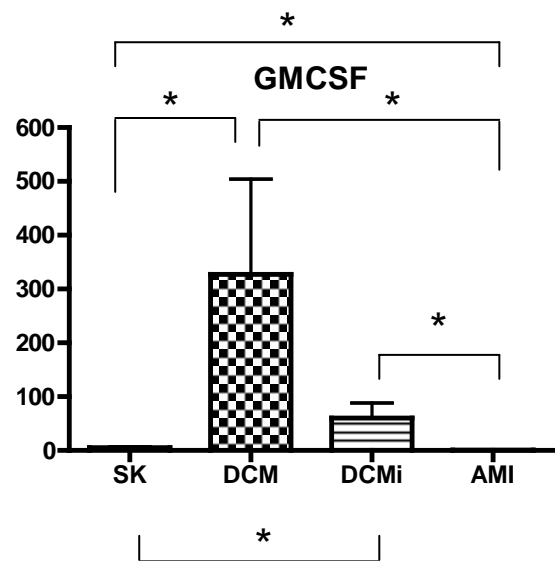


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für GM-CSF aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

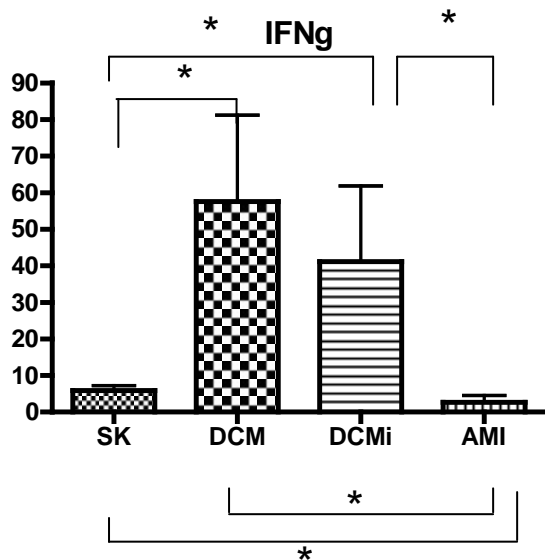


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für Interferon-gamma aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

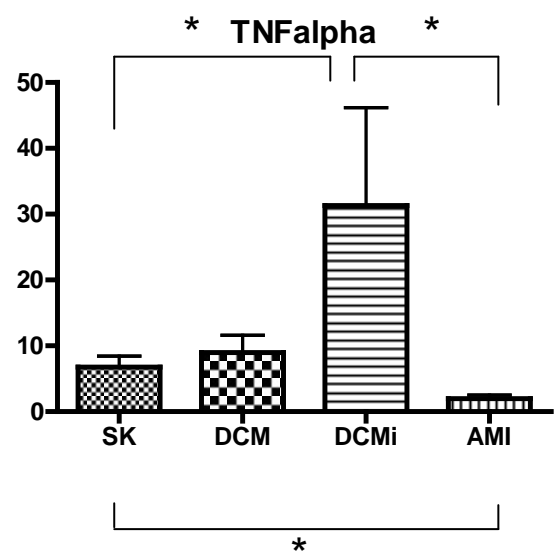


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für TNF-alpha aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

3.2.1.8. pro-BNP

Das im Serum bestimmte **pro-BNP**, welches als Indikator für eine ventrikuläre Pumpschwäche gilt, ist bei allen Gruppen (DCM, DCMi und AMI) in Bezug auf die Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Kontrollgruppe zeigt einen Wert von $4,65 \pm 1,55$ pmol/l, die DCM-Gruppe $292,4 \pm 67,63$ pmol/l, die DCMi-Gruppe $260,2 \pm 48,06$ pmol/l und die Gruppe mit den akuten Myokardinfarkten $304,37 \pm 80,34$ pmol/l. Die drei erkrankten Gruppen liegen bei sehr hoher Standardabweichung auf ca. gleichem Niveau. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen ihnen.

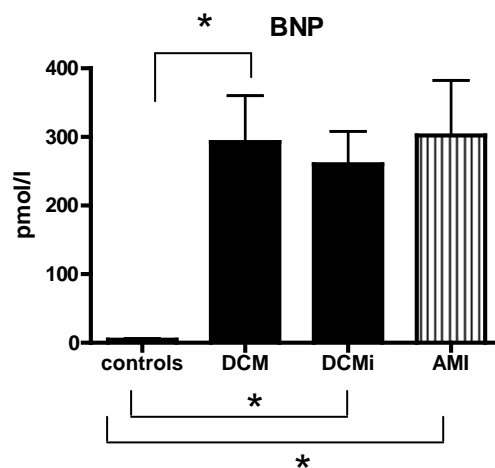


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Serummessparameter (Mittelwerte und Standardabweichungen) für pro-BNP aller vier Patientengruppen. Die y-Achse gibt die Messwerte in pg/ml wieder. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen sind mit * gekennzeichnet.

3.2.2. Histologie

3.2.2.1. Sirius-Red Färbung

Die histologische Untersuchung des Kollagengehaltes des Biopsiematerials ergab eine signifikante Zunahme ($p=0,01^*$) des Fibrosegrades von der DCM – Gruppe mit $0,42 \pm 0,1\%$ Kollagengehalt (14 von 20 Patienten) zur DCMi – Gruppe mit $1,02 \pm 0,13\%$ (15 Patienten von 29). Alle Biopsieschnitte wurden mit der Lucia Software zweifach ausgewertet und der Mittelwert als Area-Fraction ausgegeben. Der Kollagengehalt in Prozent ist nur auf den Herzmuskelanteil der Schnitte bezogen. Freiräume, Gefäße und Artefakte wurden bei der Auswertung nicht mit berücksichtigt. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 12 aufgeführt, die Abbildung 21 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

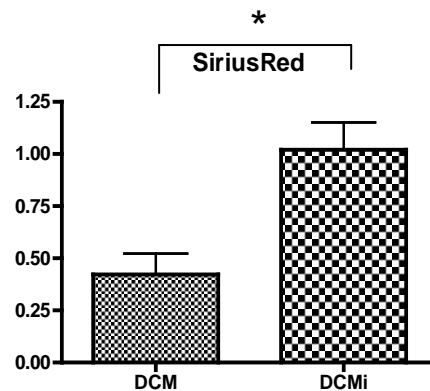


Abbildung 21: Graphische Darstellung (Mittelwert und Standardabweichung) der SiriusRed Areafraction der beiden DCM-Gruppen. Die y-Achse gibt die Areafraction in % wieder. Signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,01^*$).

3.2.2.2. Immunhistologische Färbung

Wie bereits oben beschrieben, konnte nicht von jedem Patienten, der in dieser Studie eingeschlossen wurde, eine umfangreiche Immunhistologie über die klinische Routinediagnostik hinaus gemacht werden. Die Gruppengröße wurde an dieser Stelle kleiner gehalten. In den tabellarischen Darstellungen (Tabelle 12) ist daher vor jedem Mittelwert der entsprechenden Gruppe die Anzahl der eingeschlossenen Patienten aufgeführt.

3.2.2.2.1. CD3

Im Rahmen der klinischen Routinediagnostik wurde von allen Patientenbiopsien eine **CD3**-Färbung angefertigt, um den Grad der Inflammation des Herzmuskelgewebes abschätzen zu können und eine Diagnose hinsichtlich einer intramyokardialen Entzündung stellen zu können. Die von uns untersuchten Patientengruppen unterschieden sich signifikant in ihrer Infiltration von $CD3^+$ -Zellen im Herzmuskelgewebe ($p<0,0001^*$). Die DCM-Gruppe wies lediglich eine Infiltration von $2,11\pm 0,42$ Zellen pro mm^2 auf, wo hingegen die Patienten mit inflammatorischer DCM eine mittlere Infiltration von $18,91\pm 6,41$ Zellen pro mm^2 aufwiesen. Die Grenze in der klinischen Diagnostik beträgt 7 Zellen/ mm^2 . Bis zu dieser Grenze werden Herzmuskelgewebe als nichtentzündlich eingestuft, alles, was über den 7 Zellen/ mm^2 liegt, wird als intramyokardiale Entzündung beschrieben. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 12 aufgeführt, die Abbildung 22 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

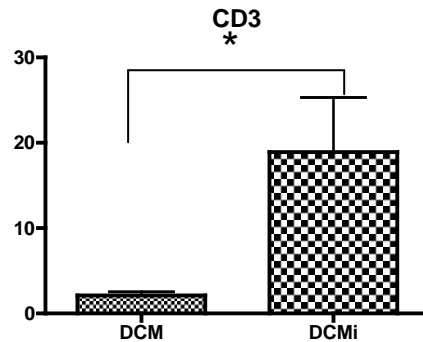


Abbildung 22: Graphische Darstellung (Mittelwert und Standardabweichung) der CD-3 Zellen/mm² der beiden DCM-Gruppen. Die y-Achse gibt die absolute Anzahl der CD-3 Zellen/mm² wieder. Signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,000^*$).

3.2.2.2.2. MMP-2

Bei dem immunhistologischen Nachweis der Gelatinase MMP-2 konnte ein annähernd signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen herausgearbeitet werden ($p=0,060$). Die Gruppen wiesen bei reduzierter Größe von 12 bei den DCM-Patienten und 14 bei den DCMi-Patienten eine tendenzielle Erhöhung der *MMP-2* Expression in den Biopsien bei intramyokardialer Entzündung auf. Die DCM-Gruppe hatte vom Mittelwert eine MMP2-Expression von $108,22 \pm 27,84$ Zellen pro mm², im Gegensatz zur DCMi-Gruppe mit $189,53 \pm 25,21$ Zellen pro mm². Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 12 aufgeführt, die Abbildung 23 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

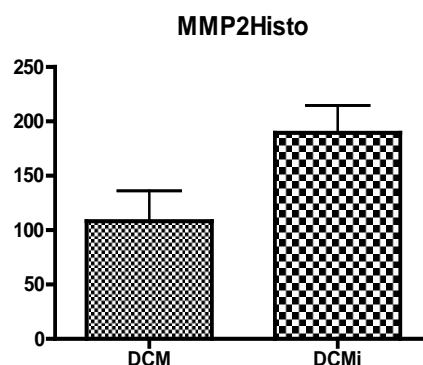


Abbildung 23: Graphische Darstellung des MMP-2 Gehaltes (Mittelwert und Standardabweichung) der beiden DCM-Gruppen, in den Biopsieschnitten. Die y-Achse gibt die absolute Anzahl der MMP-2 positiven Zellen/mm² wieder. Kein signifikanter Unterschied ($p=0,060$).

3.2.2.2.3. MMP-9

Die Expression der *MMP-9* unterschied sich in der immunhistologischen Untersuchung zwischen den beiden Gruppen der dilatativen Kardiomyopathie nicht signifikant. Die Patientengruppe ohne Entzündung im Myokard zeigte $156,81 \pm 39,33$ Zellen/mm² und die Gruppe mit Entzündung $216,1 \pm 59,71$ Zellen/mm². Damit ist, auch aufgrund der großen Standardabweichung, kein eindeutiger Trend zwischen den beiden Gruppen vorhanden.

($p=0,7823$). Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 12 aufgeführt, die Abbildung 24 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

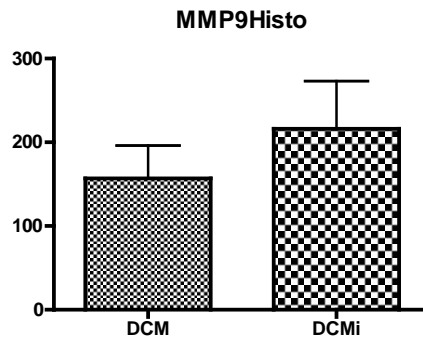


Abbildung 24: Graphische Darstellung des MMP-9 Gehaltes (Mittelwert und Standardabweichung) der beiden DCM-Gruppen in den Biopsieschnitten. Die y-Achse gibt die absolute Anzahl der MMP-9 positiven Zellen/mm² wieder. Kein signifikanter Unterschied ($p=0,7823$).

3.2.2.2.4. MMP-3

Die *MMP-3* Immunhistologie ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied, jedoch einen eindeutigen Trend der MMP-3 Expression in der Gruppe der DCMi Patienten mit $56,76 \pm 28,54$ gegenüber der DCM-Gruppe mit $14,88 \pm 8,38$ Zellen/mm². Die Gruppengröße ist mit 14 Patienten in beiden Gruppen ausgeglichen und der p-Wert beträgt hier 0,2414. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 12 aufgeführt, die Abbildung 25 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

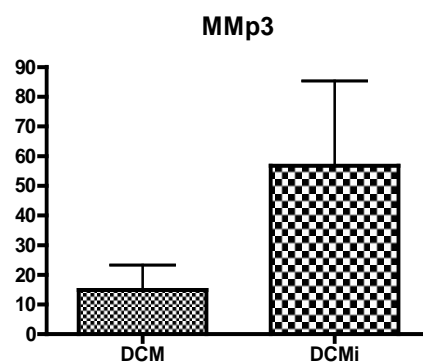


Abbildung 25: Graphische Darstellung des MMP-3 Gehaltes (Mittelwert und Standardabweichung) der beiden DCM-Gruppen in den Biopsieschnitten. Die y-Achse gibt die absolute Anzahl der MMP-3 positiven Zellen/mm² wieder. Kein signifikanter Unterschied ($p=0,2414$).

3.2.2.2.5. TIMP-1

Mit der *TIMP-1* Anfärbung der Biopsieschnitte konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,0366$) zwischen beiden DCM-Gruppen herausgearbeitet werden. Bei gleicher Gruppengröße von 14 Patienten betrug der Mittelwert der DCM-Gruppe $5,91\pm 1,39$ Zellen/mm² und der der DCMi-Gruppe $20,74\pm 7,89$ Zellen/mm². Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 12 aufgeführt, die Abbildung 26 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

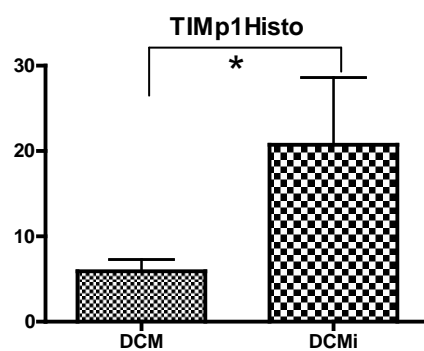


Abbildung 26: Graphische Darstellung des TIMP-1 Gehaltes (Mittelwert und Standardabweichung) der beiden DCM-Gruppen in den Biopsieschnitten. Die y-Achse gibt die absolute Anzahl der TIMP-1 positiven Zellen/mm² wieder. Zwischen beiden Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied ($p=0,0366^*$).

3.2.2.2.6. TIMP-4

Die *TIMP-4* Immunhistologie zeigte bei sehr reduzierter Gruppengröße (DCM, $n=8$; DCMi, $n=7$) und großer Standardabweichung keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,77$). Die Werte betragen $42,16\pm 8,70$ in der DCM-Gruppe und $73,51\pm 25,05$ Zellen/mm² bei der DCMi-Gruppe. Alle Messwerte und Signifikanzen sind nochmals in der Tabelle 12 aufgeführt, die Abbildung 27 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

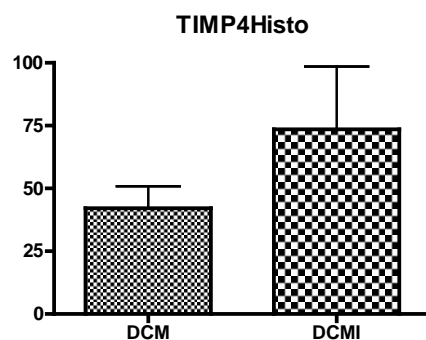


Abbildung 27: Graphische Darstellung des TIMP-4 Gehaltes (Mittelwert und Standardabweichung) der beiden DCM-Gruppen in den Biopsieschnitten. Die y-Achse gibt die absolute Anzahl der TIMP-4 positiven Zellen/mm² wieder. Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,77$).

Tabelle 12: Übersicht über die Gruppengröße, Mittelwerte (Zellen/mm² bzw. %/mm² bei SiriusRed) und Standardabweichungen für die einzelnen Histologie- und Immunhistologieergebnisse der Herzmuskelbiopsieschnitte. *P-value* beschreibt die Unterschiede zwischen zwei Patientengruppen und ist mit 0,05 (oder kleiner) im signifikanten Bereich und zusätzlich mit * gekennzeichnet.

	CD3	Sirius-Red AF	MMP-2	MMP-3	MMP-9	TIMP-1	TIMP-4
DCM	19/2,11± 0,42	14/0,42±0,1	12/108,22±2 7,84	14/14,88± 8,38	13/156,81± 39,33	14/5,91± 1,39	8/42,16± 8,70
DCMi	29/18,91 ±6,41	15/1,02±0,13	14/189,53±2 5,21	14/56,76± 28,54	15/216,1±59 ,71	14/20,74±7, 89	7/73,51± 25,05
p-value (DCM vs. DCMi)	p<0,0001 *	p=0,01*	p=0,0605	p=0,2414	p=0,7823	p=0,0366*	p=0,77

3.3. Korrelationen

Die Korrelation der gesamten Ergebnisse wurde lediglich mit den Daten der 49 DCM- und DCMi-Patienten durchgeführt, da für die Kontrollgruppe als auch für die Herzinfarktgruppe keine Immunhistologie sowie nur teilweise eine hämodynamische Messung vorlag.

Die Daten wurden mittels SPSS 11.0 verarbeitet und mit dem Korrelationstest nach Pearson ausgewertet. Das 2-seitige Signifikanzniveau musste mindestens $p=0,05$ entsprechen, um als signifikant eingestuft zu werden.

3.3.1. EF – MMP-1

Eine signifikante Korrelation fand sich zwischen der Ejektionsfraktion und der im Serum gemessenen Matrixmetalloproteinase-1 aller DCM- und DCMi-Patienten. Die mit dem Test nach Pearson berechnete Korrelation ergab einen Wert von $-0,319^*$ mit einem 2-seitigen Signifikanzniveau von 0,025 bei $n=45$.

Da der Korrelationswert hier ein negatives Vorzeichen aufweist, handelt es sich um eine negative Korrelation. Ein hoher Anteil von zirkulierendem MMP-1 im Serum der erkrankten Patienten bringt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine niedrige Ejektionsfraktion bei einem identischen oder ähnlichen Patientenkollektiv wie dem hier verwendeten.

3.3.2. LVEDD – MMP-9

Hier ist wiederum eine signifikante Korrelation zwischen einem hämodynamischen Parameter und einem Serummessparameter gefunden worden. Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser korreliert signifikant positiv, bei $0,301^*$ und $p=0,036$ ($n=49$), mit der Matrixmetalloproteinase-9 im Serum. Somit zeigt sich bei diesem Ergebnis deutlich, dass ein pathologisch vergrößerter Ventrikel erwartungsgemäß mit einer erhöhten MMP-9 Konzentration im peripheren Blut korreliert, wenn das Patientenkollektiv ähnlich oder identisch mit unserem ist.

3.3.3. MMP-1 – IL-6

Die Messwerte der im peripheren Blut bestimmten Matrixmetalloproteinase-1 korrelierten positiv mit $0,303^*$ und einem $p=0,041$ bei $n=46$ mit dem ebenfalls im peripheren Blut bestimmten Interleukin-6. Hohe Messwerte für die MMP-1 bringen mit großer Wahrscheinlichkeit auch hohe Messwerte für Interleukin-6 mit sich, wenn das Patientenkollektiv ähnlich oder identisch mit unserem ist. Die Abbildung 28 stellt diese signifikante Korrelation aller Werte graphisch dar.

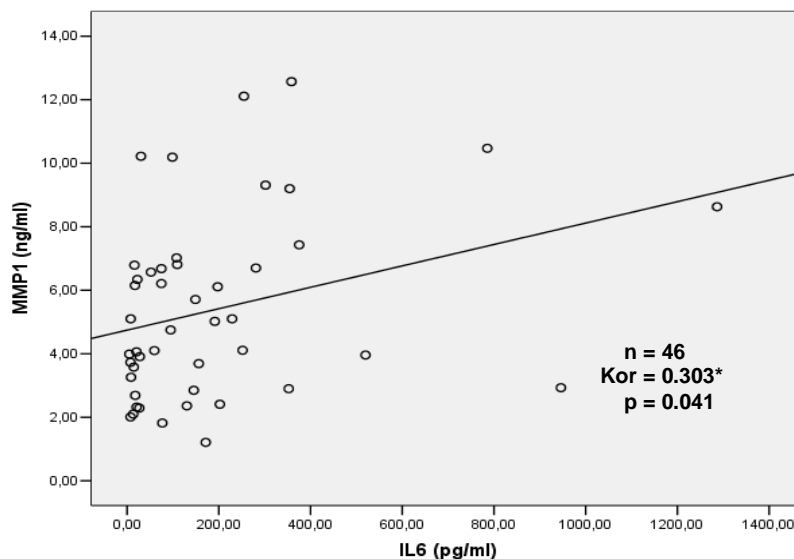


Abbildung 28: Korrelationsdiagramm für die im Serum bestimmten Parameter für MMP-1 und IL-6 aller Patienten der beiden DCM-Gruppen. Die positive Korrelation beträgt $0,303^*$, $p=0,041$ und $n=46$.

3.3.4. IL-6 – LVEDP

Eine weitere Schnittstelle zwischen einem Serummarker und einem hämodynamischen Wert ist die positive Korrelation zwischen dem im Serum zirkulierenden, proinflammatorischen Interleukin-6 und dem linksventrikulären enddiastolischen Druck. Die 2-seitige Korrelation nach Pearson zeigt einen Wert von 0,318* und ist signifikant bei einem $p=0,040$ und $n=42$. Somit findet man in unserer gemischten Versuchsgruppe aus DCM- und DCMi-Patienten bei einem hohen LVEDP auch mit hoher Wahrscheinlichkeit einen hohen Wert von im Serum befindlichen IL-6.

3.3.5. CD3⁺ – SiriusRed

Die schon in der Routinediagnostik durchgeführte Bestimmung der CD3⁺ Zellen pro mm² Biopsiefläche ergab bei unseren Versuchen eine signifikant positive Korrelation mit dem durch die SiriusRed-Färbung bestimmten Kollagenanteil der Herzmuskelbiopsien. Der Anteil des fibrosierten Herzmuskelgewebes (*Areafraction* in %) ist signifikant erhöht bei einem deutlich erhöhten CD3⁺ Zellenanteil pro mm², wie er bei der inflammatorischen DCM zu finden ist. Die Korrelation der Werte betrug in diesem Fall 0,535** bei $p=0,003$ und $n=29$. Abbildung 29 stellt diese Korrelation mit allen Werten graphisch dar.

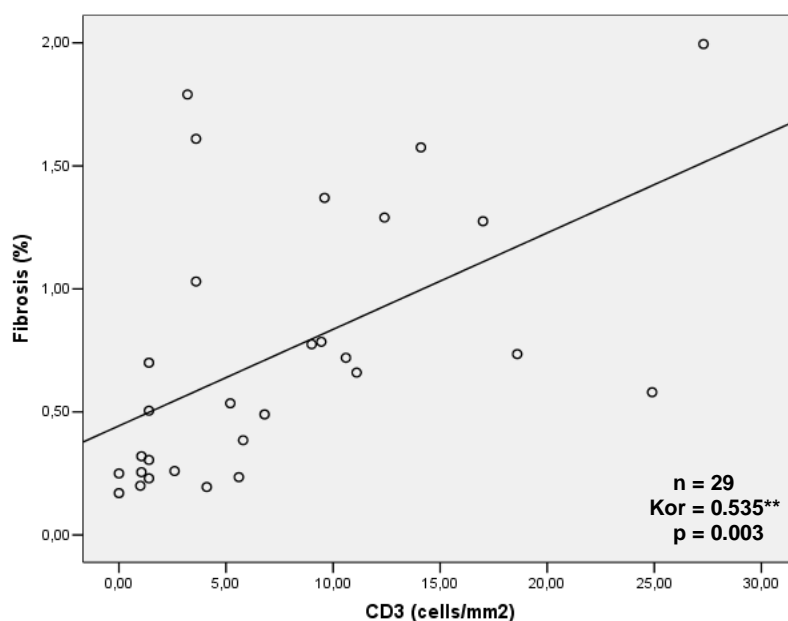


Abbildung 29: Korrelationsdiagramm für die untersuchten Werte der CD3⁺ Zellen/mm² der Biopsiefläche und der Areafraction des fibrosierten Herzmuskelgewebes der DCM- und DCMi-Patienten. Die Korrelation ist positiv mit 0,535 und signifikant bei $p=0,003$ und $n=29$.

3.3.6. CD3⁺ – MMP-2 Immunhistologie

Die routinemäßig bestimmten Werte für die CD3 positiven Zellen/mm² korrelierten weiterhin mit der immunhistologischen Anfärbung der Matrixmetalloproteinase-2. Umso mehr das Herzmuskelgewebe von CD3⁺ Zellen infiltriert war, desto höher war der Gehalt an MMP-2 in den kardialen Biopsien. Damit ist die Korrelation signifikant positiv mit 0,401* und einem $p=0,042$ bei $n=26$. Die unten stehende Abbildung 30 stellt diesen Sachverhalt graphisch dar.

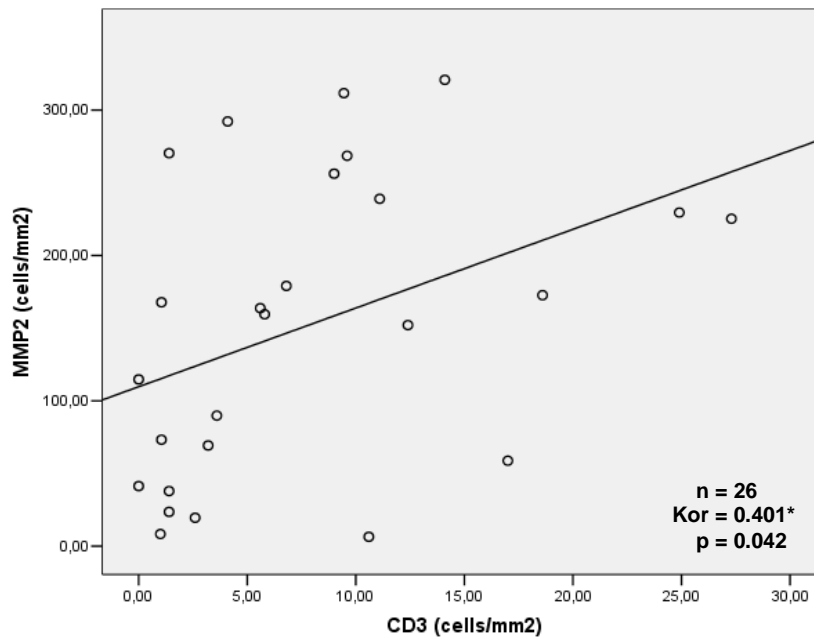


Abbildung 30: Korrelationsdiagramm für die untersuchten Werte der CD3⁺ Zellen/mm² der Biopsiefläche und der immunhistochemisch angefärbten Gelatinase MMP-2 im Herzmuskelgewebe der Patienten der DCM- und DCMi-Gruppe. Die Korrelation ist positiv mit 0,401* und signifikant bei $p=0,042$ und $n=26$.

3.3.7. IL-8 – MMP-1

Für die Serumwerte von Interleukin-8 und der Kollagenase MMP-1 wurde eine positive 2-seitige Korrelation von 0,575** gefunden, die mit $p<0,0001$ und $n=45$ hochsignifikant ist. Bei allen Patienten mit einer DCM oder DCMi wird man bei einem hohen IL-8 Serumwert mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch einen hohen Messwert der MMP-1 im Serum nachweisen können.

3.3.8. IL-8 – MMP-3

Für die Serumwerte der Stromelysin MMP-3 wurde ebenfalls eine hochsignifikante Korrelation mit dem Interleukin-8 nachgewiesen. Die Korrelation betrug in diesem Fall 0,434** und $p=0,003$ bei $n=45$. Bei hohen Messwerten von Interleukin-8 im Serum von DCM- und DCMi-Patienten wird mit hoher Wahrscheinlichkeit auch ein hoher Serumwert von MMP-3 gemessen.

3.3.9. IL-8 – SiriusRed

Die durch SiriusRed-Färbung bestimmte *Areafraction* der Patienten mit DCM und DCMi korrelierte positiv und hochsignifikant mit dem im peripheren Blut zirkulierenden Interleukin-8. Hier ergab der Test nach Pearson eine Korrelation von 0,434**, $p=0,003$ bei $n=45$. Damit geht mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Erhöhung des IL-8 Levels im Blut bei DCM/DCMi mit einer vermehrten Fibrose des Herzmuskelgewebes einher.

3.3.10. MMP-1 – MMP-3 / MMP-1 – MMP-9

Die Serumwerte der Kollagenase MMP-1 stehen in einer positiven Korrelation 0,299* mit der Stromelysin MMP-3. Der p-Wert zeigt die Signifikanz mit 0,037 bei $n=49$ an. Weiterhin wurde auch zwischen den Werten von MMP-1 und der Gelatinase MMP-9 eine signifikante positive Korrelation gefunden. Hier betrug die Korrelation nach Pearson 0,355* und $p=0,018$ bei $n=49$. Bei unseren Patienten gehen daher hohe Serum-MMP-1-Messwerte auch mit hoher Wahrscheinlichkeit mit erhöhten Serumwerten für MMP-3 und MMP-9 einher.

4. Diskussion und Zusammenfassung

Die genaue Beeinflussung der myokardialen Entzündungsreaktion auf die Balance im MMP-TIMP-System ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Insbesondere bei der dilatativen Kardiomyopathie ist die Krankheitsgenese heutzutage nur sehr bruchstückhaft verstanden. Das Ziel unserer Studie war es, den Einfluss der intramyokardialen Entzündungsreaktion bei der dilatativen Kardiomyopathie auf das System der Matrixmetalloproteinasen sowie deren Inhibitoren zu beleuchten, die somit abhängig von dem Grad ihrer Regulation eine unterschiedlich starke Einflussnahme auf das kardiale Remodeling haben.

In den Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass die zirkulierenden MMP's im Serum bei DCMi-Patienten im Vergleich zu Patienten mit einer DCM erhöht sind. Im Fall der MMP-1 war dieser Unterschied signifikant (Abbildung 7). Im Kontrast dazu war der *Tissue Inhibitor-1* bei der DCMi vermindert im Serum messbar. Da im Rahmen der akuten und subakuten Inflammation eine Zytokinausschüttung aus den infiltrierenden Entzündungszellen stattfindet, welche wiederum relevant in das MMP/TIMP-System eingreifen kann, wurde das Serumlevel einiger der wichtigsten proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine bestimmt. Hier ist ein statistisch signifikantes Ansteigen der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8, aber auch das antiinflammatorische IL-10 bei Inflammation gemessen worden.

In Ergänzung dazu fanden wir einen statistisch bedeutsamen Anstieg der myokardialen Kollagenfraktion mit Hilfe der *Sirius-Red* Färbung bei der inflammatorischen DCM, die in ihrer Ausprägung zudem mit der Menge an CD-3+-Lymphozyten positiv korrelierte. Die immunhistochemisch angefärbten Matrixmetalloproteinasen (MMP-2, -9, -3) in den Herzmuskelbiopsien zeigten alle einen Anstieg im entzündeten Herzmuskelgewebe, der jedoch in keinem Fall Signifikanzniveau erreichte. Die TIMP-1 und -4 zeigten in dieser Versuchsreihe, im Gegensatz zu den Serummessungen, eine Erhöhung in ihrer Expression im DCMi Herzen.

Weiterhin konnte durch diese Studie belegt werden, dass die Entzündungsreaktion einen Einfluss auf die Hämodynamik des Herzens hat. Dieser Sachverhalt wird unter anderem durch die negative Korrelation von Matrixmetalloproteinasen und Zytokinen mit den hämodynamischen Parametern (MMP-1 - EF, MMP-9 - LVEDD, IL-6 - LVEDP) unterstrichen.

4.1. Hämodynamische Parameter

Die relevanten hämodynamischen Daten wie EF, LVEDD und LVEDP sind im Vorfeld bei den DCM-Patienten definiert worden, da alle Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie Zeichen einer manifesten Herzinsuffizienz aufweisen sollten (siehe Tabelle 4). Es wurde ersichtlich, dass sich die Pumpfunktion zwischen den beiden Gruppen nicht relevant unterscheidet und somit dieser Einflussfaktor auf das MMP/TIMP-System ausgeschaltet wurde. Gestützt wird dies durch das Serum-BNP-Level, welches ebenfalls keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen aufwies. Die Gruppe der Herzinfarktpatienten zeigte als Ausnahme bessere hämodynamische Werte im Gegensatz zu den DCM-Patienten, da hier durch frühzeitige Coronarintervention nur eine leichte bzw. keine Insuffizienz des Herzens zurückblieb. Das pro-BNP ist ein Indikator für eine Pumpschwäche des Herzens und wird von Zellen eines überdehnten kardialen Ventrikels produziert, um langfristig das intravasale Volumen durch eine induzierte Diurese zu reduzieren. Alle Patienten dieser drei Gruppen hatten eine mäßige (AMI) bis stark (DCM/DCMi) eingeschränkte Auswurffraktion des linken Ventrikels und dadurch bedingt einen erhöhten LVEDP mit nachfolgender Überdehnung der Ventrikelwände. Vergangene Studien belegten ebenfalls eine pro-BNP Erhöhung bei kardialer Dysfunktion. Erwähnt wurden hier die Myokarditis, der akute Myokardinfarkt mit nachfolgender linksventrikulärer Dysfunktion sowie die dilatative Kardiomyopathie. Die Ergebnisse der genannten Publikationen entsprechen somit auch den Ergebnissen unserer pro-BNP Messungen bei den drei Gruppen mit Herzerkrankungen (Yoshimura, Yasue et al. 1993; Gunes, Okcun et al. 2008; Zakyntinos, Kiropoulos et al. 2008), womit die nachfolgenden Ergebnisse gut verglichen werden können.

Darüber hinaus belegen mehrere statistisch signifikante Korrelationen in dieser Studie, dass die vermehrte Expression von Matrixmetalloproteinasen mit einer Verschlechterung der hämodynamischen Parameter einhergeht (EF-MMP-1, LVEDD-MMP-9, LVEDP-IL-6). Die Arbeitsgruppe um Meng et al. beschrieben bei Mäusen mit einer Myokarditis ebenfalls eine negative Korrelation der Gelatinasenexpression im Herzen und den systolischen Funktionsparametern als Ausdruck der Pumpfunktionseinschränkung (Meng, Wang et al. 2004). Birner et al. zeigten neben dem proBNP auch eine negative Korrelation von IL-6 mit der LV-Funktion bei Patienten mit CHF (Birner, Ulucan et al. 2007). Die vorangegangenen Studien zeigen klare Parallelen zu unseren Ergebnissen.

Die durch die MMP's in Gang gesetzten Umbauprozesse der EZM führen zu einer Gefügedilatation, die eine globale Kraftübertragung im Ventrikel nicht mehr ermöglicht. Wiederholt hatten Studien in der Vergangenheit vielseitige Umbauprozesse der EZM mit der

Entstehung einer Herzinsuffizienz in Zusammenhang gebracht (Heymans, Luttun et al. 1999; Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002). Kindermann et al. verweisen in ihrer Arbeit auf signifikant längeres Überleben bei besserer linksventrikulärer Funktion nach einer Myokarditis (Kindermann, Kindermann et al. 2008). Zudem beschreibt Kindermann et al. sowohl die immunhistochemisch nachgewiesene myokardiale Entzündungsreaktion als auch die Herzinsuffizienz in fortgeschrittener NYHA-Klasse als wichtige Prognosefaktoren für das mediane Überleben (Kindermann, Kindermann et al. 2008). Im Vergleich mit unseren Korrelationen lässt dies den ersten Schluss zu, dass eine Myokardinflammation über den Weg der Zytokinausschüttung zu einer Aktivierung des MMP/TIMP-Systems führt, die eine für die Pumpfunktion des Herzens verheerende Wirkung nach sich zieht.

4.2. Umbau der kardialen extrazellulären Matrix

4.2.1. Matrixmetalloproteinasen

In der Vergangenheit ist bereits häufig das murine Myokarditismodell untersucht worden, das wiederholt eine erhebliche Dysregulation der Degradationsenzyme zeigte (Li, Schwimmbeck et al. 2002; Meng, Wang et al. 2004; Matsusaka, Ikeuchi et al. 2005; Pauschinger, Rutschow et al. 2005). Hier wird über den Weg der Matrixmetalloproteinasen ein wesentlicher kausaler Zusammenhang für die Entstehung einer kardialen Dilatation mit konsekutiver Pumpschwäche vermutet.

Auch bei anderen Krankheitsentitäten, die mit einem kardialen Remodeling einhergehen, wie dem akuten Myokardinfarkt, sind in humanen Studien erhöhte Serum- bzw. Plasmaspiegel von Degradationsenzymen gemessen worden (Kelly, Cockerill et al. 2007; Orn, Manhenke et al. 2007; Kelly, Khan et al. 2008). Kelly et al. zeigen nach einem akuten Myokardinfarkt weiterhin eine negative Korrelation der MMP-3 zur linksventrikulären Funktion, welches Orn et al. analog dazu für die Gelatinase MMP-9 offenlegten.

Die Bestimmung von akute-Phase-Proteinen im peripheren Blut hat bereits vor langer Zeit Einzug in die klinische Diagnostik von akuten Entzündungsreaktionen erhalten. Analog dazu wurde in dieser Studie der Versuch unternommen, auch ein erhöhtes Level von Degradationsenzymen im Serum der Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie nachzuweisen. Da die zirkulierenden Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren bislang nicht organspezifisch unterschieden werden können, wurden im Vorfeld Nebenerkrankungen, die Auswirkung auf die Dysbalance im MMP-TIMP-System haben, ausgeschlossen.

Die Kollagenase MMP-1 zeigte sich im Serum der inflammatorischen Kardiomyopathie signifikant zur DCM erhöht. In der Vergangenheit beschrieben andere Arbeitsgruppen ebenfalls einen signifikanten Anstieg dieser Kollagenase im murinen Myokarditismodell, jedoch auf mRNA-Ebene (Pauschinger, Rutschow et al. 2005).

Da sich die hämodynamischen Daten unserer beiden Gruppen nicht statistisch bedeutsam unterscheiden, muss davon ausgegangen werden, dass die hier belegte MMP-1 Hochregulation und Ausschüttung ins periphere Blut der Infiltration von Entzündungszellen im Myokardgewebe geschuldet ist. Diese signifikant vermehrte Produktion der Kollagenase lässt den Schluss zu, dass somit eine verstärkte Kollagen Degradation in der DCMi stattfindet, welche sich schließlich in einer erhöhten *Area fraction* in den *Sirius-Red* Färbungen widerspiegelt (siehe Abbildung 21).

Die Arbeitsgruppe von Radauceanu et al. zeigte sogar einen signifikanten Zusammenhang der erhöhten Serum-MMP-1 bei CHF und einem schlechten Outcome (Radauceanu, Ducki et al. 2008). Bereits in vergangenen Studien ist an humanen Endomyokardbiopsien eine Beziehung zwischen einer myokardialen Entzündungsreaktion und dem Umbau der EZM beschrieben worden (Pauschinger, Doerner et al. 1998; Pauschinger, Knopf et al. 1999). Die von den Entzündungszellen sezernierten Zytokine dysregulieren das MMP/TIMP-System und induzieren damit einen vermehrten Abbau von Kollagenen, andererseits stimulieren sie ebenso die Produktion von erneutem aber minderwertigem Kollagen in den Fibroblasten (Weber 1989; Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2004; Yun, Shin et al. 2007).

In einer klinischen Studie von Spinale et al. konnte zudem eine Herunterregulation der MMP-1 im Endstadium einer chronischen Herzinsuffizienz gezeigt werden (Spinale, Coker et al. 2000). Dieses Ergebnis erklärt den von uns ebenso dargestellten Abfall der Serum MMP-1 bei Patienten mit DCM im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 7).

Eine signifikant vermehrte MMP-1 Fraktion zeigte sich zudem im Rahmen eines akuten myokardischämischen Ereignisses und weisen ebenfalls auf ein vermehrtes Remodeling im Herzen hin. Unsere Studie belegt ein signifikantes Ansteigen der MMP-1 bei Herzinfarktpatienten im Vergleich zur DCM-Gruppe sowie in Tendenz zur Kontrollgruppe. Bei einem akuten Myokardinfarkt wird in weitaus kürzerer Zeit ein Mehrfaches an Kollagen als bei chronischen Krankheitsprozessen wie der DCM umgesetzt und somit ist es zu begründen, dass in diesem Falle die Kollagenasen in der AMI-Gruppe weit über denen eines chronischen Krankheitsprozesses exprimiert sind (Inoue, Kato et al. 2003). Der typische

„treppenartige“ Anstieg der MMP-1 im Serum von der DCM über die DCMi zum Herzinfarkt (Abbildung 7) könnte somit einen Hinweis auf die unterschiedliche Schwere des Entzündungsvorganges sowie des Remodelings geben.

Der Stomelysin MMP-3 kommt im Rahmen des kardialen Remodelings eine Schlüsselrolle als Aktivator anderer MMP's zu (Woessner 1994). Darüber hinaus besitzt sie die Eigenschaft, ein großes Spektrum an EZM-Bestandteilen, beispielsweise Fibronectin, Vitronectin und einige Kollagentypen zu degradieren. In unserer Studie fand sich im Serum sowie in der immunhistochemischen Färbung bei der DCMi-Gruppe ein tendenzieller Anstieg der MMP-3 im Gegensatz zur DCM-Gruppe. Pauschinger et al. fanden analog dazu in einem Maus-Myokarditismodell unter anderem eine gesteigerte Bildung der MMP-3, verglichen zur gesunden Kontrollgruppe (Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2004). Ebenso zeigten Li et al. eine signifikante Hochregulation der MMP-3 einhergehend mit erhöhter Expression von TNF- α im Rahmen der murinen Myokarditis (Li, Schwimbeck et al. 2002). Ein statistisch signifikantes Niveau wird in unserem Versuch nicht erreicht, doch auch in diesem Fall scheint die Inflammation über den Weg der proinflammatorischen Zytokine die Expression der MMP's zu erhöhen und die Aktivierungskaskade über MMP-3 zum Teil zu steuern. Gestützt wird diese These von der signifikanten Korrelation zwischen dem Zytokin IL-8 und der MMP-3. Ries und Petrides et al. zeigten eine Erhöhung der MMP-3 im Rahmen von Entzündungsreaktionen über den Weg der Zytokinkaskade (Ries and Petrides 1995).

Weiterhin hebt sich die Serum-MMP-3 der DCM-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe ab und ist so mit wissenschaftlichen Ergebnissen der früheren Studien von Spinale et al., Li YY et al. sowie Thomas et al. vereinbar (Thomas, Coker et al. 1998; Li, McTiernan et al. 2000; Spinale, Coker et al. 2000). Die alleinige Verschlechterung der linksventrikulären Funktion führt zu einer Disparität im MMP/TIMP-System, aus welchem eine dauerhafte Hochregulation der proteolytischen MMP's resultiert.

Die Gruppe der Herzinfarktpatienten hebt sich mehr als 1,5 fach von der Kontrollgruppe ab und liegt mit $p=0,055$ sehr nahe am Signifikanzniveau. Letztendlich zeigt die im Trend höhere Expression von MMP-3 im Serum beim AMI, dass ein vermehrtes Remodeling im Kollagengerüst abläuft, was für den Herzinfarkt mit seiner teilweise sehr großen Nekrosezone bewiesen ist (Gao and Li 2004; Yan, Wu et al. 2004).

Die beiden Forschungsgruppen von Gao et al. und Yan et al. belegten jeweils einen signifikanten Anstieg des MMP-3 Serumlevels bei Patienten mit einem akuten

Myokardinfarkt im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse decken sich hinsichtlich der Erhöhung der MMP-3 beim AMI annähernd mit unseren, da Yan et al. eine zweifache Erhöhung beschreibt, die unserem Ergebnis sehr nahe kommt. Ein Fehlen der Signifikanz in unserem Fall kann der unterschiedlichen Struktur beider Gruppen zugrunde liegen. Alter des Infarktes sowie das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe spielen auch bei der MMP-3 Expression eine Rolle, die somit zu Abweichungen führen kann (Kelly, Khan et al. 2008).

Eine weitere wichtige Untergruppe der Matrixmetalloproteinasen sind die Gelatinasen, welche im Rahmen der Kollagendegradation die weitere Aufspaltung der Gelatinfragmente durchführen, die Aufspaltung von Kollagen IV der Basalmembran, aber auch die Aktivierung weiterer MMP's übernehmen können.

Vergangene Arbeiten präsentierten eine vermehrte Expression der Gelatinasen im Rahmen von chronischen myokardialen Erkrankungen mit Pumpfunktionsstörungen, wie beispielsweise der DCM, im Vergleich zu gesunden Herzen. So beschrieb Moshal et al. einen signifikanten Anstieg der MMP-9 im Endstadium der chronischen Herzinsuffizienz (Moshal, Tyagi et al. 2005). Auch Spinale et al. fanden bei der nichtischämischen DCM eine Hochregulation der Expression von den beiden Gelatinasen sowie der MMP-3 (Spinale, Coker et al. 2000). Ergänzend dazu zeigten Sivakumar et al. zu dem Anstieg der Gelatinasen bei Patienten mit DCM auch einen Anstieg von TIMP-1 und TIMP-2, verglichen zu gesunden Herzen (Sivakumar, Gupta et al. 2008). All diese Studien beleuchteten jedoch lediglich den Unterschied zwischen einer DCM und gesundem Myokardgewebe und ließen den Aspekt der chronischen Inflammation unberücksichtigt. Somit sind diese Studienergebnisse nur bedingt zum Vergleich mit unseren Ergebnissen zu verwenden.

Die Bestimmung der Matrixmetalloproteinase-9 im Serum und in den Biopsaten sowie die Bestimmung der Matrixmetalloproteinase-2 in den Biopsien zeigte in allen Fällen nur einen tendenziellen Anstieg von der DCM zur DCMi. In der Immunhistologie kann von einem leichten Trend des Anstieges bei der DCMi gesprochen werden, im Serum gibt es praktisch keinen statistisch bedeutsamen Unterschied mehr. Möglicherweise hat die Entzündungsreaktion allein keinen ausreichend großen Effekt auf die Hochregulation der Gelatinasen. Bereits durch die stark eingeschränkte Pumpfunktion bei DCM wurde mehrfach der Anstieg der Gelatinasen beschrieben (Wilson, Gunasinghe et al. 2002; Abou-Raya, Naim et al. 2004; George, Patal et al. 2005), so dass der zusätzliche Faktor der Inflammation an dieser Stelle keine Hochregulation in signifikantem Ausmaß bewerkstelligen kann.

Vor dem Hintergrund der Serummessungen muss weiterhin in Bezug auf die MMP-9 eine stark verminderte Halbwertszeit diskutiert werden. Die Serumversuche legen nahe, dass an dieser Stelle ein möglicher methodischer Fehler nicht ausgeschlossen ist, da das Enzym MMP-9 äußerst sensibel auf wiederholte Frier- und Tauzyklen reagiert sowie auf eine zu hohe Lagerungstemperatur. Laut Rouy et al. schützt selbst eine Lagerung des Plasmas bzw. Serums bei -80°C die MMP-9 vor einer Degradation über einen längeren Zeitraum nicht (Rouy, Ernens et al. 2005). Da die Archivierung und Lagerung unserer in der Studie verwendeten DCM/DCMi-Proben sich zeitlich deutlich von denen der Kontrollgruppe und der Myokardinfarktpatienten unterschied, könnte hier eine Proteolyse stattgefunden haben.

4.2.2. Tissueinhibitoren der MMP's

Der wichtigste Gegenspieler der Matrixmetalloproteinasen sind deren *Tissueinhibitoren*. Dem TIMP-1 kommt dabei die Rolle des wichtigsten endogenen Inhibitors der MMP-1 zu. Ihm wird ein gewisser Schutz des myokardialen Gewebes nachgesagt, welcher die Degradation von Kollagenen verhindert, demzufolge die normale Ventrikelstruktur aufrechterhält und somit der LV-Dilatation entgegenwirkt (Roten, Nemoto et al. 2000). Ist dieses sensible Verhältnis aus MMP's zu TIMP's verschoben, setzt sich ein verstärktes kardiales Remodeling in Gang, welches möglicherweise verheerende Folgen nach sich zieht und zur Genese einer dilatativen Kardiomyopathie beitragen kann (Li, Schwimmbeck et al. 2002; Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2004). Bei einer kardialen Inflammation ist wiederholt eine signifikante Downregulation von TIMP-1, aber auch anderen TIMP's, beschrieben (Tyagi, Campbell et al. 1996; Li, Feldman et al. 1998; Thomas, Coker et al. 1998; Li, Schwimmbeck et al. 2002). Wir fanden in den Serumversuchen ein Abfallen der TIMP-1 Konzentration bei der inflammatorischen Kardiomyopathie. Daher deckt sich unser Ergebnis mit den Ergebnissen von Tyagi et al. 1996, Thomas et al. 1998 und Li YY et al. 1998, die in der Gesamtheit ebenfalls einen absoluten Abfall von TIMP-1, aber auch von TIMP-3 und -4, während einer kardialen Entzündungsreaktion beschrieben (Tyagi, Campbell et al. 1996; Li, Feldman et al. 1998; Thomas, Coker et al. 1998). Auch zwei weitere Studien von Pauschinger et al. sowie Li et al. stellten dar, dass Messungen der RNA mittels PCR ein signifikantes Absinken von TIMP-1 bei Wildtype-Mausstämmen im Rahmen einer myokardialen Entzündungsreaktion zeigen. Somit wird in diesem Fall das MMP/TIMP-System derart dysreguliert, dass hier eine absolute Verminderung von TIMP-1 im Gegensatz zu den hochregulierten MMP's vorzufinden ist (Li, Schwimmbeck et al. 2002; Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2004).

Die AMI-Gruppe wies signifikant mehr zirkulierendes TIMP-1 im Serum auf als die Blutspendergruppe. Unter Beleuchtung der vorangegangenen Forschungen steht dieses Ergebnis im Einklang mit der Literatur (Giansante, Fiotti et al. 2007). Giansante et al. publizierten in ihrer Arbeit eine signifikante Erhöhung des Serumlevels von TIMP-1 bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt gegenüber Patienten mit NSTEMI oder instabiler Angina pectoris. Damit ist ein signifikanter Unterschied zwischen AMI-Patienten und gesunden Personen nachvollziehbar. In diesem Fall könnte der *Tissue Inhibitor* möglicherweise den zuvor beschriebenen protektiven Effekt bewirken. Um eine überschießende Kollagen Degradation im Infarktgebiet zu unterbinden, wird kompensatorisch die Expression von TIMP-1 hochreguliert (Gomis-Ruth, Maskos et al. 1997; Roten, Nemoto et al. 2000). Da in diesem Fall trotz der vermehrten Anwesenheit von TIMP-1 eine signifikante Kollagen Degradation abläuft, wird hier gezeigt, dass letztlich die globale proteolytische Aktivität des MMP/TIMP-Systems immer im Verhältnis der aktiven MMP's zu deren Inhibitoren zu sehen ist. Bei einem molekularen Inhibitionsverhältnisses von 1:1 spielt möglicherweise nur das Überwiegen der freien und aktiven MMP's eine entscheidende Rolle (Gomis-Ruth, Maskos et al. 1997; Spinale, Coker et al. 2000).

Die immunhistologische Anfärbung der *Tissueinhibitoren* der Matrixmetalloproteinasen, TIMP-1 und TIMP-4, ergab für den TIMP-1 einen signifikanten Unterschied zwischen der DCM- und der DCMi-Gruppe. Die Patienten mit einer inflammatorischen DCM exprimierten bedeutend mehr TIMP-1 im Herzmuskelgewebe als Patienten ohne myokardiale Inflammation. Das dysregulierte System der MMP's und TIMP's scheint durch eine zeitgleiche Erhöhung der TIMP's den Versuch der MMP-Inhibition zu unternehmen, um einem überschießenden Wirksamwerden der Matrixmetalloproteinasen entgegenzuwirken und die Kollagen Degradation im Herzen zu begrenzen. Dieser Sachverhalt führt trotz dessen zu einem relativen Anstieg der MMP's gegenüber den TIMP's und somit zu einer Zunahme der proteolytischen Prozesse. Mehrere vergangene Arbeiten an murinen Modellen zeigten ebenfalls einen deutlichen Anstieg der TIMP's, insbesondere TIMP-1, in immunhistologischen Schnitten, aber auch in der absoluten RNA-Kopienzahl bei einer aktiven Entzündung im Myokard (Heymans, Pauschinger et al. 2006; Crocker, Frausto et al. 2007). Die Arbeitsgruppen von Heymans et al. sowie von Crocker et al. stellten an einem Wildtype-Stamm von Mäusen dar, dass es bei einer Coxsackie-B3 induzierten Myokarditis zu einem signifikanten Anstieg der TIMP-1 RNA kommt. Somit wird das Ergebnis unserer vorliegenden Studie deutlich unterstrichen, da bei einer erhöhten

RNA-Transkription nachfolgend auch eine erhöhte Expression der fertig gestellten Proteine zu erwarten ist.

Ergänzend dazu beschrieben Alexander et al. und Li YY et al. einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen einem Anstieg des TNF- α und einer erhöhten Expression der TIMP-1 (Li, McTiernan et al. 1999; Alexander and Acott 2001). In einer weiteren Arbeit wurde an einem transgenen Mausmodell mit einer Überexpression von TNF- α ein fortschreitendes kardiales Remodeling im Zusammenhang mit signifikant steigenden TIMP-1 Levels präsentiert (Sivasubramanian, Coker et al. 2001). Unsere Ergebnisse zeigen bei einer erheblichen Hochregulation von TNF- α im Serum der DCMi-Patienten zugleich die signifikant erhöhte Expression der TIMP-1 in der Immunhistochemie. Somit stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit der vorhandenen Literatur.

Die Auswertung der Ergebnisse der Immunhistologie unterscheidet sich auffallend von den Ergebnissen der Serumversuche mit TIMP-1. Zwar fand sich dort kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der DCM- zur DCMi-Gruppe, jedoch war eine abfallende Tendenz bei der DCMi vorhanden, die sich mit $p=0,0628$ relativ nahe am Signifikanzniveau bewegte. Da hierfür keine exakt deckungsgleichen Forschungen in der Vergangenheit stattfanden, ist die Interpretation dieses Ergebnisses erschwert. Zum einen ist sicherlich an eine verminderte Halbwertszeit der Enzyme beim Übertritt ins periphere Blut zu denken, was durch eine erhöhte Kontaktfrequenz mit Proteasen im Gegensatz zum Herzmuskelgewebe zu begründen wäre. Dadurch könnte ein initial signifikantes Ergebnis nach kurzer Zeit auf statistisch nicht signifikante Werte vermindert werden. Ist dies der Fall, würden sich wahrscheinlich viele Proteine in ihrer messbaren Expression unterscheiden, abhängig davon, aus welchem Gewebe oder Medium (Serum, Myokardgewebe etc.) sie bestimmt werden.

Selbst vor dem Hintergrund vergangener Forschungsarbeiten, die sowohl den relativen Anstieg der TIMP's bei einer Entzündung publizieren als auch jene Arbeiten, die einen Rückgang der absoluten Expression von TIMP's bei Inflammation offen legen, ist der statistisch signifikante Unterschied in der Immunhistologie als höherwertiger zu betrachten, als der tendenzielle Abfall von TIMP-1 bei den Serumversuchen.

Die Auswertung der Ergebnisse der immunhistologischen Anfärbung von TIMP-4 im kardialen Gewebe erbrachte keinen statistisch verwertbaren Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen, jedoch eine Anstiegstendenz von TIMP-4 bei den inflammatorischen DCM-Patienten. In den bisher überwiegend nur an Mäusen durchgeführten Forschungen in Bezug auf

die kardiale Inflammation konnten die nachfolgend genannten Arbeitsgruppen bei Mäusen, die an einer Coxsackie-B3-Virusmyokarditis erkrankt waren, wiederholt eine Herunterregulation der TIMP-4 RNA beschreiben. In allen Arbeiten wurden erkrankte Mauspopulationen mit herzgesunden Mäusen ohne Pumpschwäche verglichen. Daher sind diese Studien nur begrenzt mit unseren Ergebnissen vergleichbar.

Pauschinger et al. beschreibt die 75%ige Verminderung der TIMP-4 RNA bei Mäusen mit einer Virusmyokarditis im Vergleich zu einer herzgesunden Kontrollgruppe ohne eingeschränkte Pumpfunktion (Pauschinger, Rutschow et al. 2005). Auch Cheung et al. sowie die Arbeitsgruppe um Li et al. zeigten einen signifikanten Abfall der TIMP-4 RNA bei einer Virusmyokarditis am Mausmodell (Li, Schwimmbeck et al. 2002; Cheung, Luo et al. 2006).

In Zusammenschau dieser vorliegenden Publikationen sowie unseren Ergebnissen ist davon auszugehen, dass keine signifikante Hoch- oder Herunterregulation von TIMP-4 bei einer DCMi, verglichen zur DCM, zu finden ist. Die DCM besitzt bereits ein schlecht pumpendes Ventrikelsystem und hat folglich durch den mechanischen Stretch eine umfassende Dysregulation in ihrem MMP/TIMP-System erfahren. Somit wird der Faktor der zusätzlichen Inflammation hier keine signifikante Veränderung herbeiführen.

4.3. Zytokine

Bei der Zytokinbestimmung im Serum mit dem Bio-Plex Cytokine Assay wurde ein Zytokinprofil der acht etablierten Zytokine erstellt. Mit Ausnahme des Interleukin-10 sind alle bestimmten Zytokine proinflammatorisch und so mit unterschiedlicher Funktion in den Weg der Aktivierungskaskade einer Entzündungsreaktion eingebunden. Die Gruppe der DCMi-Patienten zeigte jeweils eine signifikante Erhöhung von IL-6, IL-8 und IL-10 gegenüber den DCM-Patienten. Zudem zeigen die statistisch signifikanten Korrelationen zwischen IL-6 und MMP-1, aber auch IL-8 und MMP-1 und -3, dass wiederholt die proinflammatorischen Zytokine als Aktivator der MMP's gelten. Dieser Zusammenhang wurde wiederholt dargelegt (Chung and Kao 2009; Smith, Guerrero et al. 2009; Zhou, Yan et al. 2009).

Mit diesem Ergebnis wird diese Assoziation einer entzündlichen Myokardinfektion mit der verstärkten Dysregulation im MMP/TIMP-System über den Weg der Zytokinausschüttung untermauert.

Eine Erhöhung in der DCM-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ist möglicherweise durch zurückliegende Entzündungsreaktionen oder durch eine noch ablaufende schwache Entzündungsreaktion mit Myozytolyse zu erklären. Durch die festgelegte Grenze von < 7

CD3⁺ Zellen pro mm² für eine intramyokardiale Entzündungsreaktion fallen mitunter schwache entzündliche Vorgänge im Herzmuskelgewebe aus dieser Gruppe heraus. Doch auch in diesen Fällen sind leicht bis mäßig erhöhte proinflammatorische Zytokine zu erwarten. Insgesamt belegten zahlreiche Studien zum Thema CHF wiederholt eine vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (Tousoulis, Papageorgiou et al. ; Hirota, Izumi et al. 2004; Horio 2006; Blum 2009; Porter and Turner 2009; Wang, Zhou et al. 2009). Die gleichen Aussagen lassen sich durch unsere Ergebnisse der Serum-Zytokinmessungen bei der DCM darlegen.

Beim akuten Myokardinfarkt am Tag 4 zeigt IL-6 einen höheren Anstieg im Bezug zur Kontrollgruppe als die übrigen proinflammatorischen Zytokine. Dieser Sachverhalt könnte damit erklärt werden, dass die übrigen proinflammatorischen Zytokine erst im späteren Verlauf der lokal begrenzten Entzündungsreaktion ansteigen. Beim IL-6 scheint die Anstiegsreaktion deutlich früher zu beginnen. Bereits mehrere Studien belegten, dass IL-6 als geeigneter diagnostischer und prognostischer Marker bei Herzinfarktpatienten eingesetzt werden kann und schon wenige Stunden nach dem Infarkt ereignis relevant im peripheren Blut ansteigt (Suzuki, Saito et al. 2006; Astrom-Olsson, Hedstrom et al. 2007; Ferroni, Rosa et al. 2007).

Auf die Parallelitäten zwischen einer erhöhten TNF- α Expression und dem vermehrten Nachweis von TIMP-1 wurde bereits hingewiesen (Li, McTiernan et al. 1999; Alexander and Acott 2001; Sivasubramanian, Coker et al. 2001). Somit könnte in Zukunft die Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 und TNF-alpha aus dem peripheren Blut einen festen Platz in der Diagnostik sowie in der Verlaufsbeobachtung und der Unterstützung prognostischer Aussagen einnehmen (Ferroni, Rosa et al. 2007).

Das antiinflammatorische IL-10 soll in dem komplexen Regelsystem der Zytokine eine gewisse Gegenspielerfunktion wahrnehmen, um eine übermäßige Dysregulation in Richtung Inflammation zu vermeiden. In unserem Versuch zeigt sich das IL-10 bei der DCMi-Gruppe signifikant im Vergleich zur DCM-Gruppe erhöht. Auch die Gruppe der DCM-Patienten hebt sich signifikant von den Kontrollen ab, was bereits in vergangenen Studien beschrieben wurde. McKenna et al. zeigten 1996 in ihrer Arbeit die signifikante Erhöhung des Interleukin-10 Levels bei Patienten mit DCM gegenüber gesunden Personen (Marriott, Goldman et al. 1996). Die weitere Erhöhung des IL-10 bei der DCMi bestätigt die antiinflammatorische Gegenspielerfunktion dieses Zytokins bei gleichzeitig erhöhten IL-6 und TNF-alpha Werten. Einen verminderten Nachweis von IL-8 im Serum der DCM-Patienten gegenüber gesunden Menschen ist mit der aktuellen Literatur nicht übereinstimmend. Wiederholt wird eine

Hochregulation von IL-8 im Rahmen einer CHF beschrieben (Libetta, Sepe et al. 2007; Rebrov and Tolstov 2007; Tatenkulova, Mareev et al. 2009).

Zusammenfassend wurde hier ein enger Zusammenhang zwischen der Infiltration von zytokinsezernierenden Entzündungszellen, der vermehrten Expression von Matrixmetalloproteinasen und letztendlich einer verstärkten Myokardfibrose gezeigt.

4.4. Myokardiale Entzündung und Herzmuskelfibrose

Bereits an anderer Stelle wurde der Zusammenhang zwischen dem erhöhten MMP-Level und der signifikant vermehrten Fibrose im Herzmuskelgewebe der DCMi-Patienten genannt. Die Fibrosefläche in den Herzmuskelbiopsaten korreliert statistisch bedeutsam mit dem Maß der Infiltration von CD3⁺ Zellen/mm².

Auf der anderen Seite muss betont werden, dass auch die DCM-Gruppe ohne aktive Entzündung eine *Areafraction* von 0,42% zeigt, welche dem fibrosierten Anteil am gesamten Myokardgewebe entspricht. Da in unserer Arbeit aus ethischen Gründen keine gesunden Herzen biopsiert wurden, ist der Fibrosegrad von völlig gesundem Herzmuskelgewebe rein spekulativer Natur. Sicherlich ist es anzunehmen, dass die DCM-Patienten zum Teil eine akute Myokarditis durchgemacht haben könnten und ihre Kollagendegradationsprozesse nur über eine kurze Zeit verstärkt abgelaufen sind. Weiterhin ist anzunehmen, dass nach dem Rückgang der Infiltration auch ein deutlicher Rückgang des Kollagenumbaus stattgefunden hat. Zudem ist es hinreichend bekannt, dass auch bei CHF ohne nachweisliche Inflammation ein ausgeprägt dysreguliertes MMP/TIMP-System vorzufinden ist (Deschamps and Spinale 2006; Yang, Zhang et al. 2006; Jordan, Roldan et al. 2007; Radauceanu, Ducki et al. 2008).

Durch die von uns dargelegte statistisch signifikante Korrelation stehen die myokardiale Entzündungsreaktion und eine Herzmuskelfibrose im Rahmen eines verstärkten Remodelings in unmittelbarem Zusammenhang.

Kindermann et al. beschrieben in einer Studie das Vorliegen einer immunhistochemisch nachgewiesenen Entzündungsreaktion als prognostisch signifikanten Vorhersagewert für die Wahrscheinlichkeit des kardialen Todes bzw. einer Herztransplantation nach einer durchgemachten suspekten Myokarditis (Kindermann, Kindermann et al. 2008). Ergänzend dazu belegen Radauceanu et al. einen statistisch signifikanten Zusammenhang der Serum MMP-1 bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz und einem hohen Mortalitätsrisiko (Radauceanu, Ducki et al. 2008). Zieht man die von uns gefundenen Ergebnisse hinzu, lässt sich aufzeigen, dass eine aktive Inflammation im Myokard über die Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen in das MMP/TIMP-System eingreift. Dieser Effekt führt zu

einer exzessiven Degradation der EZM, die als Ergebnis ein fibrosiertes und schlecht pumpendes Herz verursacht und damit eine ungünstigere NYHA-Klasse beim Patienten herbeiführt. Auch diese beschreiben Kindermann et al. neben der Inflammation als einen genauen Vorhersagewert für ein schlechtes Outcome.

Bei der ablaufenden Kollagenspaltung entsteht als ein Spaltungsendprodukt das ICTP. Bei sämtlichen Krankheitsprozessen, die mit einer Dysregulation im MMP/TIMP-System einhergehen, wird ein über der Norm erhöhter ICTP-Spiegel im peripheren Blut gemessen. Alle Gruppen mit Pathologien des Myokardgewebes (DCM, DCMi und AMI) haben entweder tendenziell oder signifikant mehr zirkulierendes ICTP im Serum als die Kontrollgruppe. Das beweist, dass hier ein deutlich verstärkter Kollagenumbauprozess stattfindet.

Die DCMi-Gruppe zeigte bei den Serumversuchen einen Mittelwert, der leicht unter der DCM-Gruppe liegt ohne statistische Signifikanz. In diesem Fall ist ein möglicher Erklärungsansatz, dass im Zusammenhang mit der aktiven Inflammation der Kollagenabbau bei der DCMi bereits stärker vorangeschritten ist als bei einer DCM. Bei dem von uns beobachteten Patientenkollektiv ist möglicherweise ein Großteil des Kollagenumbauprozesses bereits abgelaufen, da die Diagnose bei den meisten Patienten schon über mehrere Monate bekannt ist. Somit steht hier mit hoher Wahrscheinlichkeit bei den stark fibrosierten Herzen nicht mehr genug „gesunde“ Substanz zum Ab- und Umbau bereit. Daher ist der Fibrosierungsvorgang aus einem Mangel an Substrat wieder herunterreguliert. Gestützt wird diese These von dem Ergebnis der Arbeitsgruppe Jordan et al., die bei einer CHF im Endstadium signifikant niedrigere MMP-1 Spiegel im Serum messen konnten (Jordan, Roldan et al. 2007). Es wird postuliert, dass diese Patienten wieder einen normalen Kollagenumsatz vorweisen. Ob die Begründung ein Mangel an degradationsfähigem Kollagen bei stark umgebauten Herzen ist, bleibt weiterhin unklar.

Vorangegangene Studien zeigten bislang den Anstieg von ICTP im Serum bei Patienten mit DCM. Schwartzkopff et al. beschrieben einen signifikanten Anstieg, Timonen et al. zeigten keine Signifikanz der ICTP-Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch eine positive Korrelation mit den Zytokinleveln im Serum (Schwartzkopff, Fassbach et al. 2002; Timonen, Magga et al. 2008). Der genaue Verlauf des ICTP im Serum von DCMi-Patienten bleibt daher weiterhin unklar.

Die Gruppe der Herzinfarktpatienten hebt sich signifikant von den beiden DCM-Gruppen ab, was wiederum mit dem Akutereignis und dem damit zusammenhängenden und zeitlich sehr

kurzfristigen Kollagenumbau zu erklären ist. Im Gegensatz zu dem chronischen Geschehen bei der DCM wird hier mutmaßlich mehr Kollagen in kürzerer Zeit degradiert. Dieses Ergebnis stimmt mit den Veröffentlichungen von vergangenen Studien überein, da hier wiederholt von mehreren Arbeitsgruppen ein deutlicher, sogar signifikanter Anstieg von ICTP im Serum von Herzinfarktpatienten beschrieben wurde. Cerisano et al. publizierten, dass bei Herzinfarktpatienten einige Tage nach dem Akutereignis ein deutlicher Anstieg des ICTP bei Patienten zu verzeichnen ist, bei denen parallel auch das BNP signifikant anstieg (Cerisano, Valenti et al. 2008). Eine selbige Konstellation belegten unsere Versuche. Weiterhin machten Magga et al. bei ihren Versuchen deutlich, dass das ICTP-Level bei 65% der Patienten am vierten Tag nach einem akuten Herzinfarkt statistisch bedeutsam ansteigt und überdies eine signifikante positive Korrelation zu den proBNP-Serumleveln auftritt (Magga, Puhakka et al. 2004). Murakami et al. sahen am zweiten Tag nach einem akuten Myokardinfarkt eine Erhöhung des Serum-ICTP-Levels mit einem Maximum am Tag 5, womit unsere Ergebnisse der ICTP-Messungen gestützt werden (Murakami, Kusachi et al. 1998).

4.5. uPA als MMP-Aktivator

Ein weiterer Aktivator im MMP/TIMP-System ist das durch uPA aktivierte Plasmin, eine Komponente aus dem Gerinnungssystem. Die Arbeit von Woodiwiss und Tsoetsi et al. erbrachte, dass ein über uPA aktiviertes Plasmin MMP-3 und -9 zu aktivieren vermag (Woodiwiss, Tsoetsi et al. 2001). Unsere Serummessungen ergaben, dass sowohl das uPA als auch die MMP-3 einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufwiesen. Da jedoch zwischen beiden Parametern keine Korrelation besteht und das uPA im Serum tendenziell einen Abfall der DCMi-Gruppe gegenüber der DCM-Gruppe darlegt, bleibt es weiterhin unklar, ob die Entzündungsreaktion einen relevanten Einfluss über den Weg des uPA auf die MMP's nimmt. Weil uPA durch die Plasminogenaktivierung ein wesentliches Glied in der Kette der MMP-aktivierenden Faktoren ist, ist ein Anstieg im peripheren Blut bei Pumpschwäche mit einhergehendem Umbau der Matrix, wie bei der DCM, bereits beschrieben (Heymans, Luttun et al. 1999; Heymans, Pauschinger et al. 2006). Heymans et al. fanden heraus, dass bei einer Inaktivierung von uPA und damit verbundenem Fehlen von hohen MMP-Levels die Dilatation der Ventrikel und die Ventrikelruptur in einem wesentlichen Ausmaß reduziert werden kann. In Phasen von hoher Kollagendegradation müssen die dazu benötigten MMP's aktiviert werden. In diesem Punkt scheint das uPA als ein Schlüsselenzym eine bedeutende Rolle zu spielen. Hier wiesen Heymans et al. in ihrer Studie ebenfalls nach, dass bei Coxackie-B3 Virusmyokarditis im Wildtypstamm von Mäusen bei

hohen uPA-Leveln auch gleichzeitig hohe Level von MMP's und TIMP's gemessen wurden. Somit wurde ein unmittelbarer Zusammenhang durch den Aktivierungsweg der Matrixmetalloproteinasen mit uPA aufgezeigt.

4.6. Zusammenfassung

Es konnte in der vorliegenden Studie klar gezeigt werden, dass im Rahmen einer myokardialen Entzündungsreaktion, die mitunter schon über lange Zeit bestehen kann, die Dysregulation im System der Matrixmetalloproteinasen und ihrer Inhibitoren als auch die Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) schneller und im höheren Maße voranschreitet als in einem dilatierten Herzen ohne eine Inflammation.

Beide Gruppen mit dilatativer Kardiomyopathie haben die Gemeinsamkeit der deutlich eingeschränkten Pumpfunktion. Des Weiteren besteht eine über das gesunde Maß hinausführende Erweiterung der Herzen. Dieser Sachverhalt per se führt schon zu einer Disparität im MMP/TIMP-System und setzt einen fatalen Kreislauf der Kollagen Degradation in Gang.

Besteht zusätzlich noch eine chronische Inflammation im Myokardgewebe, trägt diese über eine Zytokinkaskade zu einer weiteren Dysregulation in diesem System bei. Das Ergebnis sind erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinasen und als Auswirkung dessen ein signifikant vermehrter Fibrosegrad des Herzmuskelgewebes bei den DCMi-Patienten. Dieser komplexe Zusammenhang wird weiterhin durch die Korrelation von MMP's und IL-6 mit den verschiedenen hämodynamischen Parametern gestützt. Insgesamt zeigten mehrere bedeutende Zytokine eine signifikante Hochregulation bei der DCMi im Vergleich zur DCM.

Die genaue Regulation der TIMP's konnte abschließend nicht hinreichend dargestellt werden. Letztendlich wird eine Dysbalance in diesem System auch bei kompensatorisch hochregulierten TIMP's zustande kommen. Die für das Gewebe schädlichen MMP's sind die freien Matrixmetalloproteinasen, welche durch die relative Verminderung der TIMP's nicht inhibiert werden können. Ihr Überwiegen gegenüber den TIMP's bringt den schädlichen Effekt für die EZM.

Weiterhin haben die Serumversuche gezeigt, dass bei Krankheitentitäten wie dem akuten Myokardinfarkt die gleichen Dysregulationen im MMP/TIMP-System vorzufinden sind. Diese zeigen sich im Serum teilweise mit signifikant höherem Expressionsmuster als in der DCM und der DCMi. Ein möglicher Erklärungsansatz ist hier die Komponente der Zeit. Das

Remodeling in der Infarktnarbe findet in weitaus kürzerem Zeitraum statt, da es sich hier um ein Akutereignis handelt.

In dieser Arbeit ist erstmals der gesamte Effekt der myokardialen Inflammation bei einer inflammatorischen Kardiomyopathie im Vergleich zu einer DCM dargestellt worden. Die Zusammenhänge zwischen Entzündungsreaktion, Zytokinkaskade und nachfolgender Disparität zwischen MMP's und TIMP's konnte im Serum und in den Biopsien belegt werden. Die dadurch entstehende vermehrte Herzmuskelfibrose als auch die kompromittierenden Einflüsse auf die Hämodynamik der Ventrikel konnte in einem neuen Ausmaß bewiesen werden.

5. Literaturverzeichnis

- (1987). "Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group." N Engl J Med **316**(23): 1429-1435.
- (1994). "A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). CIBIS Investigators and Committees." Circulation **90**(4): 1765-1773.
- (1999). "The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial." Lancet **353**(9146): 9-13.
- (1999). "Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)." Lancet **353**(9169): 2001-2007.
- Abou-Raya, S., A. Naim, et al. (2004). "Cardiac matrix remodelling in congestive heart failure: the role of matrix metalloproteinases." Clin Invest Med **27**(2): 93-100.
- Aimes, R. T. and J. P. Quigley (1995). "Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments." J Biol Chem **270**(11): 5872-5876.
- Alexander, J. P. and T. S. Acott (2001). "Involvement of protein kinase C in TNF α regulation of trabecular matrix metalloproteinases and TIMPs." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(12): 2831-2838.
- Aretz, H. T. (1987). "Myocarditis: the Dallas criteria." Hum Pathol **18**(6): 619-624.
- Aretz, H. T., M. E. Billingham, et al. (1987). "Myocarditis. A histopathologic definition and classification." Am J Cardiovasc Pathol **1**(1): 3-14.
- Astrom-Olsson, K., E. Hedstrom, et al. (2007). "Dissociation of the Inflammatory Reaction following PCI for Acute Myocardial Infarction." J Invasive Cardiol **19**(11): 452-456.
- Baker, A. H., A. B. Zaltsman, et al. (1998). "Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis." J Clin Invest **101**(6): 1478-1487.
- Bendeck, M. P., C. Irvin, et al. (1996). "Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury." Circ Res **78**(1): 38-43.
- Birner, C. M., C. Ulucan, et al. (2007). "Head-to-head comparison of BNP and IL-6 as markers of clinical and experimental heart failure: Superiority of BNP." Cytokine **40**(2): 89-97.
- Blum, A. (2009). "Heart failure--new insights." Isr Med Assoc J **11**(2): 105-111.

- Bowles, N. E., P. J. Richardson, et al. (1986). "Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy." Lancet **1**(8490): 1120-1123.
- Brilla, C. G., H. Rupp, et al. (1995). "The renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial collagen matrix remodelling in congestive heart failure." Eur Heart J **16 Suppl O**: 107-109.
- Caforio, A. L., C. Baboonian, et al. (1997). "Postviral autoimmune heart disease--fact or fiction?" Eur Heart J **18**(7): 1051-1055.
- Carlyle, W. C., A. W. Jacobson, et al. (1997). "Delayed reperfusion alters matrix metalloproteinase activity and fibronectin mRNA expression in the infarct zone of the ligated rat heart." J Mol Cell Cardiol **29**(9): 2451-2463.
- Cerisano, G., R. Valenti, et al. (2008). "Relationship of sustained brain natriuretic peptide release after reperfused acute myocardial infarction with gated SPECT infarct measurements and its connection with collagen turnover and left ventricular remodeling." J Nucl Cardiol **15**(5): 644-654.
- Cheung, C., H. Luo, et al. (2006). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis." Cardiovasc Pathol **15**(2): 63-74.
- Chung, A. S. and W. J. Kao (2009). "Fibroblasts regulate monocyte response to ECM-derived matrix: the effects on monocyte adhesion and the production of inflammatory, matrix remodeling, and growth factor proteins." J Biomed Mater Res A **89**(4): 841-853.
- Cleutjens, J. P., J. C. Kandala, et al. (1995). "Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction." J Mol Cell Cardiol **27**(6): 1281-1292.
- Cohn, J. N., R. Ferrari, et al. (2000). "Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling." J Am Coll Cardiol **35**(3): 569-582.
- Creemers, E. E., J. P. Cleutjens, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?" Circ Res **89**(3): 201-210.
- Crocker, S. J., R. F. Frausto, et al. (2007). "Amelioration of coxsackievirus B3-mediated myocarditis by inhibition of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1." Am J Pathol **171**(6): 1762-1773.
- Danielsen, C. C., H. Wiggers, et al. (1998). "Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion." J Mol Cell Cardiol **30**(7): 1431-1442.
- Dec, G. W., Jr., I. F. Palacios, et al. (1985). "Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome." N Engl J Med **312**(14): 885-890.

- Deschamps, A. M. and F. G. Spinale (2006). "Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation." Cardiovasc Res **69**(3): 666-676.
- Drummond, A. H., P. Beckett, et al. (1999). "Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer." Ann N Y Acad Sci **878**: 228-235.
- Ducharme, A., S. Frantz, et al. (2000). "Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction." J Clin Invest **106**(1): 55-62.
- Eghbali, M. (1992). "Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation." Basic Res Cardiol **87 Suppl 2**: 183-189.
- Eghbali, M., R. Tomek, et al. (1991). "Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors." Circ Res **69**(2): 483-490.
- Felix, S. B. (1996). "[Prognosis of heart failure--value of drug therapy]." Z Kardiol **85 Suppl 4**: 1-7.
- Ferroni, P., A. Rosa, et al. (2007). "Prognostic significance of interleukin-6 measurement in the diagnosis of acute myocardial infarction in emergency department." Clin Chim Acta **381**(2): 151-156.
- Francis, G. S. (2001). "Pathophysiology of chronic heart failure." Am J Med **110 Suppl 7A**: 37S-46S.
- Gao, B. and Z. C. Li (2004). "[Association between serum matrix metalloproteinase-3 concentration and the promoter 5A/6A polymorphism in patients with coronary heart disease]." Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue **16**(9): 536-539.
- Gearing, A. J., P. Beckett, et al. (1994). "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases." Nature **370**(6490): 555-557.
- George, J., S. Patal, et al. (2005). "Circulating matrix metalloproteinase-2 but not matrix metalloproteinase-3, matrix metalloproteinase-9, or tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predicts outcome in patients with congestive heart failure." Am Heart J **150**(3): 484-487.
- Giansante, C., N. Fiotti, et al. (2007). "In-hospital outcome of patients with acute coronary syndrome: relationship with inflammation and remodeling markers." J Cardiovasc Med (Hagerstown) **8**(8): 602-607.
- Gomis-Ruth, F. X., K. Maskos, et al. (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1." Nature **389**(6646): 77-81.
- Greene, J., M. Wang, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4." J Biol Chem **271**(48): 30375-30380.

- Grimm, D., E. P. Kromer, et al. (1998). "Regulation of extracellular matrix proteins in pressure-overload cardiac hypertrophy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition." *J Hypertens* **16**(9): 1345-1355.
- Gunes, Y., B. Okcun, et al. (2008). "Value of brain natriuretic peptide after acute myocardial infarction." *Anadolu Kardiyol Derg* **8**(3): 182-187.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, et al. (1994). "Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)." *J Cell Sci* **107** (Pt 9): 2373-2379.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, et al. (1992). "Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum." *FEBS Lett* **298**(1): 29-32.
- Heim, A., M. Stille-Siegener, et al. (1994). "Enterovirus-induced myocarditis: hemodynamic deterioration with immunosuppressive therapy and successful application of interferon-alpha." *Clin Cardiol* **17**(10): 563-565.
- Heymans, S., A. Luttun, et al. (1999). "Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure." *Nat Med* **5**(10): 1135-1142.
- Heymans, S., M. Pauschinger, et al. (2006). "Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis." *Circulation* **114**(6): 565-573.
- Hirohata, S., S. Kusachi, et al. (1997). "Time dependent alterations of serum matrix metalloproteinase-1 and metalloproteinase-1 tissue inhibitor after successful reperfusion of acute myocardial infarction." *Heart* **78**(3): 278-284.
- Hirota, H., M. Izumi, et al. (2004). "Circulating interleukin-6 family cytokines and their receptors in patients with congestive heart failure." *Heart Vessels* **19**(5): 237-241.
- Hoppe, U. C., M. Bohm, et al. (2005). "[Guidelines for therapy of chronic heart failure]." *Z Kardiol* **94**(8): 488-509.
- Horio, T. (2006). "[Pathophysiological role of cytokines in heart failure]." *Nippon Rinsho* **64**(5): 843-847.
- Hufnagel, G., S. Pankuweit, et al. (1998). "[Therapy of dilated cardiomyopathies with and without inflammation]." *Med Klin (Munich)* **93**(4): 240-251.
- Hufnagel, G., S. Pankuweit, et al. (2000). "The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results." *Herz* **25**(3): 279-285.
- Inoue, T., T. Kato, et al. (2003). "Circulating matrix metalloproteinase-1 and -3 in patients with an acute coronary syndrome." *Am J Cardiol* **92**(12): 1461-1464.

- Jordan, A., V. Roldan, et al. (2007). "Matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor, TIMP-1, in systolic heart failure: relation to functional data and prognosis." J Intern Med **262**(3): 385-392.
- Kahari, V. M. and U. Saarialho-Kere (1997). "Matrix metalloproteinases in skin." Exp Dermatol **6**(5): 199-213.
- Kai, H., H. Ikeda, et al. (1998). "Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes." J Am Coll Cardiol **32**(2): 368-372.
- Kawai, S., H. Kasuya, et al. (1988). "Three autopsied cases of postmyocarditic cardiomegaly. Comparison with dilated cardiomyopathy." Jpn Heart J **29**(6): 809-821.
- Kelly, D., G. Cockerill, et al. (2007). "Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study." Eur Heart J **28**(6): 711-718.
- Kelly, D., S. Khan, et al. (2008). "Circulating stromelysin-1 (MMP-3): a novel predictor of LV dysfunction, remodelling and all-cause mortality after acute myocardial infarction." Eur J Heart Fail **10**(2): 133-139.
- Kim, H. E., S. S. Dalal, et al. (2000). "Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction." J Clin Invest **106**(7): 857-866.
- Kindermann, I., M. Kindermann, et al. (2008). "Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis." Circulation **118**(6): 639-648.
- Knauper, V., S. Cowell, et al. (1997). "The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction." J Biol Chem **272**(12): 7608-7616.
- Kubota, T., C. F. McTiernan, et al. (1997). "Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha." Circ Res **81**(4): 627-635.
- Kuhl, U., B. Daun, et al. (1992). "[Dilated cardiomyopathy--a chronic myocarditis? Immunohistological characterization of lymphocytic infiltrates]." Herz **17**(2): 97-106.
- Kuhl, U., M. Noutsias, et al. (1995). "Immunohistochemistry in dilated cardiomyopathy." Eur Heart J **16 Suppl O**: 100-106.
- Kuhl, U., M. Noutsias, et al. (1994). "Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy." J Card Fail **1**(1): 13-25.
- Kuhl, U., M. Noutsias, et al. (1996). "Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy." Heart **75**(3): 295-300.

- Kuhl, U., M. Pauschinger, et al. (2003). "Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction." Circulation **107**(22): 2793-2798.
- Kunkel, B., M. Schneider, et al. (1982). "[Morphology of myocardial biopsies and their clinical significance]." Z Kardiol **71**(12): 787-794.
- Lee, A. A., T. Delhaas, et al. (1999). "Differential responses of adult cardiac fibroblasts to in vitro biaxial strain patterns." J Mol Cell Cardiol **31**(10): 1833-1843.
- Levi, G., S. Scalvini, et al. (1988). "Coxsackie virus heart disease: 15 years after." Eur Heart J **9**(12): 1303-1307.
- Li, J., P. L. Schwimmbeck, et al. (2002). "Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction." Cardiovasc Res **56**(2): 235-247.
- Li, Y. Y., A. M. Feldman, et al. (1998). "Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart." Circulation **98**(17): 1728-1734.
- Li, Y. Y., Y. Q. Feng, et al. (2000). "Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12746-12751.
- Li, Y. Y., T. Kadokami, et al. (2002). "MMP inhibition modulates TNF-alpha transgenic mouse phenotype early in the development of heart failure." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(3): H983-989.
- Li, Y. Y., C. F. McTiernan, et al. (1999). "Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells." Cardiovasc Res **42**(1): 162-172.
- Li, Y. Y., C. F. McTiernan, et al. (2000). "Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling." Cardiovasc Res **46**(2): 214-224.
- Libetta, C., V. Sepe, et al. (2007). "Intermittent haemodiafiltration in refractory congestive heart failure: BNP and balance of inflammatory cytokines." Nephrol Dial Transplant **22**(7): 2013-2019.
- Lijnen, P. J., V. V. Petrov, et al. (2001). "Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **2**(2): 117-122.
- Liu, Y. E., M. Wang, et al. (1997). "Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4)." J Biol Chem **272**(33): 20479-20483.
- Magga, J., M. Puhakka, et al. (2004). "Atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and serum collagen markers after acute myocardial infarction." J Appl Physiol **96**(4): 1306-1311.

- Maisch, B. (1998). "[Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force--more questions than answers?]." Med Klin (Munich) **93**(4): 199-209.
- Makela, M., T. Salo, et al. (1998). "MMP-9 from TNF alpha-stimulated keratinocytes binds to cell membranes and type I collagen: a cause for extended matrix degradation in inflammation?" Biochem Biophys Res Commun **253**(2): 325-335.
- Maron, B. J., J. A. Towbin, et al. (2006). "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention." Circulation **113**(14): 1807-1816.
- Marriott, J. B., J. H. Goldman, et al. (1996). "Abnormal cytokine profiles in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives." Heart **75**(3): 287-290.
- Matsumori, A. and C. Kawai (1982). "An animal model of congestive (dilated) cardiomyopathy: dilatation and hypertrophy of the heart in the chronic stage in DBA/2 mice with myocarditis caused by encephalomyocarditis virus." Circulation **66**(2): 355-360.
- Matusaka, H., M. Ikeuchi, et al. (2005). "Selective disruption of MMP-2 gene exacerbates myocardial inflammation and dysfunction in mice with cytokine-induced cardiomyopathy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(5): H1858-1864.
- Mauviel, A. (1993). "Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression." J Cell Biochem **53**(4): 288-295.
- Meng, X. H., Y. Wang, et al. (2004). "Dynamic changes in myocardial matrix metalloproteinase activity in mice with viral myocarditis." Chin Med J (Engl) **117**(8): 1195-1199.
- Mestroni, L., D. Miani, et al. (1990). "Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy." Am J Cardiol **65**(22): 1449-1453.
- Mollmann, H., H. Nef, et al. (2009). "Highlights of the hotline sessions presented at the scientific sessions 2008 of the American Heart Association." Clin Res Cardiol **98**(1): 1-7.
- Moshal, K. S., N. Tyagi, et al. (2005). "Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human heart end stage failure." J Cell Mol Med **9**(3): 704-713.
- Murakami, T., S. Kusachi, et al. (1998). "Time-dependent changes of serum carboxy-terminal peptide of type I procollagen and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen concentrations in patients with acute myocardial infarction after successful reperfusion: correlation with left ventricular volume indices." Clin Chem **44**(12): 2453-2461.

- Murphy, G., F. Willenbrock, et al. (1994). "Regulation of matrix metalloproteinase activity." Ann N Y Acad Sci **732**: 31-41.
- Nagase, H. (1997). "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases." Biol Chem **378**(3-4): 151-160.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-21494.
- Narayanan, A. S., R. C. Page, et al. (1989). "Collagen synthesis by human fibroblasts. Regulation by transforming growth factor-beta in the presence of other inflammatory mediators." Biochem J **260**(2): 463-469.
- Neumann, S., K. Huse, et al. (2002). "Aldosterone and D-glucose stimulate the proliferation of human cardiac myofibroblasts in vitro." Hypertension **39**(3): 756-760.
- Noutsias, M., M. Pauschinger, et al. (2003). "Diagnostic endomyocardial biopsy interpretation." Can J Cardiol **19**(1): 98-99; author reply 99-100.
- Noutsias, M., M. Pauschinger, et al. (2003). "Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy." Heart Fail Monit **3**(4): 127-135.
- Noutsias, M., M. Pauschinger, et al. (2002). "Phenotypic characterization of infiltrates in dilated cardiomyopathy - diagnostic significance of T-lymphocytes and macrophages in inflammatory cardiomyopathy." Med Sci Monit **8**(7): CR478-487.
- Noutsias, M., B. Seeberg, et al. (1999). "Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy." Circulation **99**(16): 2124-2131.
- Okada, Y., K. Naka, et al. (1995). "Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption." Lab Invest **72**(3): 311-322.
- Orn, S., C. Manhenke, et al. (2007). "Plasma MMP-2, MMP-9 and N-BNP in long-term survivors following complicated myocardial infarction: relation to cardiac magnetic resonance imaging measures of left ventricular structure and function." J Card Fail **13**(10): 843-849.
- Packer, M., M. Gheorghiade, et al. (1993). "Withdrawal of digoxin from patients with chronic heart failure treated with angiotensin-converting-enzyme inhibitors. RADIANCE Study." N Engl J Med **329**(1): 1-7.
- Pankuweit, S., I. Portig, et al. (2002). "Pathophysiology of cardiac inflammation: molecular mechanisms." Herz **27**(7): 669-676.
- Pauschinger, M., N. E. Bowles, et al. (1999). "Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction." Circulation **99**(10): 1348-1354.

- Pauschinger, M., K. Chandrasekharan, et al. (2002). "[Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]." Herz **27**(7): 677-682.
- Pauschinger, M., K. Chandrasekharan, et al. (2004). "Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system." Heart Fail Rev **9**(1): 21-31.
- Pauschinger, M., A. Doerner, et al. (1999). "Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis." Circulation **99**(7): 889-895.
- Pauschinger, M., A. Doerner, et al. (1998). "Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation." Cardiovasc Res **37**(1): 123-129.
- Pauschinger, M., D. Knopf, et al. (1999). "Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio." Circulation **99**(21): 2750-2756.
- Pauschinger, M., S. Rutschow, et al. (2005). "Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response." Eur J Heart Fail **7**(4): 444-452.
- Pfeffer, M. A. and E. Braunwald (1990). "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications." Circulation **81**(4): 1161-1172.
- Pitt, B., P. Poole-Wilson, et al. (1999). "Effects of losartan versus captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: rationale, design, and baseline characteristics of patients in the Losartan Heart Failure Survival Study--ELITE II." J Card Fail **5**(2): 146-154.
- Pitt, B., F. Zannad, et al. (1999). "The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators." N Engl J Med **341**(10): 709-717.
- Porter, K. E. and N. A. Turner (2009). "Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling." Pharmacol Ther **123**(2): 255-278.
- Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko (1995). "Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy." Annu Rev Biochem **64**: 403-434.
- Radauceanu, A., C. Ducki, et al. (2008). "Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure." J Card Fail **14**(6): 467-474.
- Rebrov, A. P. and C. N. Tolstov (2007). "[Clinico-diagnostic significance of cytokine activation and changes of morphofunctional parameters of the heart in patients with chronic heart failure and possibilities of correction of revealed disturbances with simvastatin]." Kardiologija **47**(5): 14-18.

- Richardson, P., W. McKenna, et al. (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies." Circulation **93**(5): 841-842.
- Ries, C. and P. E. Petrides (1995). "Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease." Biol Chem Hoppe Seyler **376**(6): 345-355.
- Rohde, L. E., A. Ducharme, et al. (1999). "Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice." Circulation **99**(23): 3063-3070.
- Roten, L., S. Nemoto, et al. (2000). "Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on left ventricular geometry and function in mice." J Mol Cell Cardiol **32**(1): 109-120.
- Rouy, D., I. Ernens, et al. (2005). "Plasma storage at -80 degrees C does not protect matrix metalloproteinase-9 from degradation." Anal Biochem **338**(2): 294-298.
- Salvi, A., A. Di Lenarda, et al. (1989). "Immunosuppressive treatment in myocarditis." Int J Cardiol **22**(3): 329-338.
- Sato, H., T. Takino, et al. (1996). "Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)." FEBS Lett **385**(3): 238-240.
- Sato, H., T. Takino, et al. (1994). "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells." Nature **370**(6484): 61-65.
- Sato, S., M. Ashraf, et al. (1983). "Connective tissue changes in early ischemia of porcine myocardium: an ultrastructural study." J Mol Cell Cardiol **15**(4): 261-275.
- Schonbeck, U., F. Mach, et al. (1998). "Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing." J Immunol **161**(7): 3340-3346.
- Schrier, R. W. and W. T. Abraham (1999). "Hormones and hemodynamics in heart failure." N Engl J Med **341**(8): 577-585.
- Schultheiss, H. P., M. Pauschinger, et al. (1998). "[Pathogenesis of inflammatory cardiomyopathies]." Med Klin (Munich) **93**(4): 229-235.
- Schwartzkopff, B., M. Fassbach, et al. (2002). "Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy." Eur J Heart Fail **4**(4): 439-434.
- Sigusch, H. H., D. Reinhardt, et al. (1998). "[Clinical picture and differential diagnosis of cardiomyopathy and myocarditis]." Med Klin (Munich) **93**(4): 236-239.
- Simm, A., M. Nestler, et al. (1998). "Mitogenic effect of PDGF-AA on cardiac fibroblasts." Basic Res Cardiol **93** Suppl 3: 40-43.

- Sivakumar, P., S. Gupta, et al. (2008). "Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy." Mol Cell Biochem **307**(1-2): 159-167.
- Sivasubramanian, N., M. L. Coker, et al. (2001). "Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor." Circulation **104**(7): 826-831.
- Siwik, D. A., D. L. Chang, et al. (2000). "Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro." Circ Res **86**(12): 1259-1265.
- Smith, P. C., J. Guerrero, et al. (2009). "Tumor necrosis factor-alpha-stimulated membrane type 1-matrix metalloproteinase production is modulated by epidermal growth factor receptor signaling in human gingival fibroblasts." J Periodontal Res **44**(1): 73-80.
- Sobernheim JF. *Praktische Diagnostik der inneren Krankheiten mit vorzüglicher Rücksicht auf pathologische Anatomie*. Hirschwald, Berlin 1837, S.118.
- Spinale, F. G. (2002). "Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart." Circ Res **90**(5): 520-530.
- Spinale, F. G., M. L. Coker, et al. (2000). "A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure." Circulation **102**(16): 1944-1949.
- Spinale, F. G., M. L. Coker, et al. (1999). "Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function." Circ Res **85**(4): 364-376.
- Strauss, B. H., R. Robinson, et al. (1996). "In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty injury and the role of matrix metalloproteinases." Circ Res **79**(3): 541-550.
- Suzuki, M., M. Saito, et al. (2006). "Systemic versus coronary levels of inflammation in acute coronary syndromes." Angiology **57**(4): 459-463.
- Tatenkulova, S. N., V. Mareev, et al. (2009). "[Immune mechanisms of inflammation in dilated cardiomyopathy]." Kardiologija **49**(2): 4-8.
- Thomas, C. V., M. L. Coker, et al. (1998). "Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy." Circulation **97**(17): 1708-1715.
- Thorgeirsson, U. P., H. Yoshiji, et al. (1996). "Breast cancer; tumor neovasculature and the effect of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) on angiogenesis." In Vivo **10**(2): 137-144.
- Timonen, P., J. Magga, et al. (2008). "Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy." Int J Cardiol **124**(3): 293-300.

- Tousoulis, D., N. Papageorgiou, et al. "The failure of Immunomodulation Therapy in Heart Failure: Does the Statins "Paradigm" Prove the Rule?" Curr Vasc Pharmacol.
- Tyagi, S. C., S. E. Campbell, et al. (1996). "Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts." Mol Cell Biochem **155**(1): 13-21.
- Tyagi, S. C., S. G. Kumar, et al. (1996). "Post-transcriptional regulation of extracellular matrix metalloproteinase in human heart end-stage failure secondary to ischemic cardiomyopathy." J Mol Cell Cardiol **28**(7): 1415-1428.
- Uretsky, B. F., J. B. Young, et al. (1993). "Randomized study assessing the effect of digoxin withdrawal in patients with mild to moderate chronic congestive heart failure: results of the PROVED trial. PROVED Investigative Group." J Am Coll Cardiol **22**(4): 955-962.
- Waagstein, F., M. R. Bristow, et al. (1993). "Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group." Lancet **342**(8885): 1441-1446.
- Wang, Y., Y. Zhou, et al. (2009). "Inflammatory mediators in Chinese patients with congestive heart failure." J Clin Pharmacol **49**(5): 591-599.
- Wassenaar, A., T. Verschoor, et al. (1999). "CD40 engagement modulates the production of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts." Clin Exp Immunol **115**(1): 161-167.
- Weber, K. T. (1989). "Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network." J Am Coll Cardiol **13**(7): 1637-1652.
- Weber, K. T. (1999). "Aldosterone and spironolactone in heart failure." N Engl J Med **341**(10): 753-755.
- Weber, K. T., Y. Sun, et al. (1994). "Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms." J Mol Cell Cardiol **26**(3): 279-292.
- Why, H. J., L. C. Archard, et al. (1994). "Dilated cardiomyopathy--new insights into the pathogenesis." Postgrad Med J **70 Suppl 1**: S2-7.
- Why, H. J., B. T. Meany, et al. (1994). "Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy." Circulation **89**(6): 2582-2589.
- Wilson, E. M., H. R. Gunasinghe, et al. (2002). "Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure." J Card Fail **8**(6): 390-398.
- Witte, M. B., F. J. Thornton, et al. (1998). "Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength." Surgery **124**(2): 464-470.
- Woessner, J. F., Jr. (1994). "The family of matrix metalloproteinases." Ann N Y Acad Sci **732**: 11-21.

- Wojnicz, R., E. Nowalany-Kozielska, et al. (2001). "Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results." Circulation **104**(1): 39-45.
- Woodiwiss, A. J., O. J. Tsotetsi, et al. (2001). "Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction." Circulation **103**(1): 155-160.
- Yan, J. C., Z. G. Wu, et al. (2004). "Relation between upregulation of CD40 system and complex stenosis morphology in patients with acute coronary syndrome." Acta Pharmacol Sin **25**(2): 251-256.
- Yang, Y. J., X. Zhang, et al. (2006). "[Involvement of matrix metalloproteinases in the regulation of myocardial extracellular matrix in patients with congestive heart failure]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **86**(24): 1693-1696.
- Ye, S. (2000). "Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases." Matrix Biol **19**(7): 623-629.
- Yoshimura, M., H. Yasue, et al. (1993). "Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure." Circulation **87**(2): 464-469.
- Yun, S. H., J. O. Shin, et al. (2007). "Change in the cells that express connective tissue growth factor in acute Coxsackievirus-induced myocardial fibrosis in mouse." Virus Res **126**(1-2): 62-68.
- Zakynthinos, E., T. Kiropoulos, et al. (2008). "Diagnostic and prognostic impact of brain natriuretic peptide in cardiac and noncardiac diseases." Heart Lung **37**(4): 275-285.
- Zhang, B., S. Ye, et al. (1999). "Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis." Circulation **99**(14): 1788-1794.
- Zhou, L., C. Yan, et al. (2009). "Tumor necrosis factor-alpha induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1." BMC Immunol **10**: 15.

Histologiebilder

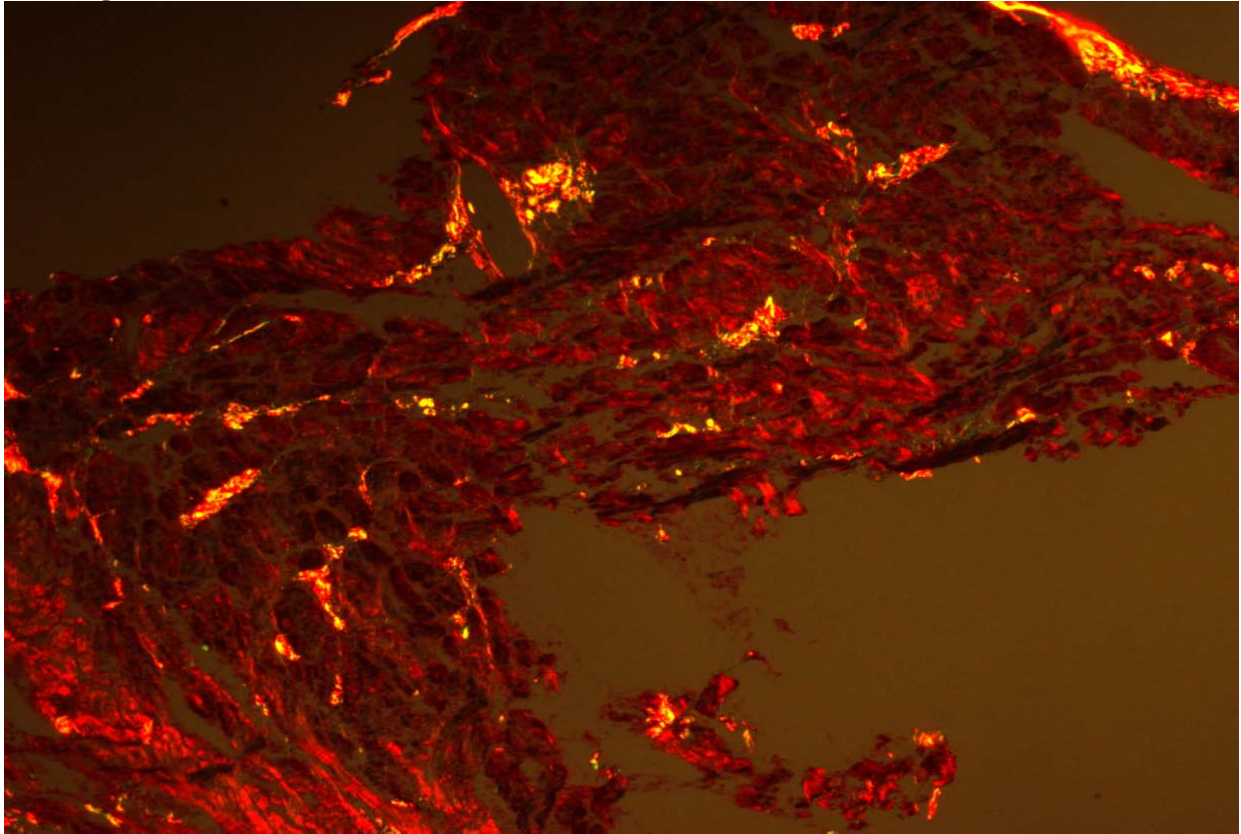


Abbildung 31 - Patient mit DCMi (Sirius-Red Färbung)

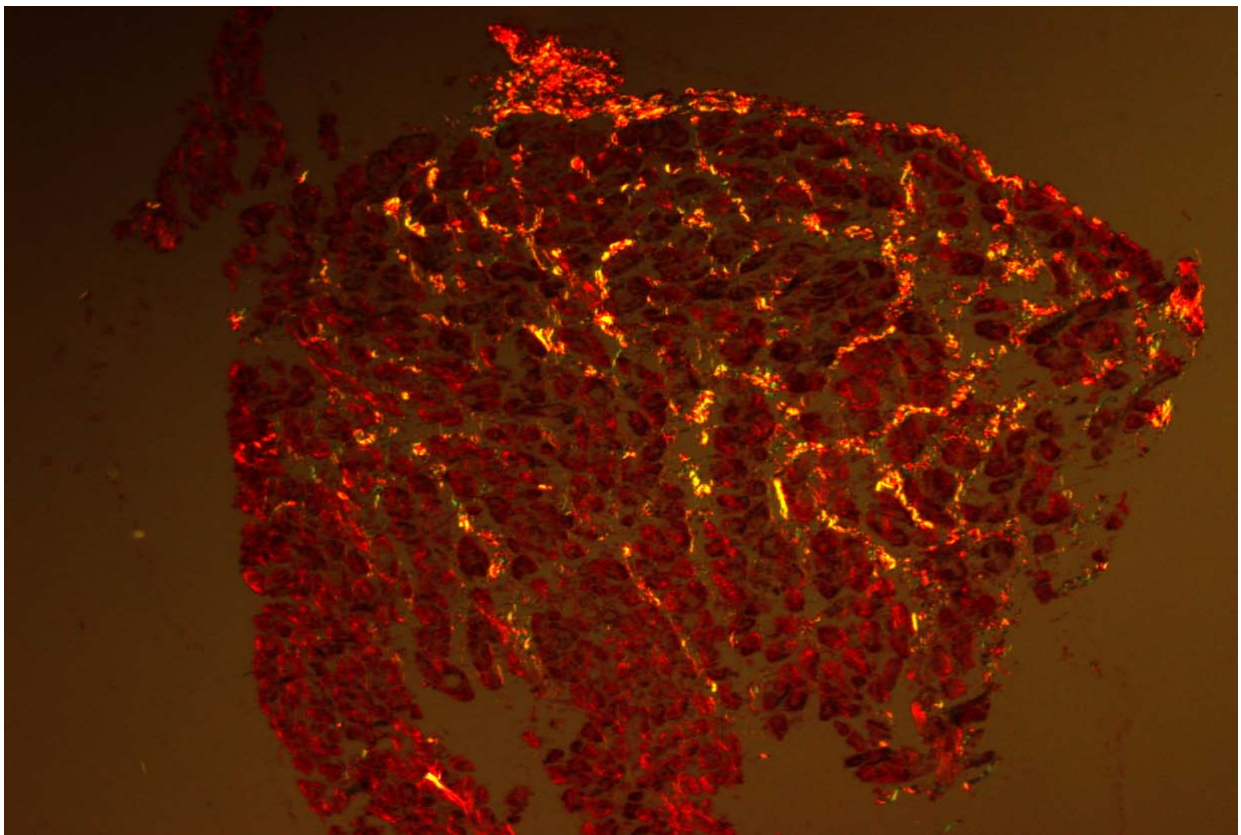


Abbildung 32 - Patient mit DCMi (Sirius-Red Färbung)

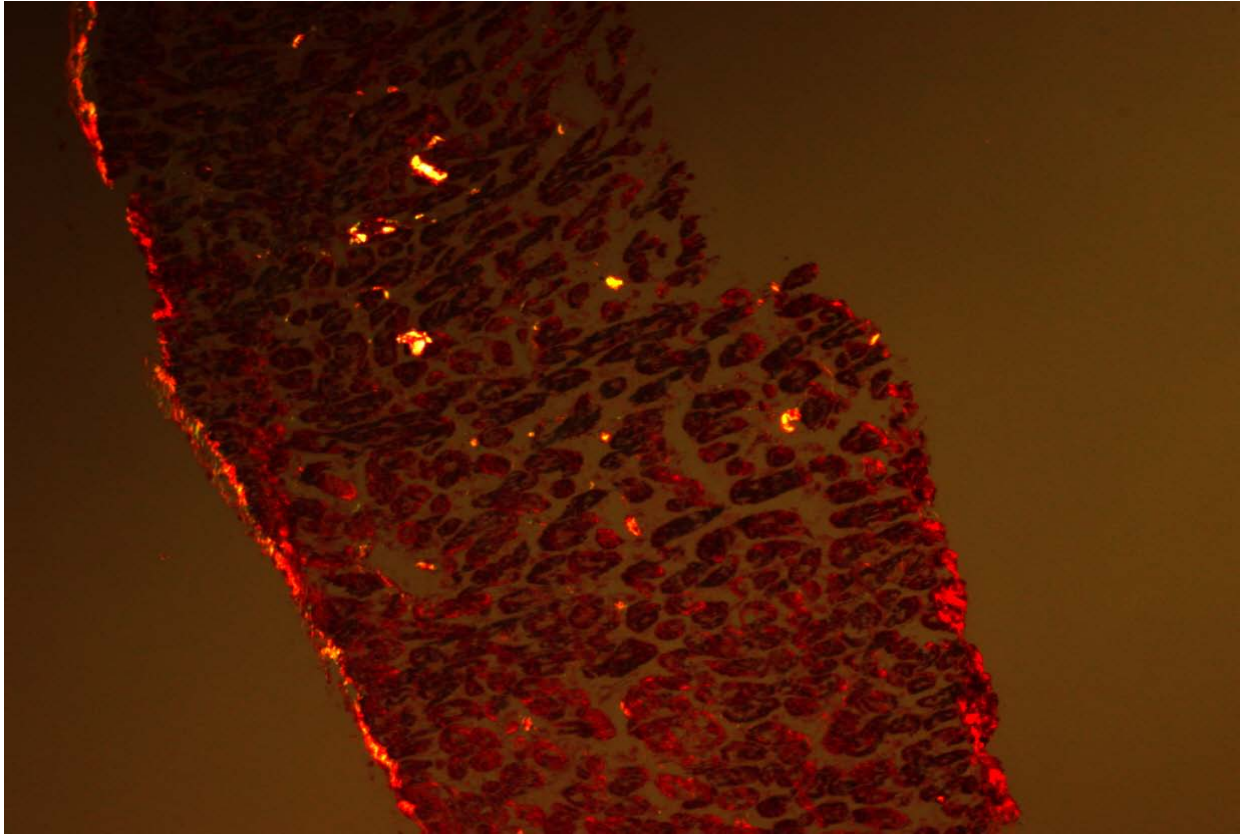


Abbildung 33 - Patient mit DCM (Sirius-Red Färbung)

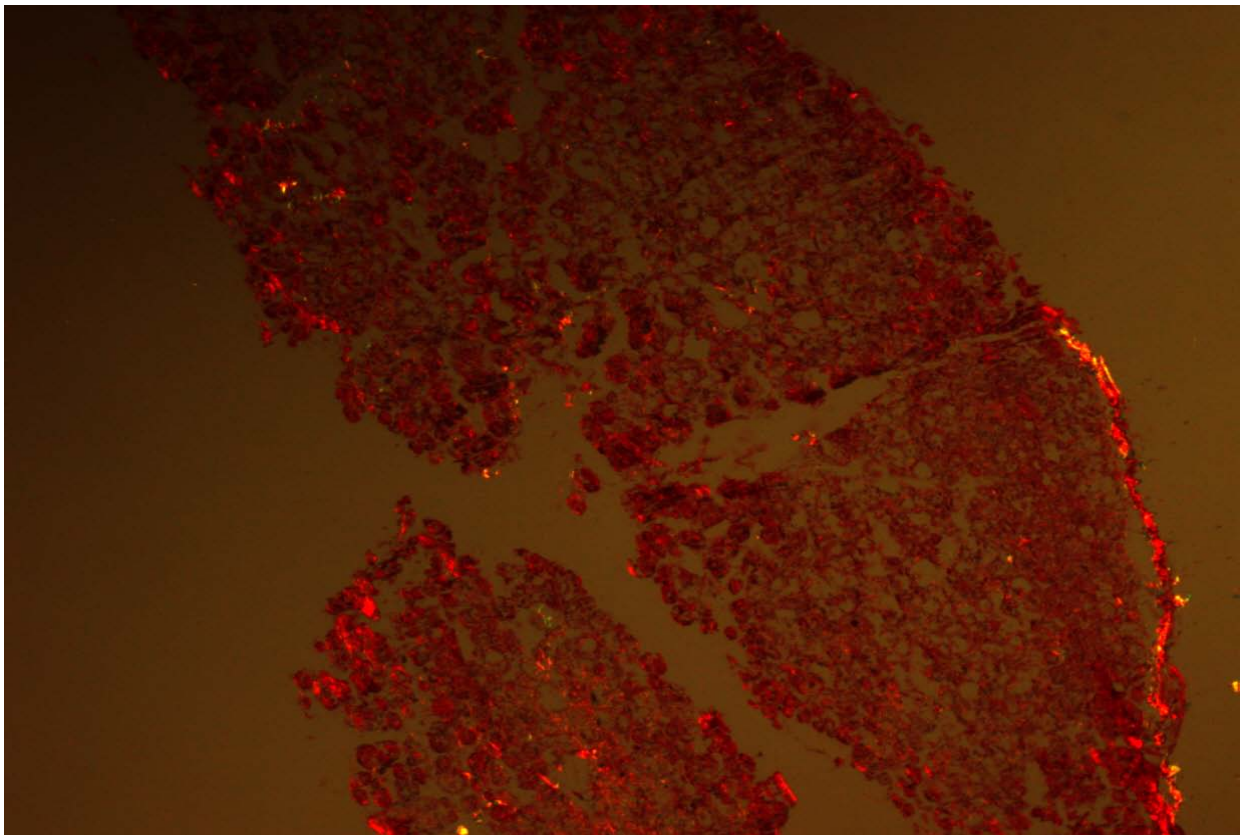


Abbildung 34 - Patient mit DCM (Sirius-Red Färbung)

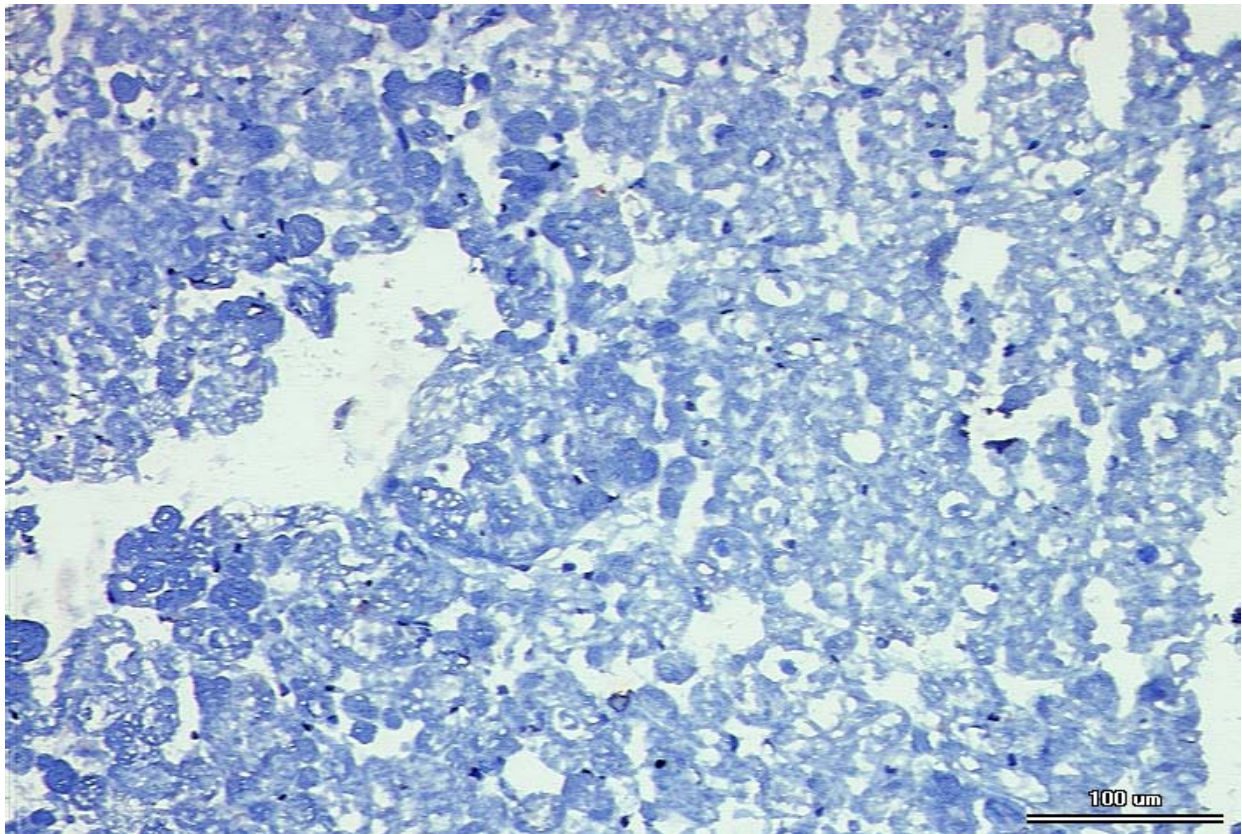


Abbildung 35 - Patient mit DCM (MMP2-Färbung)

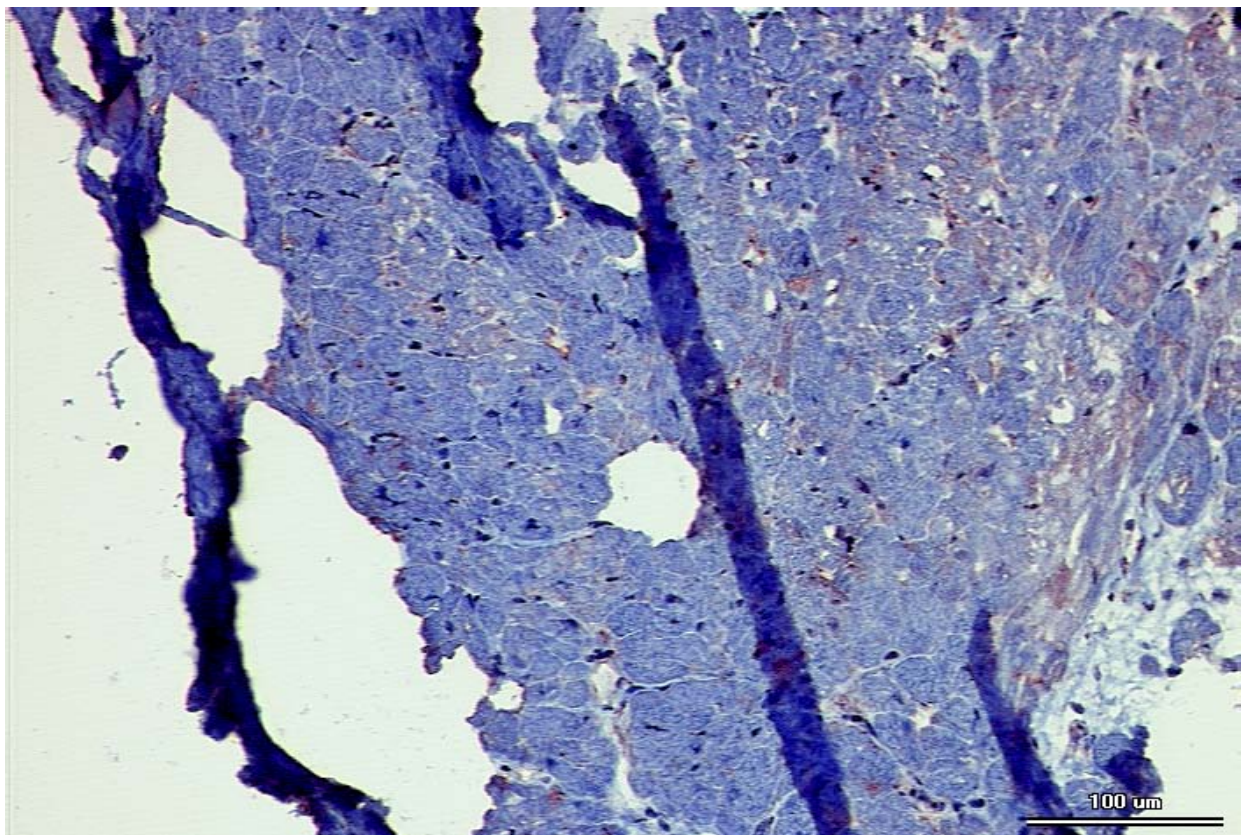


Abbildung 36 - Patient mit DCMi (MMP2-Färbung)

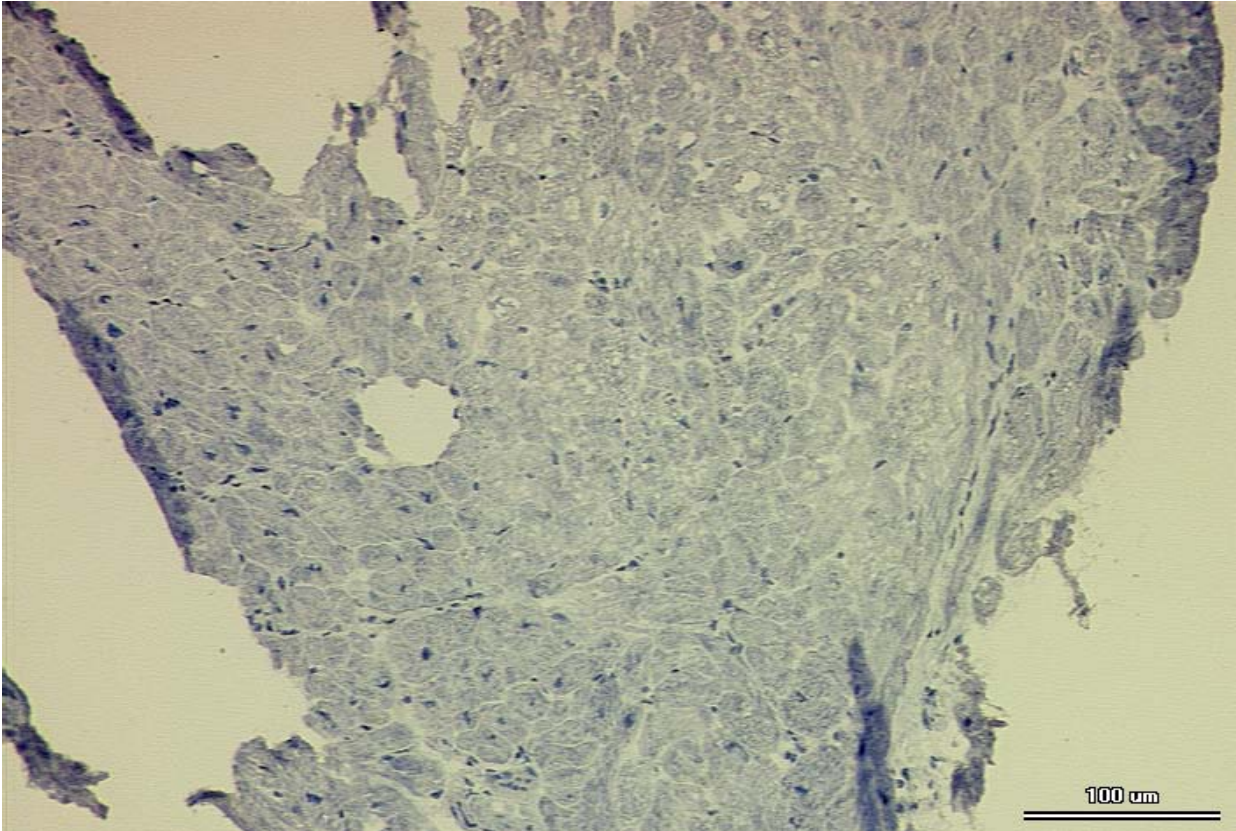


Abbildung 37 - Patient mit DCM (MMP3-Färbung)

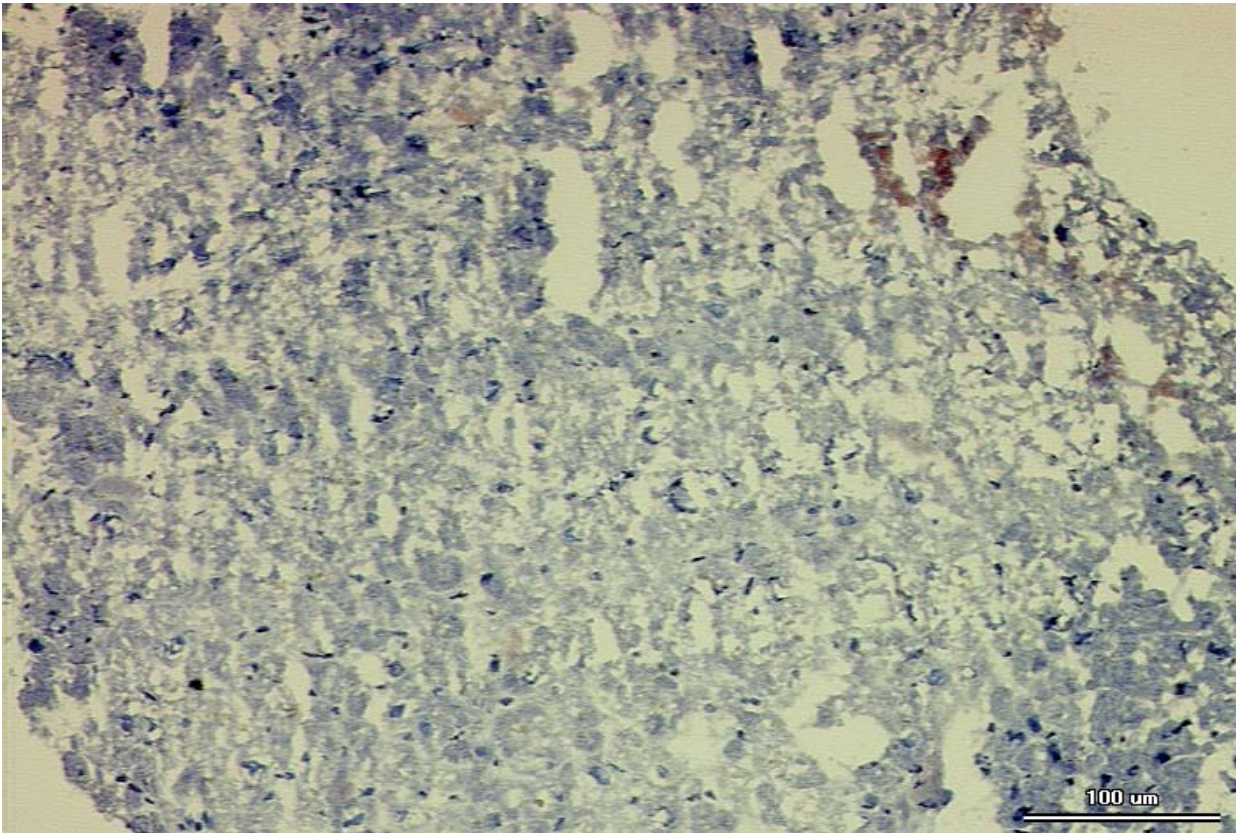


Abbildung 38 - Patient mit DCMi (MMP3-Färbung)

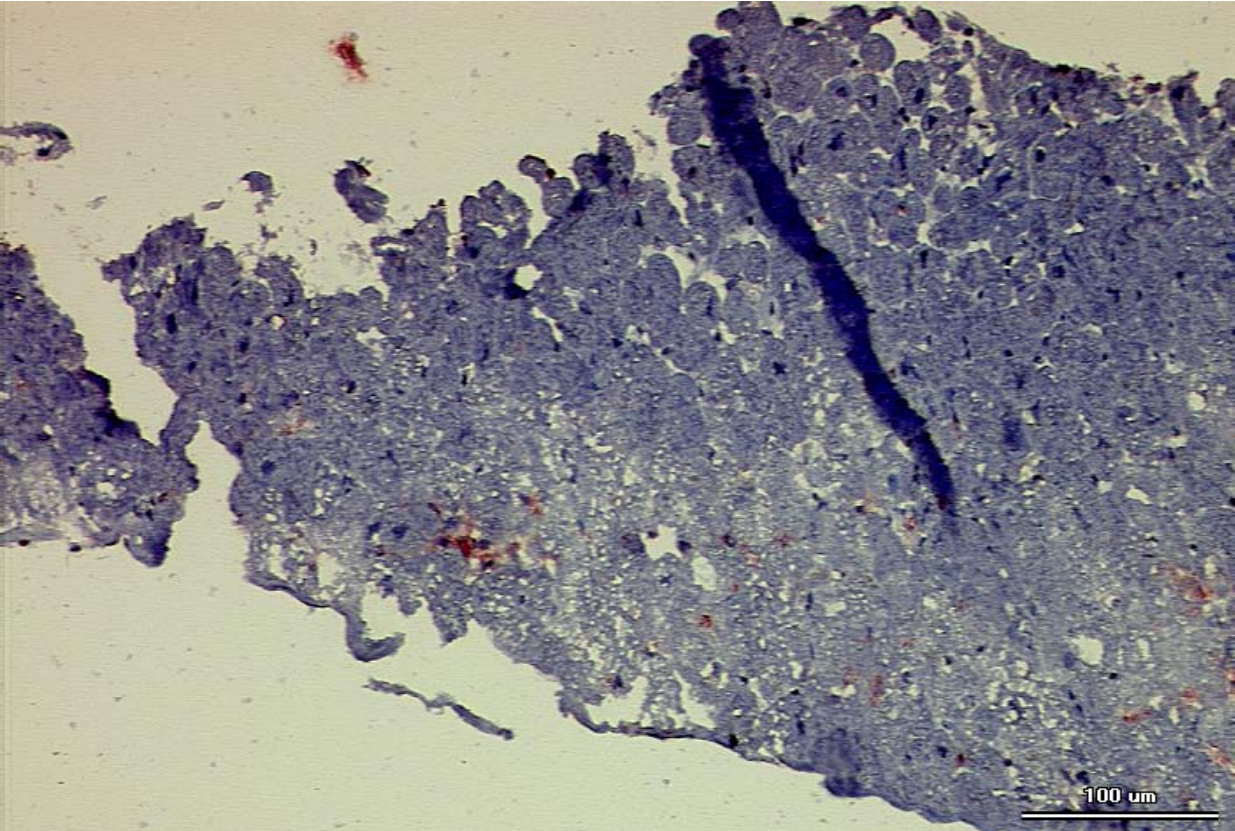


Abbildung 39 - Patient mit DCMi (TIMP1-Färbung)

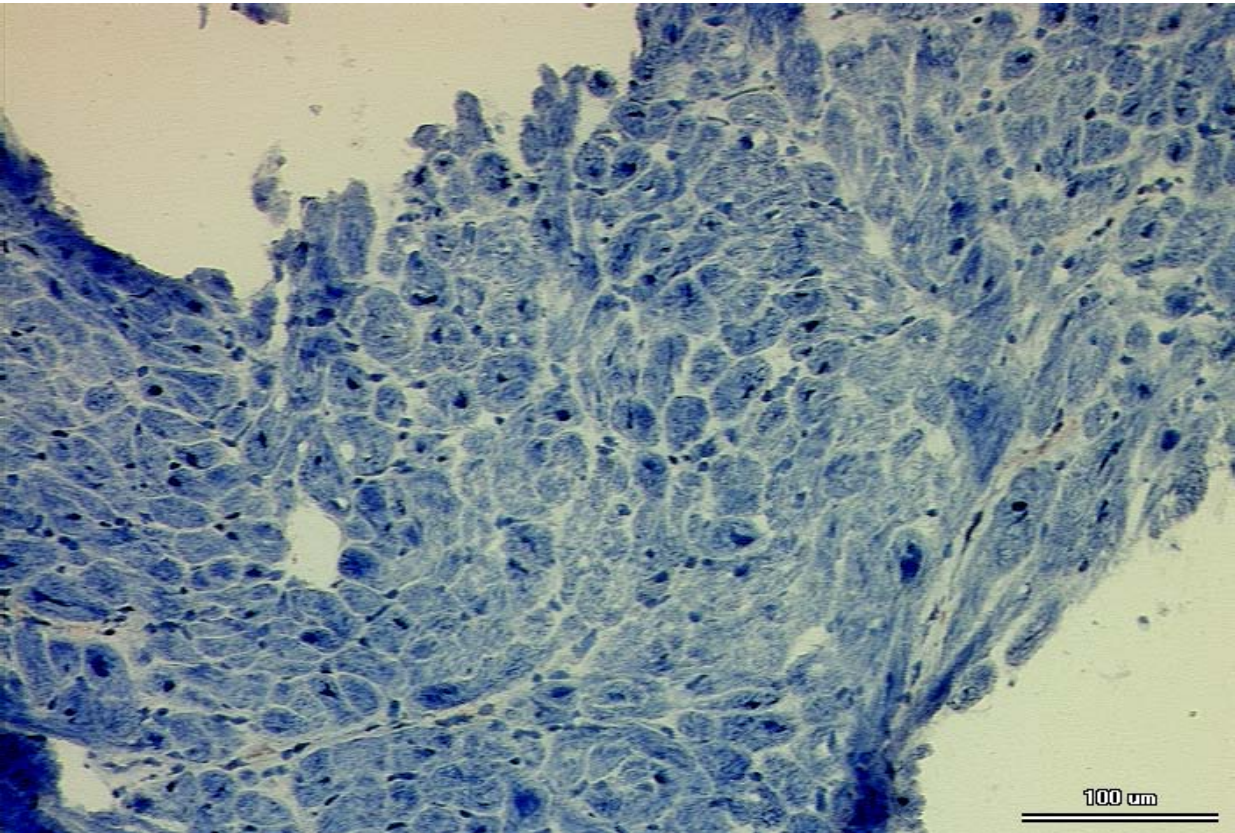


Abbildung 40 - Patient mit DCM (TIMP1-Färbung)

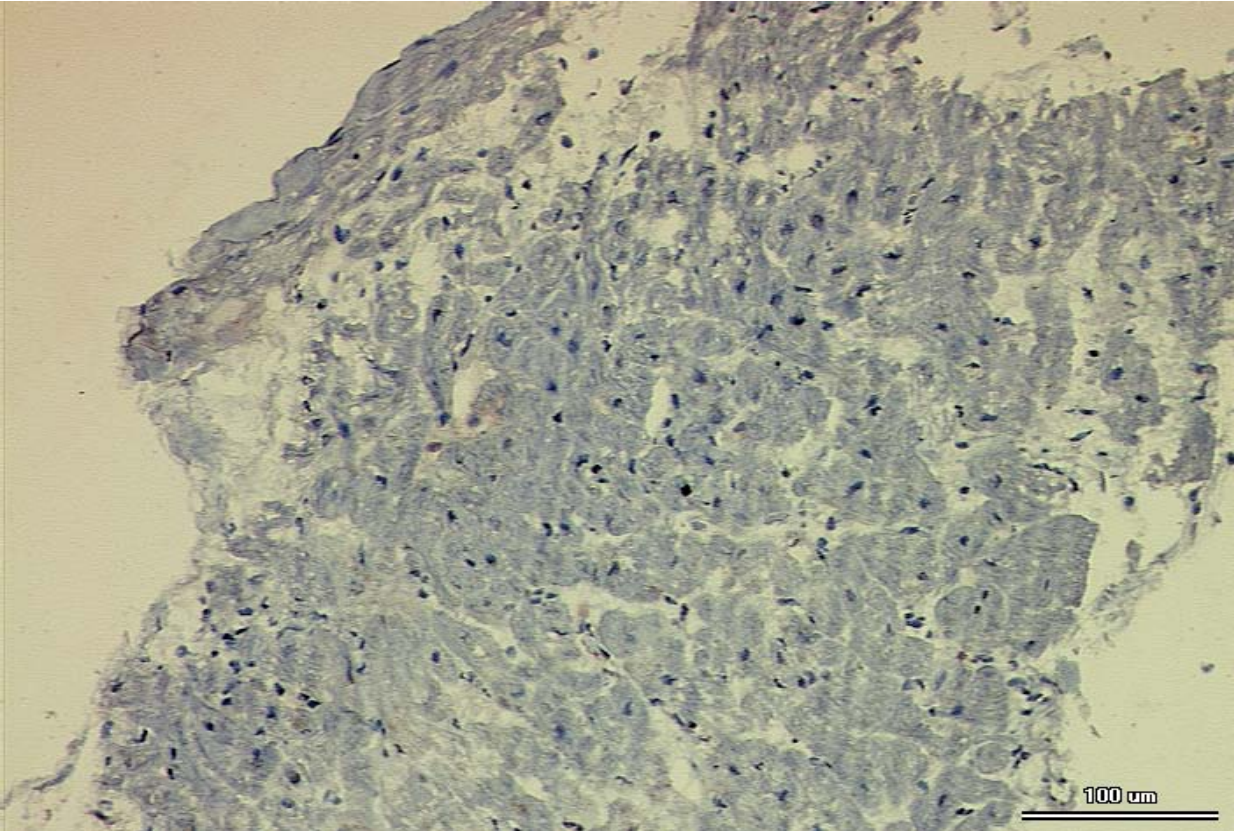


Abbildung 41 - Patient mit DCM (TIMP4-Färbung)

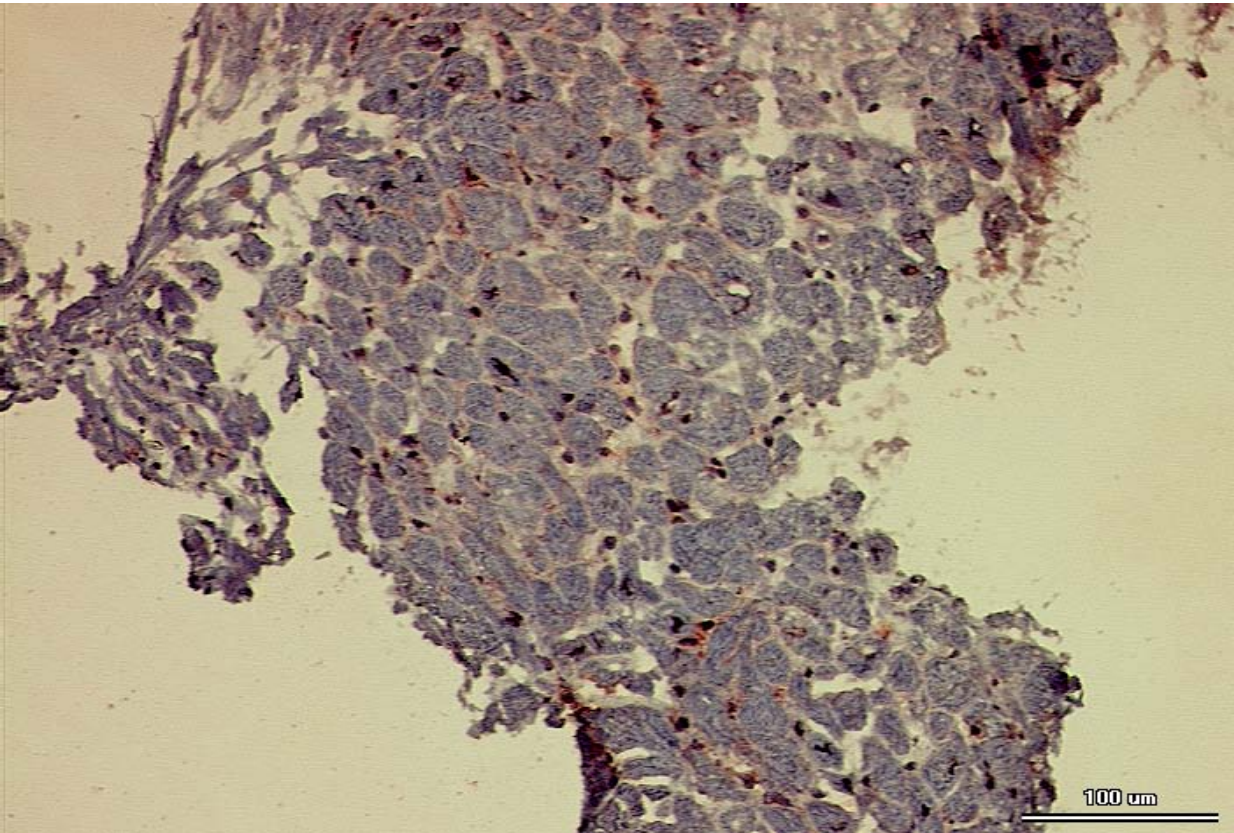


Abbildung 42 - Patient mit DCMi (TIMP4-Färbung)

Abkürzungsverzeichnis

ACE	-	Angiotensin Converting Enzyme
Ag	-	Antigen
Ak	-	Antikörper
AMI	-	akuter Myokardinfarkt
ANP	-	atriales natriuretisches Peptid
APMA	-	Aminophenylmercuric Acetate
BNP	-	brain natriuretic peptide
CD	-	cluster of differentiation
CI	-	cardiac index
CK	-	Creatinkinase
DCM	-	dilatative Kardiomyopathie
DCMi	-	inflammatorische Kardiomyopathie
EBM	-	Endomyokardbiopsie
EF	-	Ejektionsfraktion
EIA	-	Enzymimmunoassay
EKG	-	Elektrokardiogramm
ELISA	-	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMMPRIN	-	extrazellulär matrix metalloproteinase inducer
EZM	-	extrazelluläre Matrix
GMCSF	-	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Hf	-	Herzfrequenz
HPF	-	High Power Field
HRP	-	Avidin-Horseradish Peroxidase
HZV	-	Herzzeitvolumen
I-CAM	-	Inter-Cellular Adhesion Molecule
ICTP	-	I-carboxyterminales Telozeptid
IL	-	Interleukin
INF	-	Interferon
kDa	-	Kilodalton
LV	-	linksventrikulär
LVEDD	-	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEDP	-	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVESD	-	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter

MHC	-	Major Histocompatibility Complex
MMP	-	Matrixmetalloproteinase
MT-MMP	-	membrane type matrixmetalloproteinases
NaCl	-	Natriumchlorid
NYHA	-	New York Heart Association
PCWP	-	pulmocapillary wedge pressure
PDGF	-	platelet-derived-growth factor (Wachstumsfaktoren der PDGF-Familie)
PICP	-	c-terminales Propeptid Kollagen I
PIIINP	-	n-terminales Propeptid Kollagen III
PINP	-	n-terminales Propeptid Kollagen I
RAAS	-	Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems
RR	-	Blutdruck nach Riva-Rocci [mmHg]
RT-PCR	-	Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SV	-	Schlagvolumen
SVI	-	Schlagvolumenindex
TGF	-	Transforming Growth Factor (Transformierender Wachstumsfaktor)
TIMP	-	Tissueinhibitor of matrixmetalloproteinases
TNF	-	Tumornekrosefaktor
TPR	-	Total peripheral Resistance (Gesamtgefäßwiderstand)
TSH	-	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
uPA	-	urokinase-type plasminogen activator
uPARs	-	urokinase-type plasminogen activator receptors
V-CAM	-	vascular cell adhesion molecule
WHO	-	world health organization

Erklärung

„Ich, Mathias Bock, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung des kardialen Remodelings bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM), 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.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Pauschinger danke ich für die Überlassung des Themas.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Angela Kawellis-Opara, die mich mit ihrer fachlichen Erfahrung und konstruktiven Kritik stets gut beraten hat.

Weiterhin möchte ich Frau Kerstin Puhl und Frau Franziska Bleis für die hilfreiche und freundliche Unterstützung während der experimentellen Phase danken.