

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie (CCM)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Biomarker des oxidativen Stresses als Prädiktoren des
plötzlichen Herztodes -
Eine klinische Studie in einer Kohorte von Patienten mit AICD

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Johannes Boschann

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	7
Abstract	8
Abstrakt	9
1. Einleitung	10
1.1 <i>Plötzlicher Herztod</i>	10
1.2 <i>Oxidativer und nitrosativer Stress</i>	17
1.3 <i>Herleitung der Fragestellung</i>	24
2. Methodik	25
2.1 <i>Studiendesign</i>	25
2.2 <i>Studienablauf</i>	25
2.3 <i>Datenschutz</i>	27
2.4 <i>Detektion Endpunkte</i>	28
2.5 <i>Verarbeitung der Blutproben</i>	30
2.6 <i>Statistische Auswertung</i>	33
3. Ergebnisse	35
3.1 <i>Patientenkollektiv</i>	35
3.2 <i>Auswertung Beobachtungszeitraum 1</i>	36
3.3 <i>Auswertung Beobachtungszeitraum 2</i>	51
4. Diskussion	62
4.1 <i>Einleitung in die Diskussion</i>	62
4.2 <i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	63
4.3 <i>Studienpopulation und Endpunkte</i>	63
4.4 <i>Biomarker</i>	64
4.5 <i>Limitationen</i>	74
4.6 <i>Schlussfolgerung</i>	74
5. Literaturverzeichnis	75
Eidesstattliche Versicherung	82
Lebenslauf	83
Danksagung	84

Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer
ACS	akutes Koronarsyndrom
ADMA	Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin
AICD	automatischer implantierbarer Cardioverter/Defibrillator
AP	Aktionspotential
ARCV	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ARG	Arginin
AT2-Blocker	Angiotensin2-Blocker
ATP	antitachykardes Pacing
AUC	„area under the curve“ (Fläche unter der Kurve)
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BNP	B-natriuretisches Peptid
CICR	Calcium-induzierte Calciumfreisetzung
CMK	Calmodulin-Kinase
CP	Carbonylproteine
Cx43	Connexin43
DAD	späte Nachdepolarisation
EAD	frühe Nachdepolarisation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
ES	elektrischer Sturm
FVT	schnelle ventrikuläre Tachykardie
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
hs-CRP	hoch spezifisches C-reaktives Protein
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IQR	Interquartilbereich
KHK	koronare Herzerkrankung
Kyn	Kynurenin
LVDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MDA	Malondialdehyd
MDRD	Modification of Diet Renal Disease
MPO	Myeloperoxidase
NCX	Natrium-Kalium-Austauscher
NT-proBNP	N-terminales Propeptid BNP

NYHA	New York Heart Association
OR	Odds Ratio
Ox-LDL	oxidiertes low density lipoprotein
RCS	reactive carbonyl species
RNS	reactive nitrogen species
ROC	Receiver-Operator-Curve
ROS	reactive oxygen species
RyR	Ryanodinrezeptor
SCD	sudden cardiac death (plötzlicher Herztod)
SERCA	Sarkoplasmatische-Retikulum-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TMB	Tetramethylbenzidin
Try	Tryptophan
VF	Kammerflimmern
VT	ventrikuläre Tachykardie

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PATIENTENCHARAKTERISTIKA	35
TABELLE 2: ICD-KONTROLLE, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	36
TABELLE 3: DESKRIPTIVE STATISTIK, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	37
TABELLE 4: MANN-WHITNEY U TEST BIOMARKER, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	48
TABELLE 5: AUC (FLÄCHE UNTER DER KURVE), BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	50
TABELLE 6: LOGISTISCHE REGRESSION, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	51
TABELLE 7: ICD-KONTROLLE, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	52
TABELLE 8: DESKRIPTIVE STATISTIK, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2 .. FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
TABELLE 9: MANN-WHITNEY U TEST BIOMARKER, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	59
TABELLE 10: AUC (FLÄCHE UNTER DER KURVE), BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	60
TABELLE 11: LOGISTISCHE REGRESSION, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	61

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: AP UND IONENKANÄLE/TRANSPORTER IN VENTRIKULÄREN MYOZYTEN	15
ABBILDUNG 2: HAUPTMECHANISMEN VENTRIKULÄRER ARRHYTHMIEN.....	17
ABBILDUNG 3: ANGRIFFSPUNKTE VON ROS IN VENTRIKULÄREN MYOZYTEN	20
ABBILDUNG 4: STUDIENABLAUF	26
ABBILDUNG 5: BOXPLOT VERTEILUNG NITROTYROSIN, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	38
ABBILDUNG 6: BOXPLOT VERTEILUNG ZONULIN, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	39
ABBILDUNG 7: BOXPLOT VERTEILUNG CP, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	40
ABBILDUNG 8: BOXPLOT VERTEILUNG HS-CRP, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	41
ABBILDUNG 9: BOXPLOT VERTEILUNG NT-PROBNP, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1.....	42
ABBILDUNG 10: BOXPLOT VERTEILUNG ADMA, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	43
ABBILDUNG 11: BOXPLOT VERTEILUNG MPO, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	44
ABBILDUNG 12: BOXPLOT VERTEILUNG KYN/TRYP RATIO, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	45
ABBILDUNG 13: BOXPLOT VERTEILUNG Ox-LDL, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	46
ABBILDUNG 14: BOXPLOT VERTEILUNG CALPROTECTIN, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	47
ABBILDUNG 15: ROC-ANALYSE BIOMARKER, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 1	49
ABBILDUNG 16: BOXPLOT VERTEILUNG NITROTYROSIN, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	53
ABBILDUNG 17: BOXPLOT VERTEILUNG ZONULIN PLASMA, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	54
ABBILDUNG 18: BOXPLOT VERTEILUNG ZONULIN SERUM, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2.....	55
ABBILDUNG 19: BOXPLOT VERTEILUNG CP, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	56
ABBILDUNG 20: BOXPLOT VERTEILUNG MDA, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	57
ABBILDUNG 21: BOXPLOT VERTEILUNG MPO, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	58
ABBILDUNG 22: ROC-ANALYSE BIOMARKER, BEOBACHTUNGSZEITRAUM 2	60

Abstract

Background: Accurate risk stratification of sudden cardiac death (SCD) remains a major challenge since the predictive accuracy of left ventricular ejection fraction (LVEF) is weak. There is a need for additional risk factors optimizing the identification of patients at higher risk for SCD. Recently, published studies demonstrated a direct causality between elevated levels of Reactive Oxygen Species (ROS) and ventricular arrhythmia, the predominant cause of SCD. Accurate quantification of ROS remains difficult, due to their very short half-life. Therefore, the measurement of stable by-products in circulation reflecting systemic redox stress is a widely accepted approach. Currently, limited data is available investigating the relationship between biomarkers of oxidative stress and ventricular arrhythmia.

Aims: Examination of selected biomarkers' predictive value for the occurrence of ICD-Interventions triggered by ventricular tachycardia/ventricular fibrillation (VT/VF) in patients with automatic implantable cardioverter/defibrillators (AICDs).

Methods: Analysis of biomarkers of oxidative stress in 264 ambulatory patients with ICD-implants for primary or secondary SCD-prevention in a prospective cohort study. Venous blood samples were obtained at recruitment and Follow-Up visits. Patients were evaluated every 6-month and ICD-therapies (VT/VF treated by anti-tachycardia pacing or shock) were monitored. Endpoints included malignant ventricular arrhythmia or SCD.

Results: Over a one-year period, 30 patients (11%) experienced antiarrhythmic device therapies for VT/VF. There were no significant differences in biomarker median baseline plasma/serum levels between patients with ICD-therapy versus those without. Multivariate logistic regression demonstrated that none of the analyzed biomarkers were independently predictive for VT/VF occurrence.

Conclusion: This study presents the first known data for several biomarker of oxidative stress in association with ICD-Interventions. Additionally, no evidence of elevated levels of oxidative stress parameters in patients who received antiarrhythmic device therapy for VT/VF was present. However, additional risk factors are required for more precise risk stratification in SCD prediction.

Abstrakt

Einleitung: Die akkurate Risikostratifizierung des plötzlichen Herztodes (SCD) stellt eine große Herausforderung dar, da die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) als alleiniges Kriterium wenig sensitiv ist. Um Patienten mit erhöhtem Risiko für einen SCD besser identifizieren zu können, werden zusätzliche Risikoparameter benötigt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können ventrikuläre Arrhythmien und damit die Hauptursache des SCD auslösen. ROS sind einer direkten Messung nicht zugänglich, sodass stabilere Endprodukte, die das generelle Ausmaß an systemischen oxidativen Stress widerspiegeln, im Blut gemessen werden.

Ziel der Studie: Untersuchung der prädiktiven Aussagekraft von ausgewählten Biomarkern des oxidativen Stresses hinsichtlich des Auftretens von ventrikulären Tachykardien (VT) oder Kammerflimmern (VF) bei Patienten mit AICD.

Methodik: Prospektive Studie an 264 ambulanten Patienten mit primär- oder sekundärprophylaktisch indizierter ICD-Implantation über einen Zeitraum von einem Jahr. Blutproben wurden zur Zeit des Einschlusses in die Studie und während des Kontrolltermins nach sechs Monaten entnommen. Beim Follow-Up Termin erfolgte die Kontrolle und Auswertung des AICD. Als Endpunkte wurden die Detektion von VT/VF-Episoden oder das Auftreten eines SCD definiert.

Ergebnisse: Über einen Zeitraum von einem Jahr wurden bei 30 Patienten (11%) ICD-Interventionen registriert, ausgelöst durch VT/VF-Episoden. Bezüglich der gemessenen Biomarker gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit ICD-Interventionen und denen ohne. Keiner der Biomarker konnte als eigenständiger Prädiktor für das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien identifiziert werden.

Schlussfolgerung: In dieser Pilot-Studie wurden erste Werte des oxidativen Stresses bei ICD-Trägern ermittelt. Es gab keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen erhöhten Werten des oxidativen Stresses und dem Auftreten von VT/VF-SCD. Aktuell existieren wenig vergleichbare Daten, sodass weitere Studien notwendig sind, um die Ergebnisse dieser Studie besser einordnen zu können. Die Etablierung neuer Parameter für eine bessere Identifikation von Hochrisiko-Patienten bleibt klinisch von großem Interesse.

1. Einleitung

1.1 Plötzlicher Herztod

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen mit ca. 40% weiterhin die führende Todesursache in Deutschland dar, wovon rund 50% plötzlich versterben (1). Insgesamt verursacht der plötzliche Herztod (üblicherweise als SCD „sudden cardiac death“ abgekürzt) 10-20% aller Todesfälle in westlichen Ländern (2).

In den letzten Jahren wurde in der veröffentlichten Literatur der Begriff des plötzlichen Herztodes unterschiedlich definiert (3). Auf einer Konferenz des National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society wurde daraufhin eine einheitliche Begriffsbestimmung vorgeschlagen:

„ A case of *established SCD* is an unexpected death without obvious extracardiac cause, occurring with a rapid witnessed collapse, or if unwitnessed, occurring within 1 hour after the onset of symptoms. A *probable SCD* is an unexpected death without obvious extracardiac cause that occurred within the previous 24 hours. In any situation, the death should not occur in the setting of a prior terminal condition, such as a malignancy that is not in remission or end-stage chronic obstructive lung disease.”(4)

Aufgrund der unterschiedlichen Definitionen des plötzlichen Herztodes variieren die Angaben zur Inzidenz. In einer aktuellen, für Deutschland repräsentativen Studie wurde eine durchschnittliche Inzidenzrate des plötzlichen Herztodes nach oben genannter Definition von 81/100.000 Einwohner ermittelt. Für Deutschland ergeben sich somit rund 65.000 Fälle des plötzlichen Herztodes pro Jahr (5). Weltweit wird von jährlich vier bis fünf Millionen Todesfällen ausgegangen. Angesichts der steigenden Prävalenz von Diabetes und der koronaren Herzerkrankung, insbesondere in den Schwellenländern, gilt der plötzliche Herztod als zunehmendes globales Gesundheitsproblem. Trotz Fortschritten bei der Reanimation bleibt die Überlebensrate eines Zirkulationsstillstandes gering. In Nordamerika lag die Wahrscheinlichkeit einen außerhalb eines Krankenhauses aufgetretenen SCD zu überleben bei weniger als 5% (6).

1.1.2 Ätiologie und Klinik

Die koronare Herzerkrankung stellt die führende kardiale Ursache des plötzlichen Herztodes dar. Ungefähr 80% der Fälle sind mit diesem Krankheitsbild assoziiert. Nicht-ischämische dilatative und hypertrophe Kardiomyopathien sind für ca. 10-15% aller Fälle des plötzlichen Herztodes verantwortlich. Seltene Ursachen, wie z.B. die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC), das Brugada-Syndrom oder das Long-QT-Syndrom verursachen die verbleibenden 5-10% der Fälle (3).

Insgesamt gibt es keine spezifischen klinischen Symptome für das Auftreten eines plötzlichen Herztodes. Mögliche Symptome können innerhalb von Minuten auftretender Brustschmerz, Dyspnoe oder Palpitationen sein. Allerdings treten 40-50% der Fälle ohne vorwarnende Anzeichen auf. Die Unvorhersagbarkeit des Ereignisses und die geringe Überlebensrate begründen die Notwendigkeit einer verbesserten Risikoeinschätzung zur Prävention des SCD (6, 7).

1.1.3 Risikomarker und Prävention

Eine akkurate Risikoeinschätzung ist die Grundvoraussetzung der klinischen Entscheidungsfindung hinsichtlich der Einleitung einer präventiven Therapie. Prinzipiell wird dabei zwischen Primärprophylaxe und Sekundärprophylaxe des SCD unterschieden. Als Sekundärprophylaxe gilt die Implantation eines Cardioverter/Defibrillator (ICD) bei Patienten, die einen plötzlichen Herztod oder eine anhaltende, klinisch signifikante ventrikuläre Tachyarrhythmie überlebt haben. Unter primärprophylaktischer Therapie versteht man die ICD-Implantation bei Risikopatienten, bei denen bisher keine lebensbedrohlichen ventrikulären Rhythmusstörungen dokumentiert wurden, die dennoch ein entsprechendes Risikopotenzial besitzen. Dabei ist eine herabgesetzte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF <35%) das Hauptkriterium zur Risikostratifizierung (8, 9). Die exakten Kriterien zur ICD-Indikation wurden 2012 aktualisiert (10). Bei ICD-Trägern liegt die jährliche Inzidenzrate, bezogen auf die Patientenzahl, bei ca. 16% in der Gruppe der Personen mit primärprophylaktischer ICD-Indikation, bei ca. 23% bei sekundärprophylaktischer Implantation und bei ca. 30% bei Personen mit zusätzlichen Risikomerkmalen (z.B. stattgehabter Myokardinfarkt) (2, 11-13). Patienten mit ICD stellen damit eine Hochrisikopopulation für das Auftreten des Plötzlichen Herztodes dar (vgl. jährliche Inzidenz in der Allgemeinbevölkerung).

In Hinblick auf den aktuellen Kenntnisstand vermehren sich die Hinweise, dass die LVEF als alleiniges Kriterium zur Risikoeinschätzung unzureichend ist. So wurde in einer Studie demonstriert, dass nur in weniger als einem Drittel aller SCD Ereignisse

die Patienten eine LVEF von $<35\%$ aufwiesen und die LVEF bei der Hälfte der Patienten mit SCD im Normbereich lag (14).

Eine weitere Einschränkung ist, dass die LVEF üblicherweise erstmalig bestimmt wird, wenn Patienten mit Symptomen vorstellig werden. Da der plötzliche Herztod in ca. 30% der Fälle die Erstmanifestation einer kardiologischen Grunderkrankung darstellt, sollten Parameter idealerweise das Risiko zu einem früheren Zeitpunkt der Krankheitsgeschichte einschätzen können. Auch die Implantation eines Defibrillators als „nebenwirkungsarme Lebensversicherung“ wird zunehmend kritisch gesehen (15). Zwar konnte der Einsatz von AICDs die Gesamtmortalität um ca. 20% reduzieren, allerdings nicht immer eine potentiell tödliche Arrhythmie anhaltend terminieren; insbesondere wenn es zu einer permanenten Abfolge von Rhythmusstörung, Terminierung durch das Gerät und sofortiger neuer Arrhythmie kommt (16). Diese gefürchtete Komplikation, die bei ungefähr 4-10% der primärprophylaktisch implantierten ICD-Träger innerhalb von 3 Jahren auftritt, wird als „elektrischer Sturm“ bezeichnet und wie folgt definiert (17):

„Der elektrische Sturm („electrical storm“, ES) bezeichnet einen Zustand kardialer elektrischer Instabilität, der sich in multiplen Episoden ventrikulärer Tachyarrhythmien (VTs) innerhalb kurzer Zeit äußert. Bei Patienten mit ICD wird ein ES durch ≥ 3 adäquate VT-Detektionen innerhalb von 24 h definiert, die durch antitachykarde Stimulation oder Schocks terminiert wurden.“ (18)

Weiterhin wird jede Auslösung des ICD als traumatisches Ereignis wahrgenommen und kann mit teilweise starken Nebenwirkungen verbunden sein. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ca. 25-35% aller Schockabgaben inadäquat waren und das Myokard durch die elektrische Entladung geschädigt wurde. Insgesamt verschlechterte sich die Prognose durch abgegebene Schocks, unabhängig davon, ob diese adäquat oder inadäquat waren (19, 20). Mittlerweile wird in der Literatur zunehmend diskutiert, ob nicht der ICD selbst ein proarrhythmogener Faktor sein könnte (21).

Folglich ergibt sich bei der aktuellen Risikoeinschätzung ein Dilemma: Zum einen benötigen Patienten, die aufgrund einer verminderten LVEF einen ICD implantiert bekommen, diesen oft gar nicht. Zum anderen verstirbt ein Großteil der Patienten, die sich außerhalb des leitliniengerechten Indikationsbereichs für einen ICD befinden, an einem plötzlichen Herztod.

Als Konsequenz hat eine Arbeitsgruppe von Experten im Auftrag des „National Heart, Lung and Blood Institute and the Heart Rhythm Society“ Vorschläge veröffentlicht, welche Forschung betrieben werden sollte, um die Vorhersage und Vorbeugung des SCD zu verbessern.

Dazu zählt die Erforschung und Etablierung neuer Risikomarker. Von großem Interesse ist dabei die Aussagekraft von Plasma Biomarkern:

„Ideally, such tools should be inexpensive and cost efficient, easy to use and interpret, and widely available. Because plasma biomarkers could fulfill these criteria, we would suggest that there is a critical need to effectively incorporate plasma biomarkers for SCD within the risk stratification paradigm.“ (22)

Dementsprechend wäre eine einfach durchzuführende Biomarker Bestimmung im Blut gefolgt von verschiedenen vorbeugenden Maßnahmen wie einer Erhöhung der Betablocker-Dosis, der Hinzunahme eines neuen Antiarrhythmikums oder eine stationäre Überwachung von großem Vorteil. Insbesondere zwei Plasma Biomarker wurden in Studien bereits hinsichtlich ihrer prädiktiven Aussagekraft untersucht, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen. Zum einen der inflammatorische Marker hs-CRP, einem Akute-Phase-Protein, das mit der Pathogenese der Atherosklerose assoziiert ist. Andererseits NT-proBNP, ein Marker des hämodynamischen Stresses, der bei der Diagnose der Herzinsuffizienz klinische Relevanz besitzt. In beiden Fällen ist der genaue kausale Zusammenhang zur Pathogenese des plötzlichen Herztodes ungeklärt.

Da ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen die Basis für die Etablierung neuer Risikoparameter ist, sollen diese kurz skizziert werden.

„Given the multifactorial etiology of SCD-VT/VF, it is important to consider risk factors and risk markers that represent abnormalities across the spectrum of potential mechanisms implicated in the pathogenesis of ventricular tachyarrhythmias.“(23)

1.1.4 Pathophysiologie

Unabhängig von der zugrundeliegenden Ätiologie wird der plötzliche Herztod in 50-80% der Fälle durch eine tachykarde Herzrhythmusstörung, d.h. ventrikuläre Tachykardie (VT) oder Kammerflimmern (VF), ausgelöst (24). In den letzten Jahrzehnten wurde viel Forschung betrieben, um die zellulären, molekularen und genetischen Ursachen von ventrikulären Arrhythmien zu ermitteln. Um das Zustandekommen von Arrhythmien zu verstehen, müssen grundlegende Prinzipien des physiologischen Herzrhythmus erläutert werden.

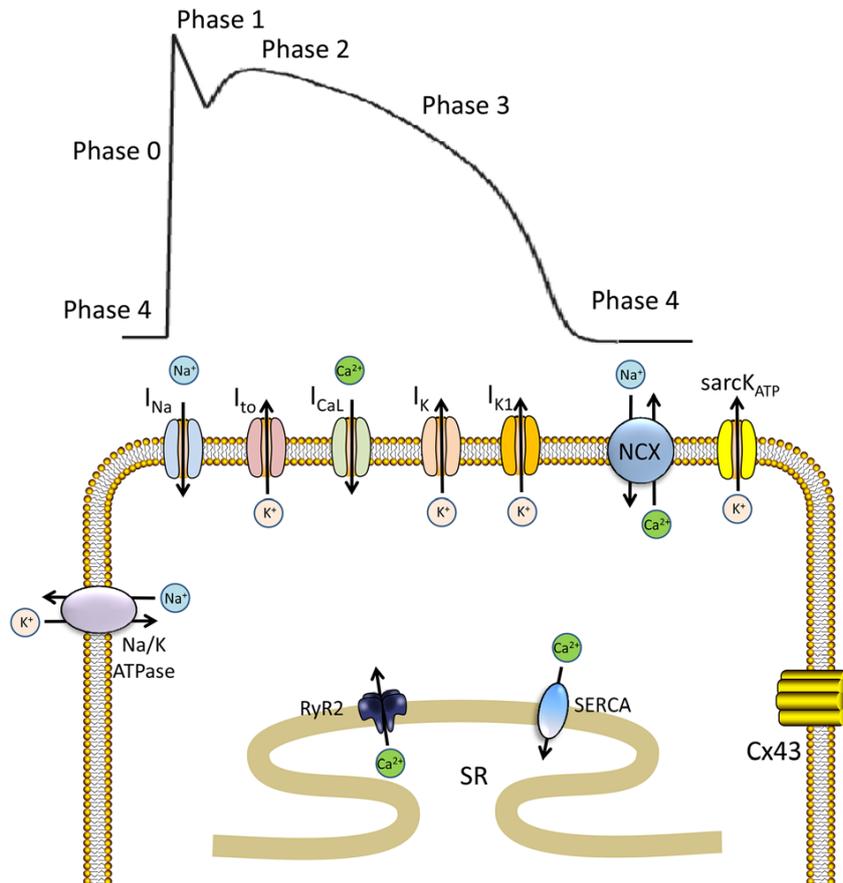
Physiologischer Herzrhythmus

Die elektrische Erregung hat ihren Ursprung in Sinusknotenmyozyten, die aufgrund ihrer intrinsischen Aktivität autonom, d.h. ohne externe Reizung, Aktionspotentiale (AP) generieren können. Sie fungieren damit als primäre Taktgeber für den Herzrhythmus. Elektrische Synapsen, sogenannte gap junctions, leiten die Erregung auf benachbarte Vorhofmyozyten weiter, die sich daraufhin kontrahieren. Über AV-Knoten-Myozyten erfolgt die Erregungsweiterleitung von den Vorhöfen in die Ventrikel, die durch eine Bindegewebsschicht elektrisch gegeneinander isoliert sind. Ein Erregungsleitungssystem, bestehend aus His-Bündel, Kammerschenkeln und Purkinje-Fasern, überträgt die Erregung auf die Ventrikelmyozyten. Durch die unterschiedliche Expression von Transmembrankanälen in den verschiedenen Herzregionen, erzeugen spezialisierte Myozyten Aktionspotentiale unterschiedlicher Form und Dauer. Der zeitliche Verlauf der Aktionspotentiale wird allgemein durch die 5 Phasen (0-4) charakterisiert.

Über gap junctions, die in ventrikulären Myozyten hauptsächlich durch Connexin43 (Cx43) gebildet werden, erfolgt die Depolarisation benachbarter Myozyten durch die Aktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle ($\text{Na}_{1.5}$). Der resultierende einwärts gerichtete Natriumstrom (I_{Na}) depolarisiert das Membranpotential schnell auf ca. +20 mV (Phase 0). Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle bewirken durch einen auswärts gerichteten Kaliumstrom (I_{to}) eine frühe initiale Repolarisation (Phase 1). Durch einen einwärts gerichteten Calciumstrom (I_{Ca}) wird die Repolarisation verzögert und somit eine Plateauphase im Aktionspotential ermöglicht (Phase 2). Während dieser Plateauphase kommt es zum Einstrom von Ca_{2+} aus dem Extrazellulärraum durch L-Typ-Kanäle. In einem Prozess, der als „Calcium-induzierte Calciumfreisetzung“ (CICR) bezeichnet wird, bindet Ca_{2+} an Ryanodinrezeptoren der Isoform 2 (RyR2), wodurch massenhaft Ca_{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt wird. Daraufhin diffundiert Ca_{2+} zum kontraktilen Apparat, bindet an Troponin C und bewirkt die Kontraktion der Myozyten. Schließen sich die spannungsgesteuerten Calciumkanäle, endet die Plateauphase. Die Repolarisation zurück zum Ruhemembranpotential wird durch weitere spannungsgesteuerte Kaliumkanäle getragen (I_{k}) (Phase 3). Das stabile Ruhemembranpotential von ca. -90mV wird durch einen konstanten aufwärtsgerichteten Kaliumstrom (I_{k1}) sichergestellt (Phase 4). Voraussetzung für die Ventrikelfüllung während der Diastole, ist die Beendigung der Kontraktion und damit ein Absinken der zytosolischen Calciumkonzentration. Dieses erfolgt hauptsächlich durch die Arbeit der Sarkoplasmatischen-Retikulum-ATPase (SERCA), die aktiv Ca_{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum pumpt. Durch SERCA und den sarkolemmlen $\text{Na}_{+}/\text{Ca}_{2+}$ -Austauscher (NCX), der Ca_{2+} zurück in den

Extrazellulärraum transportiert, wird die langfristige Calcium-Hämostase sichergestellt. Für die Aufrechterhaltung des Natrium- und Kalium-Gradienten über der Plasmamembran ist die Na/K-ATPase verantwortlich.

Abbildung 1: AP und Ionenkanäle/Transporter in ventrikulären Myozyten



nach Yang, K.C.(25)

Während einer bestimmten Phase des Herzzyklus sind die Kardiomyozyten (ausgenommen der Sinusknotenmyozyten und der AV-Knoten-Myozyten) nicht wieder erregbar. Dieser als absolute Refraktärzeit bezeichnete Zeitraum beginnt mit der schnellen Depolarisation durch Natriumkanäle (Phase 0) und endet bei einem Membranpotential von ca. -40mV während der Repolarisation (Phase 3). Ab diesem Zeitpunkt befinden sich die Myozyten in der relativen Refraktärphase, d.h. sie können durch starke Reize wieder erregt werden. Da der ursprüngliche Herzrhythmus dabei noch nicht vollständig abgeschlossen ist, kann es in diesem vulnerablen Zeitraum zu Herzrhythmusstörungen kommen (26).

Mechanismen ventrikulärer Arrhythmien

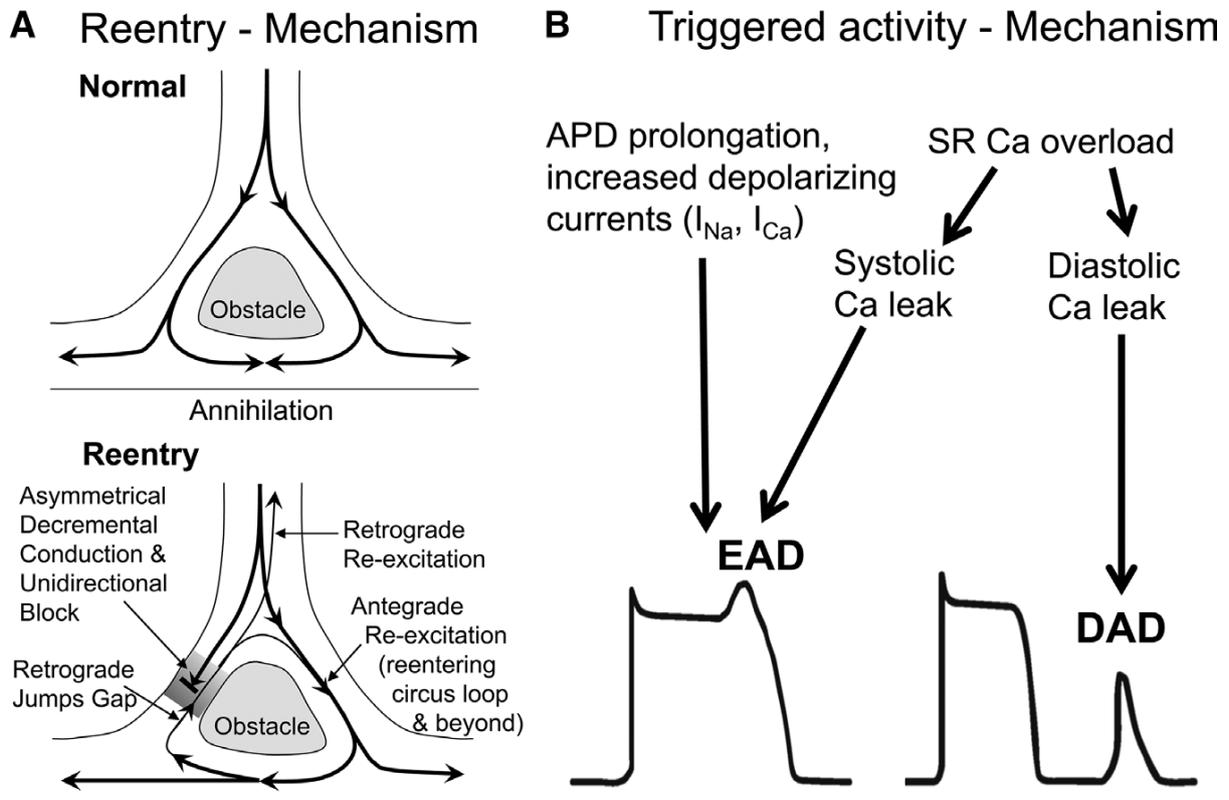
Zwei hauptsächliche Mechanismen erklären die Entstehung tachykarder ventrikulärer Arrhythmien (27).

Bei der „getriggerten“ Aktivität, einer Störung der Impulsbildung aufgrund von Nachdepolarisationen, wird die Myokardzelle während der relativen Refraktärphase vorzeitig depolarisiert. Diese Oszillationen des Membranpotentials können entweder als frühe Nachdepolarisationen (EAD) während der Plateauphase des Aktionspotentials aufgrund von veränderten Ionenströmen oder als späte Nachdepolarisationen (DAD) nach der Beendigung der Repolarisation während der Diastole auftreten. Späte Nachdepolarisationen werden durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung bedingt. Als Ursache werden ein undichter RyR2-Kanal („RyR2-leak“) und die Hochregulierung des NCX-Austauschers diskutiert, die jeweils eine spontane Ca^{2+} -Freisetzung während der Diastole ermöglichen (28).

Beim zweiten wichtigen Mechanismus, der als „reentry“ bezeichnet wird, entstehen kreisende Erregungen. Voraussetzung zur Entstehung einer Kreiserregung sind Myokardareale mit heterogenen Leitungseigenschaften. Zum einen können Infarktarnen, Fibrosierung und andere strukturelle Veränderungen als anatomisches Substrat das Auftreten von „reentry“-Tachykardien begünstigen. Beim funktionalen „reentry“ ermöglichen Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften des Myokards, d.h. es existieren verschiedene Refraktärzeiten in verschiedenen Ausbreitungsrichtungen, den Wiedereintritt einer Erregung. Ein anatomisches Hindernis und/ oder eine funktionelle Heterogenität ermöglichen die Ausbildung eines unidirektionalen Leitungsblocks, sodass die Erregung nur in eine Richtung laufen kann. Bei Beendigung der Refraktärphase kann das initial blockierte Myokardareal retrograd erregt werden. Dieser Ablauf führt zu einem Erregungskreis, der bei Persistenz eine ventrikuläre Tachykardie auslöst. Beide Mechanismen können in der Abfolge getriggerte Aktivität – „reentry“, den komplexen Mechanismus von abnormaler Reizbildung und Aufrechterhaltung der Erregungsleitung erklären (27).

Trotz der hohen Prävalenz und Bedeutung von Arrhythmien sind die molekularen Mechanismen nicht vollständig geklärt. Neue Erkenntnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der Ionen-Homöostase, struktureller Modellierung im Herzen und der Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hin (29).

Abbildung 2: Hauptmechanismen ventrikulärer Arrhythmien



nach Wagner et al. (30)

1.2 Oxidativer und nitrosativer Stress

Oxidativer Stress beschreibt den Zustand der Imbalance zwischen exzessiver Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und deren mangelnder Inaktivierung durch Schutzsysteme. ROS haben unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Funktion als Signalmoleküle, können allerdings bei übermäßiger Bildung körpereigene Moleküle schädigen. Für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies gibt es im Organismus mehrere Mechanismen. Bei der Energiegewinnung in den Mitochondrien wird Sauerstoff als Elektronenakzeptor benötigt und normalerweise unter der Bildung von Wasser vollständig reduziert. Allerdings können in Nebenreaktionen auch unvollständig reduzierte Sauerstoffspezies entstehen. In Myozyten kommen insbesondere Superoxidradikale ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxyradikale sowie das nicht radikale, aber hochreaktive Wasserstoffperoxid (H_2O_2) vor. Es wird davon ausgegangen, dass unter physiologischen Bedingungen ca. 1% des Elektronenflusses durch die Atmungskette in der Entstehung von ROS mündet (31). Die Mitochondrien der Myozyten sind somit die Hauptquelle von ROS. Allerdings tragen auch zahlreiche Oxidoreduktasen während

physiologischer Prozesse zur Bildung von ROS bei. Dazu zählen die NADPH-Oxidase, die Xanthine-Oxidase und die Myeloperoxidase (32). Reaktive Sauerstoffspezies können durch Peroxidation Biomoleküle wie Lipide, DNA und Proteine strukturell modifizieren und funktionsunfähig machen.

Analog zur Entstehung von oxidativem Stress durch freie Sauerstoff-Radikale wird nitrosativer Stress durch eine übermäßige Produktion von Stickstoffmonoxid (NO•) durch die Stickstoffsynthase (NOS) ausgelöst. In hohen Konzentrationen kann Stickstoffmonoxid zudem mit einem Sauerstoffradikal zu hochreaktiven Molekülen wie Peroxynitrit reagieren.

Oxidative Moleküle ausgehend von Stickstoffmonoxid werden zwar korrekterweise als reaktive nitrogene Spezies bezeichnet (RNS), jedoch üblicherweise zu den ROS gezählt. Unter physiologischen Bedingungen besteht eine Balance zwischen der Produktion von ROS und deren Inaktivierung. Pathologische Zustände, wie die myokardiale Ischämie oder eine Herzinsuffizienz, können insbesondere die Effizienz der mitochondrialen Atmungskette verschlechtern und dadurch eine unkontrollierte Produktion von ROS bedingen.

Viele Studien haben diese Assoziation zwischen erhöhtem systematischen oxidativen Stress und Krankheitsbildern wie der KHK, der Herzinsuffizienz, dem Bluthochdruck und dem Diabetes belegen können (33-35). Die Vorläufererkrankungen des SCD scheinen folglich mit erhöhtem oxidativen Stress assoziiert zu sein. Zudem vermehren sich die Hinweise, dass ROS ventrikuläre Tachyarrhythmien direkt initiieren und somit den SCD auslösen können. Einige dieser Mechanismen sollen kurz dargestellt werden.

1.2.1 ROS und ventrikuläre Arrhythmien

Zwischen ventrikulären Myozyten wird das Aktionspotential über gap junctions, die hauptsächlich durch das Protein Cx43 gebildet werden, weitergeleitet. Eine starke Verminderung von Cx43 führt zu strukturellen Veränderungen von Myozyten und erhöhter elektrischer Heterogenität im Myokard. In einer Studie, die an Mäusen durchgeführt wurde, konnte die direkte arrhythmische Wirkung von ROS durch eine Herunterregulierung der Cx43 Expression demonstriert werden. Die Reduktion von Cx43 durch ROS resultierte in einem erhöhten Risiko für ventrikuläre Tachykardien und dem Auftreten des SCD (36).

Nach der Erregungsweiterleitung über gap junctions sorgen Na_{1.5}-Kanäle für die schnelle Depolarisation (I_{Na}) und die Generierung von Aktionspotentialen. ROS beeinflussen die Natriumkanäle auf verschiedene Weise. Einerseits können ROS die Expression von Na_{1.5}-Kanälen während der Transkription reduzieren und andererseits die Kanäle direkt oxidierend modifizieren (37). Da eine Mindestanzahl an

funktionierenden $\text{Na}_{1.5}$ -Kanälen Voraussetzung für die akkurate Abfolge von Aktionspotentialen ist, erhöhen sowohl eine Herunterregulierung als auch eine vermehrte Aktivierung von $\text{Na}_{1.5}$ -Kanälen das Risiko für Arrhythmien.

Der intrazelluläre Calciumgehalt wird durch viele Kanäle, Signalmoleküle und Transporter reguliert. Für die synchronisierte Calcium Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ist der RyR2-Rezeptor-Kanal verantwortlich. Oxidative Veränderungen des Rezeptors führen zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit und einer unkoordinierten Calciumfreisetzung (38).

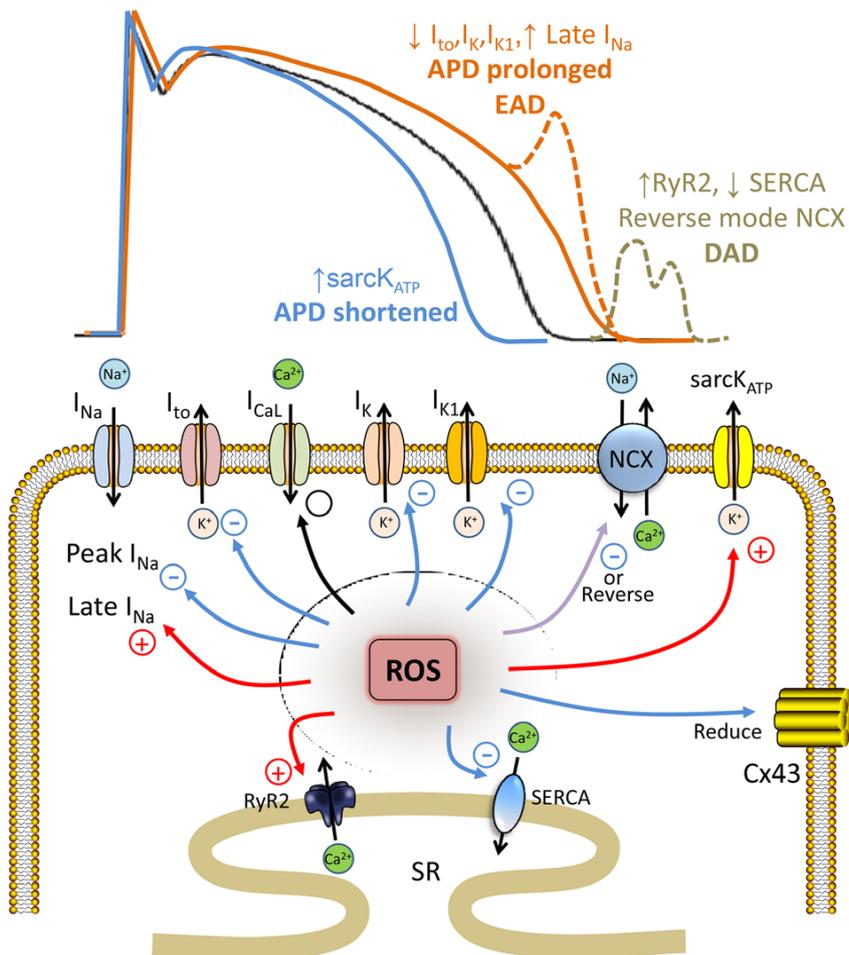
In zwei weiteren Publikationen konnte gezeigt werden, dass Hydroxyradikale die Calcium-Pumpe SERCA direkt binden und deaktivieren können, wodurch während der Diastole weniger Calcium in das SR transportiert wird (39, 40). Zudem können ROS den Natrium-Kalium-Austauscher NCX, der unter physiologischen Bedingungen Calcium gegen Natrium austauscht, inaktivieren (41, 42). Der Einfluss von ROS auf RyR2, SERCA und NCX resultiert folglich in einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung während der Diastole und ermöglicht die Entstehung von Arrhythmien durch späte Nachdepolarisationen.

Neben diesen direkten Effekten können ROS Signalmoleküle wie z.B. die Calmodulin-Kinase2 (CMK2) modifizieren, die über eine Phosphorylierung die Offenwahrscheinlichkeit der L-Type-Calcium- und $\text{Na}_{1.5}$ -Kanäle reguliert. Die ROS abhängige Modulation von Natrium- (I_{Na}) und Calciumströmen (I_{Ca}) verlängerte in Experimenten die Plateauphase und begünstigte dadurch das Auftreten von frühen Nachdepolarisationen. Die gleiche Konsequenz ergibt sich durch Inaktivierung verschiedener repolarisierender Kaliumkanäle (I_{to} , I_{k} , I_{k1}) durch ROS.

In mehreren Studien wurde zudem gezeigt, dass ROS die Offenwahrscheinlichkeit von sarkolemnalen ATP-abhängigen Kalium-Kanälen ($\text{sarcK}_{\text{atp}}$) beeinflussen. Eine unkoordinierte Öffnung dieser Kanäle ermöglicht die Entstehung heterogener Regionen unterschiedlicher Erregbarkeit innerhalb der Zelle und bildet damit die Grundlage für „reentry-Erregungen“ (43-46).

Insgesamt vermehren sich in der Literatur die Hinweise, dass reaktive Sauerstoffspezies über die Veränderung der Ionen-Homöostase und strukturellen Veränderungen an gap junctions ventrikuläre Arrhythmien auslösen und somit den plötzlichen Herztod direkt verursachen können.

Abbildung 3: Angriffspunkte von ROS in ventrikulären Myozyten



nach Yang, C.K. (25)

1.2.2 Biologische Marker von ROS/NOS

Da ROS eine kurze Halbwertszeit besitzen und hoch reaktiv sind, ist ihre Quantifizierung problematisch. Weiterhin sind die Zielmoleküle von ROS in den Myozyten lokalisiert und einer direkten Messung nicht zugänglich. Deswegen werden stabilere Oxidationsprodukte, die durch ROS verändert werden und im Blut nachweisbar sind, zur indirekten Messung des systemischen oxidativen Stresses verwendet. Biomarker des oxidativen Stresses können folglich Moleküle sein, die in der Interaktion mit ROS modifiziert werden, ROS produzieren oder Bestandteile des antioxidativen Schutzsystems sind. Für die Aussagekraft des Biomarkers ist es entscheidend, ob die oxidative Modifikation eine kausale Rolle spielt und das Molekül somit selbst funktionell relevant ist oder nur eine Begleiterscheinung darstellt.

Weitere Faktoren für die Validität spielen die Einfachheit der Gewinnung, die Stabilität des Biomarkers während der Messung und die Spezifität und Sensitivität der Test-Assays.

Carbonylproteine (CP)

Prinzipiell können ROS alle Moleküle, d.h. Proteine, Lipide, DNA und Kohlenhydrate schädigen. Die Oxidierung von Proteinen gilt dabei als stabilster Marker und die Protein Carbonylierung als bester Indikator der Proteinoxidation (31). Die Messung von Carbonyl-proteinen stellt eine gängige Methode dar, um die Existenz eines erhöhten oxidativen Stresses nachzuweisen. Carbonylierung beschreibt das Einfügen von Keton- oder Aldehydgruppen und führt zu einer irreversiblen oxidativen Modifikation. Die exakten Mechanismen der Carbonylierung wurden in vielen Artikeln detailliert beschrieben (47). In Studien konnte zudem eine genaue Korrelation zwischen der Anzahl an eingefügten Carbonylgruppen in einem Protein und dem angerichteten Schaden durch oxidativen Stress demonstriert werden. Insgesamt gilt die Bestimmung von Carbonylproteinen als guter Indikator für das Ausmaß des oxidativen Stresses (48). Weiterhin konnte für reaktive Carbonyl-Spezies (RCS) am In-vivo-Modell der Ratte nachgewiesen werden, dass sie den RyR2-Rezeptor modifizieren und somit die Rate spontaner Kalziumfreisetzungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum erhöhen können. Dieser Prozess konnte außerdem durch die Carbonylierung hemmende Pharmaka rückgängig gemacht werden (49).

Myeloperoxidase (MPO)

Neben Molekülen, die mit ROS interagieren, können Enzyme, die ROS produzieren, als Marker des oxidativen Stresses gemessen werden. Dazu zählt die MPO, die die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu anderen ROS wie Hydroxylradikalen, Peroxynitrit und Stickstoffdioxid katalysiert. Als Produzent von reaktiven Sauerstoffspezies wurde bereits der Einfluss der MPO auf die Pathogenese der Atherosklerose untersucht (50). Zudem korrelierten in Studien erhöhte MPO Werte mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarkts bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und dem Vorkommen von Vorhofflimmern (51, 52).

Nitrotyrosin

Stickstoffmonoxid weist eine erhöhte Affinität zu aromatischen Aminosäuren auf. Durch die Reaktion von NO mit Tyrosin entsteht Nitrotyrosin, das als Indikator für den nitrosativen Stress verwendet wird. Einige Studien haben dabei den Zusammenhang zwischen Nitrotyrosin und kardiovaskulären Erkrankungen, der Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern beschrieben (53-55).

Oxidiertes LDL (Ox-LDL)

Reagieren freie Radikale mit ungesättigten Fettsäuren, entstehen Lipidperoxidationsprodukte. Insbesondere die Modifikation von LDL-Partikeln wurde mit der Pathogenese der koronaren

Herzerkrankung, die in bis zu 80% der Fälle mit dem SCD assoziiert ist, in Verbindung gebracht. Demnach spielten erhöhte Ox-LDL Werte eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von instabilen Plaques in den Gefäßwänden und förderten das Voranschreiten der Atherosklerose. In der Literatur wurde Ox-LDL bereits auf seine prädiktive Aussagekraft hinsichtlich der KHK und des Myokardinfarkts untersucht (56, 57).

Malondialdehyd (MDA)

Primäre Lipidperoxidationsprodukte können zu sekundären Lipidperoxidationsprodukten wie Malondialdehyd weiter reagieren. Die Rolle von Malondialdehyd als Marker des oxidativen Stresses wurde insbesondere bei der Pathogenese der Atherosklerose diskutiert (58).

L-Kynurenin (Kyn)/ Tryptophan (Tryp)

Ein Enzym, das antioxidative Schutzfunktion besitzt, ist die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (59). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression als auch die Aktivität der IDO direkt durch ROS reguliert werden (60). Die IDO katalysiert im Tryptophan-Katabolismus die Konversion von Tryptophan zu Kynurenin. Wird die Aktivität der IDO durch ROS hochreguliert, wird Tryptophan vermehrt in den Kynureninweg eingeschleust und abgebaut. Die Messung von Tryptophan und L-Kynurenin im Plasma und die Berechnung ihres Verhältnisses (Kyn/Tryp) dient daher als Maß für die Aktivität der IDO (61). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass

dieIDO-Aktivität mit verschiedenen Risikofaktoren der Atherosklerose assoziiert war (62). Das Verhältnis aus Kynurenin/Tryptophan wurde zudem als Prädiktor für das Auftreten der koronaren Herzerkrankung untersucht (63).

Zonulin

Ein weiterer potentieller Marker für das Ausmaß an oxidativem Stress ist Zonulin, das die Permeabilität intestinaler tight junctions reguliert und als Marker für deren Integrität gilt (64). In Studien wurde gezeigt, dass Zonulin bei inflammatorischen Erkrankungen wie Diabetes, Sepsis oder entzündlichen Darmerkrankungen, die mit einem erhöhten systematischen oxidativen Stress assoziiert sind, erhöht ist (65). Zudem wurde nachgewiesen, dass Zonulin der Präkursor von Haptoglobin 2 ist (66). Das Akute-Phase-Protein Haptoglobin kann in den Varianten HP 1-1, HP 2-1 oder HP 2-2 vorliegen und fungiert als Regulator des oxidativen Stresses (67). Bei Trägern der homozygoten Variante Haptoglobin HP 2-2 waren in Studien die oxidativen Schutzmechanismen weniger ausgeprägt und das kardiovaskuläre Risiko deutlich erhöht (68).

Calprotectin

Calprotectin wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sezerniert und ist als Akute-Phase-Protein bei diversen entzündlichen Erkrankungen teilweise bis zu hundertfach erhöht. Seitdem gilt Calprotectin als vielversprechender Biomarker für inflammatorische Prozesse. In der Literatur wird Calprotectin zunehmend als prognostischer Risikofaktor für kardiovaskuläre und kardiometabolische Pathologien beschrieben (69). In aktuellen Studien wurde zudem eine Assoziation zwischen erhöhten Calprotectin Werten und dem Auftreten der chronischen Herzinsuffizienz, des Diabetes und der Entstehung von Atherosklerose nachgewiesen (70, 71).

Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin (ADMA)

Nitrosativer Stress wird durch eine übermäßige Produktion von Stickstoffmonoxid ausgelöst.

Für die endogene Regulation der Stickstoffmonoxid Produktion spielt Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin als Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase eine entscheidende Rolle. Eine Akkumulation von ADMA korrelierte in Studien mit dem Auftreten von Atherosklerose und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko (72).

1.3 Herleitung der Fragestellung

Der plötzliche Herztod stellt ein großes öffentliches Gesundheitsproblem dar. Dabei führen insbesondere Kammerflimmern und anhaltende ventrikuläre Tachykardien zum SCD. Als Behandlungskonzept hat sich die Implantation eines Cardioverter/Defibrillators etabliert, sowohl in der Rezidiv- als auch in der Primärprophylaxe. Dennoch bleibt die akkurate Risikoeinschätzung ein ungelöstes Problem. Zum einen erhalten Patienten einen ICD, den sie im weiteren Krankheitsverlauf nicht benötigen. Andererseits betrifft der SCD eine große Anzahl an Patienten, welche die Hauptkriterien zur ICD-Implantation nicht erfüllen. Folglich ist für die bessere Charakterisierung behandlungsbedürftiger Patienten die Erforschung neuer Risikofaktoren neben der linksventrikulären Ejektionsfraktion entscheidend. Idealerweise sollte ein Risikomarker dabei ein pathophysiologisches Substrat abbilden können. Die Hinweise vermehren sich, dass ROS/RNS eine kausale Rolle bei der Entstehung von ventrikulären Tachykardien und somit des plötzlichen Herztodes spielen. Für die akkurate Messung des oxidativen Stresses scheinen Carbonylproteine geeignete Marker zu sein, da sie direkt an der Pathogenese beteiligt sind. Daraus ergibt sich die *Primärhypothese*:

Die Plasmaspiegel von durch oxidativen Stress veränderten Proteinen, sogenannten Carbonylproteinen, haben prädiktiven Wert hinsichtlich des Auftretens von tachykarden, malignen Herzrhythmusstörungen bei ambulanten Patienten mit implantiertem Cardioverter/Defibrillator, die sich in regelmäßiger Betreuung in der AICD-Ambulanz der Charité (Campus Mitte) befinden.

Sekundärhypothese:

Da die Carbonylierung von Proteinen mit dem generellen Ausmaß an oxidativem und nitrosativem Stress korreliert, wird in Analogie zur Primärhypothese auch die prädiktive Wertigkeit von weiteren Parametern des oxidativen bzw. nitrosativen Stresses untersucht: MDA,

Ox-LDL, MPO, Kynurenin/Tryptophan, Zonulin, Nitrotyrosin, ADMA und Calprotectin.

Zudem werden die Parameter hs-CRP und NT-proBNP, die in anderen Studien als Risikoparameter für den SCD untersucht wurden, bestimmt.

Mit dieser Anwendungsbeobachtung sollen erste Daten zu Carbonylproteinen und anderen Biomarkern des oxidativen Stresses bei AICD-Trägern ermittelt werden.

2. Methodik

2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektiv geplante Anwendungsbeobachtung mit dem Ziel, Biomarker des oxidativen Stresses bei Hochrisiko-Patienten hinsichtlich ihrer Assoziation zu registrierten, malignen Herzrhythmusstörungen zu untersuchen.

2.1.2 Einschlusskriterien

1. Der Patient ist AICD-Träger und hat geplante Vorstellungstermine in der AICD-Sprechstunde in unserer Klinik. Er befindet sich in einem klinisch stabilen Zustand, der eine weitere ambulante Betreuung rechtfertigt.
2. Der Patient ist in der Lage, der Studienteilnahme zuzustimmen und stimmt zu.
3. Unterzeichnete Einverständniserklärung

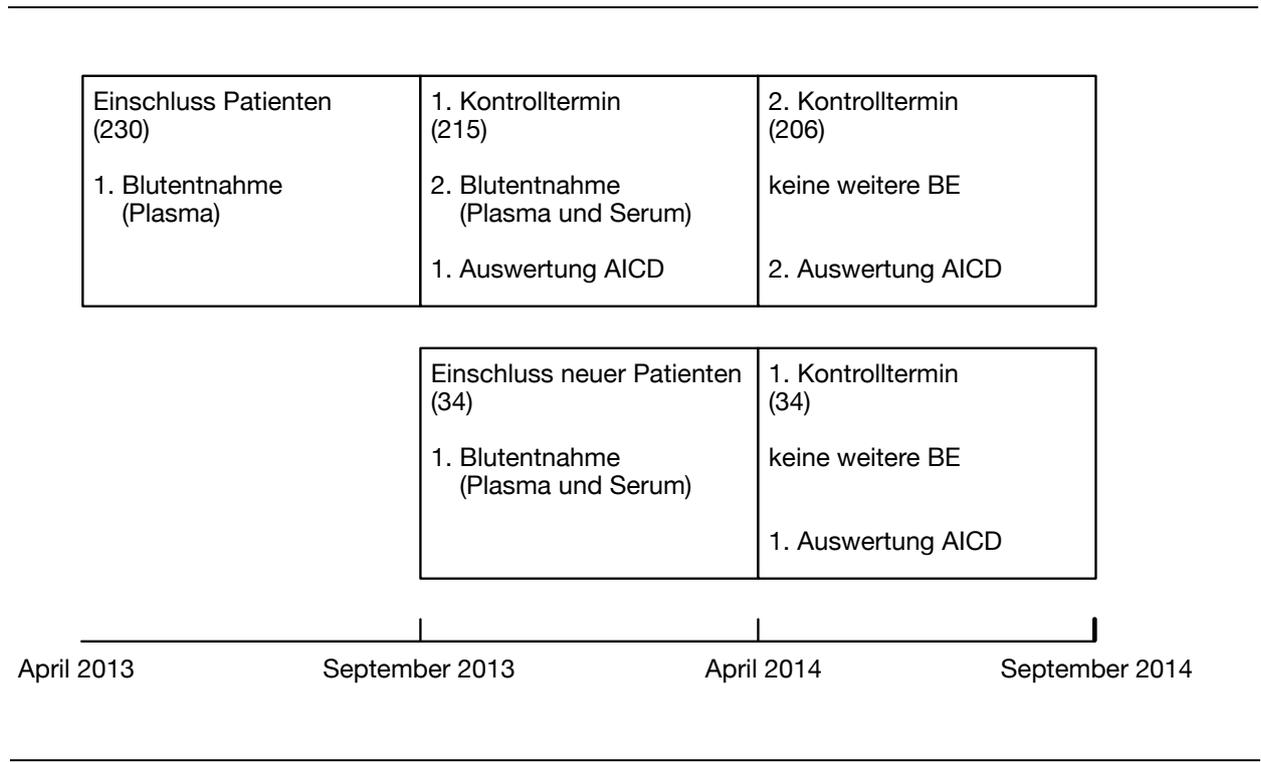
2.1.3 Ausschlusskriterien

1. Patienten unter 18 Jahre
2. Schwangerschaft
3. Verminderte Einsichtsfähigkeit
4. Tumorleiden
5. Stationärer Aufenthalt jedweder Ursache in den vorangegangenen 4 Wochen

2.2 Studienablauf

Im Zeitraum April 2013 – September 2014 wurden ambulante Patienten, die elektiv in die AICD-Sprechstunde der Medizinischen Klinik Kardiologie der Charité (Campus Mitte) kamen, untersucht. Es handelte sich um Patienten, die jeweils alle sechs Monate in der Sprechstunde geplant vorstellig wurden. Dieser Ablauf wurde durch die Studie nicht verändert. Patienten, die zwischen April 2013 und September 2013 in die Studie aufgenommen wurden, wurden über zwei Betreuungsintervalle (1 Jahr) nachuntersucht. Für die im Zeitraum Oktober 2013 bis April 2014 eingeschlossenen Patienten erfolgte die Nachkontrolle für ein Betreuungsintervall (sechs Monate).

Abbildung 4: Studienablauf



2.2.1 Patientenauswahl und Aufklärung

In die Studie wurden alle zustimmenden Patienten eingeschlossen, die den Ein- und Ausschlusskriterien entsprachen. Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki mit Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt (EA1/004/13).

Zu Beginn wurden die Patienten über Inhalt, Wesen, Bedeutung, Tragweite sowie Risiken der Studie mündlich und schriftlich aufgeklärt. Den Patienten wurde dabei stets erklärt, dass die Teilnahme an der Studie freiwillig und ein Ausscheiden aus der Studie zu jedem Zeitpunkt ohne Angabe von Gründen möglich sei. Zudem wurden die Patienten darauf hingewiesen, dass eine Teilnahme oder ein Ablehnen der Teilnahme an der Studie keine Auswirkungen auf die Behandlung habe. Weitere Schritte wurden erst eingeleitet, nachdem die Studienteilnehmer ihr ausdrückliches Einverständnis in mündlicher und schriftlicher Form erteilten.

2.2.2 Datenerhebung und Probenentnahme

Anfangs wurden im Patientengespräch anamnestische Informationen zu Basisdaten, Vorerkrankungen, Lebensgewohnheiten und dem aktuellen Gesundheitsbefinden mit Hilfe eines Anamnesebogens erhoben. Diese Angaben wurden mithilfe der Daten aus der Patientenakte vervollständigt und um Laborwerte und klinische Parameter wie die LVEF und den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVDD) erweitert. Anschließend erfolgte eine nicht in der medizinischen Routine vorgesehene venöse Blutentnahme aus einer kubitalen Vene mittels Butterfly- und Vacutainer®-System(REF367282, Bacton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) in ein 10ml EDTA-Röhrchen (REF367525, Bacton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ,USA). Ab November 2013 wurde für die Zonulin und die ADMA Messungen ein zusätzliches Serum-Röhrchen abgenommen.

Die Erstellung der Baseline Daten und Blutentnahmen erfolgten gemeinsam mit Robert Klüsener, einem weiteren Doktoranden, der sich allerdings mit einer anderen Fragestellung befasste.

2.2.3 Follow-Up

Die Patienten wurden in der Regel alle sechs Monate in der AICD-Sprechstunde vorstellig. Beim zweiten Termin wurde im Rahmen der routinemäßig stattfindenden Ereignisabfrage durch den Funktionsarzt überprüft, ob durch den AICD im letzten Betreuungsintervall maligne, ventrikuläre Rhythmusstörungen detektiert wurden. Anschließend erfolgte eine erneute Blutentnahme. Die zweite Nachuntersuchung fand wiederum sechs Monate später statt und beschränkte sich auf die Kontrolle des AICD.

2.3 Datenschutz

Die Studie wurde gemäß den Datenschutzbestimmungen der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Den Studienteilnehmern wurde eine eindeutige Kombination aus Buchstaben und Ziffern zugeordnet, womit die gewonnenen Proben ausschließlich versehen wurden. Damit ist für Außenstehende eine Zuordnung der Daten oder der Proben auf einen Teilnehmer ausgeschlossen. Die gewonnenen Daten werden unter Wahrung der Pseudonymität und der Datenschutzvorschriften elektronisch gespeichert und weiterverarbeitet. Der Patient hat jederzeit Einseh- und Berichtigungsrecht in die Daten.

2.4 Detektion Endpunkte

Primärer-Endpunkt:

Innerhalb der genannten Patientengruppe wird untersucht, ob die ambulant erhobenen Werte für Carbonylproteine bei den Patienten erhöht sind, die im nachfolgenden Betreuungsintervall im AICD dokumentierte Episoden maligner Arrhythmien aufweisen.

Sekundärer-Endpunkt:

Analog zum primären Endpunkt jedoch für Ox-LDL, MDA, Myeloperoxidase, Kynurenin/Tryptophan, Zonulin, Calprotectin, Nitrotyrosin, ADMA, hs-CRP und NT-proBNP.

2.4.1 ICD-Funktion

Ziel der ICD-Implantation ist es, lebensbedrohliche, ventrikuläre Tachykardien zu erkennen und adäquat zu therapieren. Dabei sind für die akkurate Differenzierung verschiedener Rhythmusstörungen programmierte Detektionsalgorithmen verantwortlich. Zur initialen Erkennung von Rhythmusstörungen besitzt der ICD drei verschiedene Detektions- und Therapiezonen, die jeweils einen Bereich unterschiedlicher Herzfrequenzen abdecken.

Die erste Zone wird für die Klassifizierung von langsamen ventrikulären Tachykardien (VT), die zweite für schnelle ventrikuläre Tachykardien (FVT) und die dritte für Kammerflimmern (VF) verwendet. Die ventrikulären Zykluslängen (R-R-Intervalle) werden andauernd gemessen und den jeweiligen Zonen zugeordnet. Als Interventionsformen stehen antitachykardes Pacing (ATP), Kardioversion oder Defibrillation zur Verfügung und können für die einzelnen Zonen individuell bestimmt werden (73).

2.4.2 ICD-Kontrolle

Grundvoraussetzung für die ICD-Nachsorge ist eine apparative Ausstattung, bestehend aus

gerätspezifischem Programmiergerät, EKG-Schreiber, Monitor und Schrittmachermagnet.

Für die Nachsorge wurden die Programmiergeräte: Biotronik-Renamic und der Medtronic- Carelink Vitatron Modell 2090 verwendet. Zu Beginn stand die Anamnese des Patienten im Vordergrund. Dabei wurde nach dem Auftreten von Besonderheiten im zurückliegenden Intervall wie Palpitationen, Synkopen oder dem Auslösen des

Geräts gefragt und der psychische Zustand des Patienten evaluiert. Zudem wurden Angaben zur Leistungsfähigkeit des Patienten und die aktuelle Medikation exploriert. Anschließend wurde die Lage des Aggregats überprüft und die ICD Tasche auf eine mögliche Infektion untersucht.

Für die technische Überprüfung erfolgte die Anlage eines EKGs. Die Kontrolle des ICD umfasste dabei die Prüfung elektrischer Funktionsdaten (Batteriespannung, Impedanz aller Sonden, Stimulationsschwellen), das Durchsehen und Beurteilen gespeicherter Arrhythmie- Episoden, die Beurteilung der Therapieabgaben und eine Optimierung der Programmierung. Zähler im Implantat registrierten alle Therapieeinsätze und klassifizierten sie hinsichtlich der Detektionskriterien. Dabei wurde zwischen aktuellen Episoden (seit der letzten Kontrolle) und Ereignissen seit der Implantation differenziert. Zur Kontrolle wurden Elektrokardiogramme der registrierten Episoden von einer wandständigen endokardialen Elektrode abgeleitet und gespeichert. Die kritische Analyse der Speicherelektrogramme ermöglichte es dem Funktionsarzt, die vom Gerät vorgenommene Klassifizierung mit seiner eigenen Diagnose zu vergleichen.

Abschließend wurden Detektionsparameter und Frequenzgrenzen überprüft und ggf. einzelne Tachykardiezonen modifiziert.

2.4.3 Dokumentation Endpunkte

Als Endpunkte wurden alle dokumentierten VT-, FVT- und VF-Episoden gewertet und die entsprechenden Interventionen (ATP, Schock) registriert. Zusätzlich wurden die Elektrokardiogramme ausgedruckt und für die Bewertung der registrierten Episoden von Fachärzten analysiert.

2.5 Verarbeitung der Blutproben

2.5.1 Konservierung

Für die Konservierung der Blutproben wurden die EDTA- und Serum-Röhrchen bei 4°C für 15min bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Anschließend wurden das Plasma und das Serum in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Germany) pipettiert, pseudonymisiert und bei -80°C eingefroren. Die Plasma und Serum Restbestände wurden entsorgt. Die Verarbeitung der Blutproben fand jeweils am Tag der Abnahme statt.

2.5.2 Messung der Biomarker

Die Labor Untersuchungen wurden von dem Kooperationspartner Immundiagnostik AG in Bensheim (Deutschland) übernommen. Dazu erfolgte der sichere Versand der Proben auf Trockeneis. In dessen Laboratorien fand die Bestimmung der Biomarker aus dem Patientenplasma bzw. Serum statt. Das Personal war für die analysierten Proben verblindet. Auf Grund der Menge der gemessenen Biomarker konnten nicht alle Parameter für beide Beobachtungszeiträume gemessen werden.

2.5.2.1 ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay)

ELISA ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Antigen und Antikörper durch die Verwendung von Enzymen zur Markierung immunologischer Reaktionspartner.

Bei den verwendeten ELISA-Assays wird grundsätzlich zwischen zwei Verfahren unterschieden.

2.5.2.2 Kompetitive Assays

Beim kompetitiven Enzymimmunoassay konkurrieren zwei Reaktionspartner (einer von den beiden ist das freie Zielantigen der Probe) um einen immobilisierten Dritten.

Im ersten Schritt wird eine mit einem Tracer beschichtete ELISA-Platte sowohl mit der zu untersuchenden Probe als auch mit einem polyklonalen Antiserum inkubiert. Das freie Zielantigen aus der Probe tritt dabei in Konkurrenz mit dem an die Platte gebundenen Tracer um freie Bindungsstellen der spezifischen Antikörper. Mit zunehmender Konzentration des gemessenen Analyten reduziert sich folglich die Bindung zwischen Tracer und Antikörper, sodass die Konzentration des Zielantigens in

der Probe umgekehrt proportional zur Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers ist.

Anschließend erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers, der diesen Tracer-Antikörper-Komplex bindet. Tetramethylbenzidin (TMB) dient dabei als Peroxidase-Substrat. Die Enzym-Substrat-Reaktion wird durch Säure abgestoppt und der entstehende Farbumschlag photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten.

Parallel dazu wird eine Standardkurve - optische Dichte (Absorption bei 450nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Nach diesem Testprinzip wurden folgende Analyten quantifiziert:

- ADMA
- Tryptophan
- L-Kynurenin
- Zonulin

2.5.2.3 nicht-kompetitiv Assays (Sandwich-ELISA)

Bei den nicht kompetitiven Enzymimmunoassays wird das zu bestimmende Antigen zwischen zwei Antikörpern gebunden.

In einem ersten Inkubationsschritt wird die Probe mit dem zu messenden Substrat auf eine Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Je höher der Antigen-Gehalt in der Probe, umso mehr Antigen kann durch die immobilisierten Fängerantikörper gebunden werden. Durch die Hinzugabe eines weiteren enzym-markierten Antikörpers bildet sich folgender Immunkomplex: Fängerantikörper- Analyt – Peroxidase Konjugat.

Für die Enzym-Substrat-Reaktion wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt und die Reaktion durch Säure abgestoppt. Die photometrische Messung der Intensität des Farbumschlags ist der Analyt-Konzentration der Probe dabei direkt proportional.

Sandwich-Elisa Assays wurden für die Quantifizierung folgender Substrate eingesetzt:

- hs-CRP
- Carbonylproteine
- MPO
- Nitrotyrosin

- Calprotectin
- Ox-LDL
- NT-proBNP

2.5.2.4 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie HPLC (high performance liquid chromatography)

Die HPLC stellt eine leistungsfähige Form der Flüssigkeitschromatographie dar und zeichnet sich durch ihr hohes Trennungsvermögen aus.

In einem ersten Schritt wird die zu untersuchende Probe derivatisiert, wodurch ein fluoreszierendes Produkt entsteht, das anschließend in einem isokratischen Verfahren bei 30° durch die HPLC getrennt wird. Die Trennung erfolgt dabei nach dem klassischen Prinzip der Säulenchromatographie. Die zu trennende Probenflüssigkeit wird unter hohem Druck mit Hilfe eines Eluents (flüssige Phase) zur Trennungssäule (stationäre Phase) gebracht. Durch unterschiedlich stark ausgeprägte Wechselwirkungen der Substanzen an der stationären Phase werden diese unterschiedlich lange festgehalten und damit chromatographisch getrennt. Anschließend zeichnen Fluoreszenzdetektoren die Chromatogramme auf. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt mittels Plasma-Kalibrator über die Integration der Peakfläche nach „externer Standard-Methode“.

Mithilfe der HPLC wurde die Konzentration folgender Biomarker bestimmt:

- MDA

2.6 Statistische Auswertung

2.6.1 Statistische Tests

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp).

Für alle Zielgrößen wurden die Befunde zunächst exploratorisch untersucht und deskriptiv ausgewertet, d.h. statistische Maßzahlen wie Mittelwert, Median, Standardabweichung (SD) und Interquartilsdifferenz (IQR) bestimmt. Ziel war es, Normwerte mit zugehörigen Streuungsparametern zu gewinnen.

Zur erweiterten Darstellung wurden Boxplots für die einzelnen Biomarker hinsichtlich ihrer Gruppenzugehörigkeit (ICD-Intervention: ja oder nein) gebildet. Dargestellte Boxplots bestehen aus einer Box, deren Länge dem Interquartilbereich (IQR) entspricht, d.h. sie werden vom ersten und dritten Quartil begrenzt. Die innere Linie der Box markiert den Median. Die Whisker decken das 1,5-fache des IQR ab. Werte größer 1,5x IQR gelten als Ausreißer und werden durch einen Kreis markiert. Liegen die Werte außerhalb 3x IQR, gelten sie als Extremwerte und werden in der Grafik mit einem Stern gekennzeichnet.

Zu Beginn wurden die Variablen auf Normalverteilung geprüft. Da die Variablen nicht normalverteilt waren, wurden nicht-parametrische Tests gewählt. Für Gruppenvergleiche von zwei Gruppen wurde dabei der Mann-Whitney U Test verwendet.

Zur Darstellung der Spezifität und Sensitivität der Biomarker wurden Receiver-Operator-Characteristic Curves (ROC-Analysen) durchgeführt und die Fläche unter der Kurve (AUC = area under the curve) als allgemeines Maß für die diagnostische Wertigkeit des Verfahrens berechnet.

Anschließend wurde durch eine multiple Regressionsanalyse berechnet, ob die gemessenen Biomarker unabhängige Prädiktoren für die Vorhersage einer ICD-Intervention sind.

Die Kovariaten in der durchgeführten binär logistischen Regression wurden dabei in Blöcken durch die Methode „Einschluss“ schrittweise eingegeben. Für die Interpretation der Ergebnisse wurden die Odds Ratio (OR) und das 95% korrespondierende Konfidenzintervall (CI) analysiert.

Das OR gibt dabei an um wie viel sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein SCD auftritt, erhöht, wenn sich die freie Variable um eine Einheit erhöht.

Das statistische Signifikanzniveau wurde als zweiseitiges Alpha von 0,05 festgelegt.

2.6.2 Fallzahlplanung

Zur Planung der Fallzahl gingen wir von den im definierten Betreuungsintervall im AICD dokumentierten Episoden maligner Arrhythmien aus und nahmen an, dass ca. 10% der ICD-Patienten innerhalb von sechs Monaten einen Schock bzw. ein antitachykardes Pacing erleiden werden, d.h. der wahre Parameter p der Population für dieses Ereignis wurde mit $p = 10\%$ geschätzt. Zur Bestimmung der Fallzahl, welche erlaubt, die (wahre) Proportion p unter der Schätzung p aus der gegebenen Population möglichst genau zu bestimmen, legten wir folgendes fest:

1. Ein $(1 - \alpha)$ -Konfidenzintervall, welches mit der Wahrscheinlichkeit von $1 - \alpha$ den wahren Parameter p der Population überdeckt,
2. Eine gewünschte Genauigkeit D , mit welcher die Schätzung verbunden sein soll,
3. Eine Güte (Power) P , mit welcher die Genauigkeitsforderung eingehalten werden soll, d.h. wir verlangen, dass die Genauigkeitsforderung bei der Bestimmung von p in der Form $p \pm D$ mit dieser Power garantiert wird (74).

Im vorliegenden Fall wählen wir (unter Einbeziehung der Schätzung $p = 10\%$):

1. $\alpha = 5\%$, d.h. $1 - \alpha = 95\%$,
2. $D = 5\%$,
3. $P = 80\%$

und erhalten einen Stichprobenumfang von $n = 402$ Patienten.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Allgemeine Patientencharakteristika für die gesamte Studienpopulation und die Gruppen ICD-Intervention bzw. keine ICD-Intervention sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Patientencharakteristika

	Alle Patienten (n= 264)	ICD- Intervention (n= 30)	Keine ICD- Intervention (n=234)	p
Alter, Jahre	67 ± 12	69 ± 11	67 ± 12	,519
männliches Geschlecht	211 (79,9)	28 (93,3)	183 (78,2)	,051
BMI (kg/m ²)	27,8 ± 4,97	29,2 ± 5,05	27,6 ± 4,95	,120
Raucher	185 (70,1)	24 (80)	161 (68,8)	,207
Anzahl packyears	32 ± 24	34 ± 23	31 ± 25	,533
LV-EF, %	37 ± 13	36 ± 13	37 ± 13	,593
LV-DD, mm	57 ± 9	57 ± 9	57 ± 8	,34
Primärprophylaxe	180 (68,2)	18 (60)	162 (69,2)	,307
NYHA I-II	206 (78,6)	22 (73,3)	184 (79,3)	,425
KHK	162 (61,4)	20 (66,7)	142 (60,7)	,684
Diabetes mellitus	74 (28)	14 (46,7)	60 (25,6)	,016
GFR (ml/ min/1,73m ²)	60,83 ± 20,28	60,78 ± 19,85	61,26 ± 23,7	,916

Alle kategorialen Variablen: Anzahl n, (%); kontinuierliche Variablen: Mittelwert ± Standardabweichung

Die Gesamtpopulation setzt sich aus Patienten aus zwei Rekrutierungsintervallen zusammen.

Zwischen April und September 2013 konnten 230 Patienten der Rhythmusprechstunde in die Studie eingeschlossen werden. Ab Oktober 2013 wurden 34 weitere Patienten bis April 2014 in die Studie aufgenommen. Insgesamt nahmen 264 Patienten an der Studie teil, wovon rund 80% männlich und 20% weiblich waren. Das durchschnittliche Alter betrug ca. 67 Jahre (Bereich: 31-89 Jahre) und der BMI lag im Durchschnitt bei 27,8 kg/m². Für die Ejektionsfraktion wurden Werte zwischen 10% und 76 % ermittelt, bei einem Mittelwert von 37% (Median 35%). In 68% der Fälle war die ICD-Implantation primärprophylaktisch indiziert. 21,4% der Teilnehmer hatten eine Herzinsuffizienz NYHA-Klassifikation III oder IV. Bei 61% der Patienten war die Diagnose einer KHK bekannt. Die Prävalenz von Diabetes lag bei rund 28%. Die glomeruläre Filtrationsrate

(GFR) wurde nach der MDRD-Formel berechnet. Die Studienteilnehmer mit detektierter ICD-Intervention (n=30) unterschieden sich von denen ohne ICD-Intervention (n=234) hinsichtlich der Prävalenz von Diabetes (46,7% zu 25,6%, $p = 0,016$). Alle anderen klinischen Parameter wiesen keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen auf.

3.2 Auswertung Beobachtungszeitraum 1

Im Folgenden soll analysiert werden, ob die erhobenen Werte der Biomarker bei Patienten signifikant verändert sind, bei denen im nachfolgenden Betreuungsintervall ICD-Interventionen registriert wurden.

3.2.1 Follow-Up

Von den 230 eingeschlossenen Patienten des ersten Rekrutierungsintervalls erschienen 220 (95,6%) zu ihrem Kontrolltermin. Sieben Teilnehmer verstarben ohne ursächlichen SCD. Drei Patienten ließen sich in anderen Kliniken weiter betreuen, sodass eine ICD-Kontrolle und ein erneute Blutentnahme nicht erfolgen konnten. Bei 14 Patienten (6,4%) wurden ICD-Interventionen im Sinne von VT, FVT oder VF detektiert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: ICD-Kontrolle, Beobachtungszeitraum 1

ICD -Intervention	n	%
Nein	206	93,6
Ja	14	6,4
VT	5	2,3
FVT	5	2,3
VF	4	1,8
Gesamtsumme	220	100

3.2.2 Biomarker

Die grundlegenden statistischen Kennzahlen sind für die gemessenen Biomarker, einerseits für die gesamte Population des ersten Rekrutierungsintervalls und andererseits in Abhängigkeit der detektierten ICD-Interventionen, in Tabelle 3 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 3: Deskriptive Statistik, Beobachtungszeitraum 1

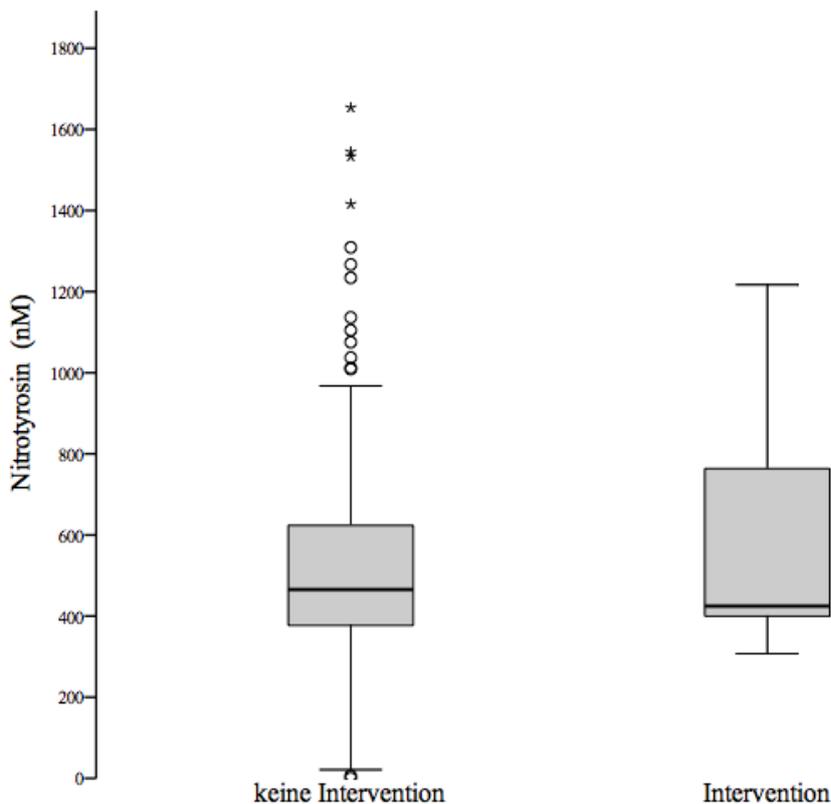
		Nitro-tyrosin (nM)	Zonulin (ng/m)	CP (U/ml)	hs-CRP (mg/l)	NT-proBNP (fmol/ml)	ADMA (μmol/l)	MPO (ng/ml)	L-Kyn (μmol/l)	Tryp (μmol/l)	L-Kyn/ Tryp (μmol/mmol)	Ox-LDL (ng/ml)	Calprotectin (ng/ml)
Population													
Gesamte Population	Mittelwert	607,31	10,57	182,25	4,83	36,50	0,705	134,56	3,66	69,11	54,18	245,61	198,49
	Median	460,36	10,24	177,00	2,32	16,76	0,673	110,20	3,30	68,40	48,15	103,05	102,90
	SD	503,19	2,98	77,27	9,17	70,08	0,187	90,69	1,72	16,19	24,84	426,38	302,10
	Minimum	0,08	1,60	60,90	0,17	0,10	0,30	35,60	1,30	29,50	20,41	21,00	0,1
	Maximum	4295,30	26,82	709,90	99,20	803,50	1,40	1084,00	11,70	191,60	172,31	2998,20	3579
	IQR	242,3	3,13	102,4	4,15	45,78	0,246	48,2	1,6	18,53	24,56	142,4	337,8
Keine ICD-Intervention													
Keine ICD-Intervention	Mittelwert	620,74	10,81	178,80	4,15	32,86	,701	134,35	3,61	68,98	52,96	248,04	184,46
	Median	469,60	10,36	176,60	2,33	16,76	,669	112,60	3,30	68,30	47,68	95,60	100,70
	SD	531,40	2,91	69,30	6,02	65,83	,189	67,20	1,72	15,52	23,49	444,75	198,85
	Minimum	,08	6,42	60,90	,17	,10	,329	37,70	1,30	40,10	23,84	21,00	,10
	Maximum	4295,30	26,82	392,20	50,90	803,48	1,412	300,00	11,70	191,60	172,31	2998,20	930,60
	IQR	254,25	3,09	99,30	4,18	44,45	,250	50,20	1,40	17,60	23,76	136,90	337,60
ICD-Intervention													
ICD-Intervention	Mittelwert	587,61	9,95	169,69	7,87	49,03	,723	173,10	3,79	65,33	61,07	202,11	412,79
	Median	424,61	9,26	135,00	2,11	17,65	,718	95,85	3,25	57,25	60,10	72,35	114,45
	SD	294,26	3,45	71,77	12,04	80,40	,127	265,14	1,67	18,09	28,01	338,93	928,44
	Minimum	307,53	4,10	86,90	,17	,10	,501	54,50	2,00	38,90	20,41	47,00	,10
	Maximum	1216,88	15,67	309,10	43,40	304,34	,935	1084,00	8,10	98,00	138,23	1322,00	3579,00
	IQR	387,17	5,53	111,73	11,01	55,68	,192	37,73	1,95	31,13	31,30	144,25	374,28

Im Text werden die Basalwerte der Parameter in Median (IQR) angegeben. Die Testergebnisse der anschließend durchgeführten nicht-parametrischen Tests für die Gruppenvergleiche sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Ergebnisse der ROC-Analyse werden in Abbildung 15 präsentiert und die berechneten Werte für die Fläche unter der Kurve (AUC) in Tabelle 5 aufgelistet.

Nitrotyrosin

Die Nitrotyrosin Level lagen in der Gruppe ohne Intervention im Median bei 496,6 nM (254,25). Für Teilnehmer mit ICD-Intervention wurden Nitrotyrosin Werte von 424,61 nM (387,17) festgestellt. Die Nitrotyrosin Werten waren zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant verschieden ($p= 0,72$).

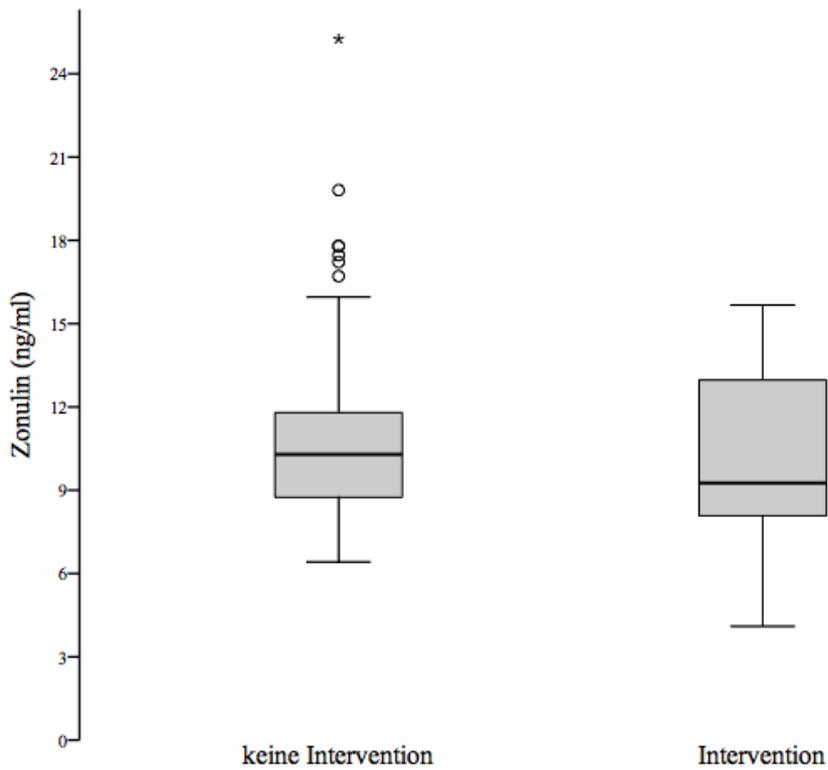
Abbildung 5: Boxplot Verteilung Nitrotyrosin, Beobachtungszeitraum 1



Zonulin

Die Zonulin Werte lagen bei Patienten mit Intervention im Median bei 9,26 ng/ml (5,53) und bei den Patienten ohne Intervention bei 10,36 ng/ml (3,09). Zwischen den beiden Gruppen waren die Werte nicht signifikant verschieden ($p= 0,354$).

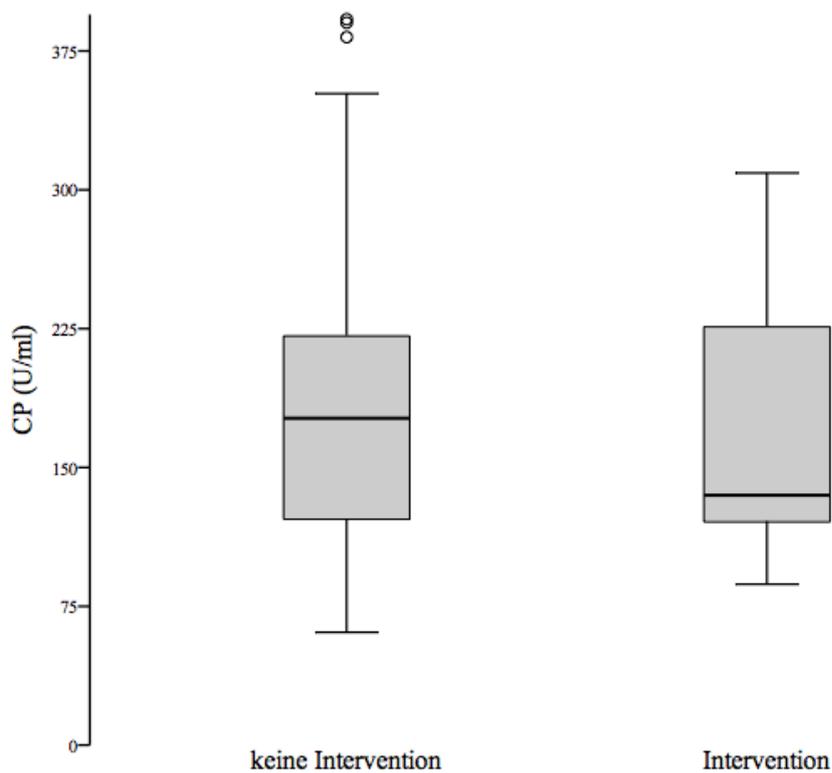
Abbildung 6: Boxplot Verteilung Zonulin, Beobachtungszeitraum 1



Carbonylproteine

Werte für Carbonylproteine lagen in der Gruppe ohne Intervention im Median bei 176,7 U/ml (99,3) und in der Gruppe mit Intervention bei 135 U/ml (117,73). Die Verteilung von Carbonylproteinen unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht ($p= 0,597$).

Abbildung 7: Boxplot Verteilung CP, Beobachtungszeitraum 1

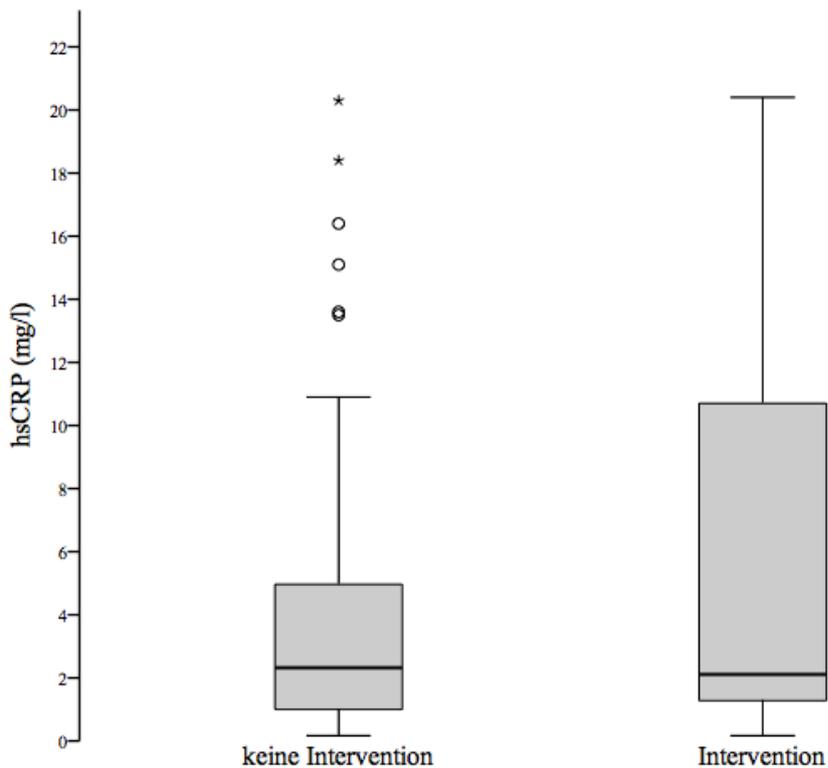


hs-CRP

In der Gruppe ohne Intervention lagen die Basalwerte für hs-CRP bei 2,33 mg/l (4,18) und in der Gruppe mit ICD-Intervention bei 2,11 mg/l (11,01).

Die Basalwerte von hs-CRP waren bei Patienten mit ICD-Intervention nicht signifikant verändert ($p= 0,649$).

Abbildung 8: Boxplot Verteilung hs-CRP, Beobachtungszeitraum 1

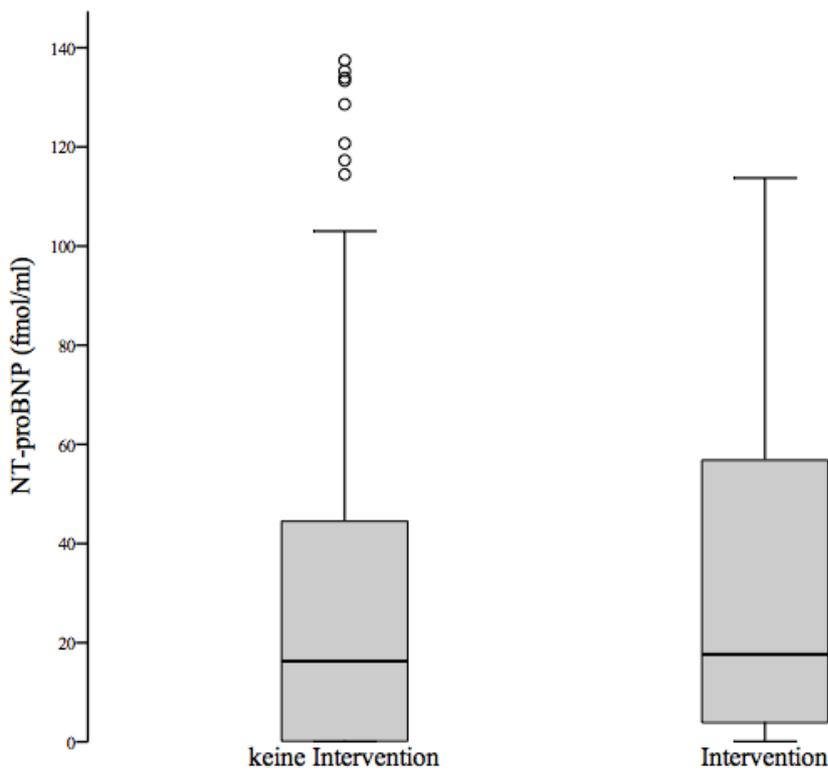


NT-proBNP

Die NT-proBNP Level lagen in der Gruppe ohne Intervention im Median bei 16,76 fmol/ml (44,45). Für Teilnehmer mit ICD-Intervention ergaben sich Werte von 17,65 fmol/ml (55,68).

Die Verteilung von NT-proBNP unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant ($p= 0,485$).

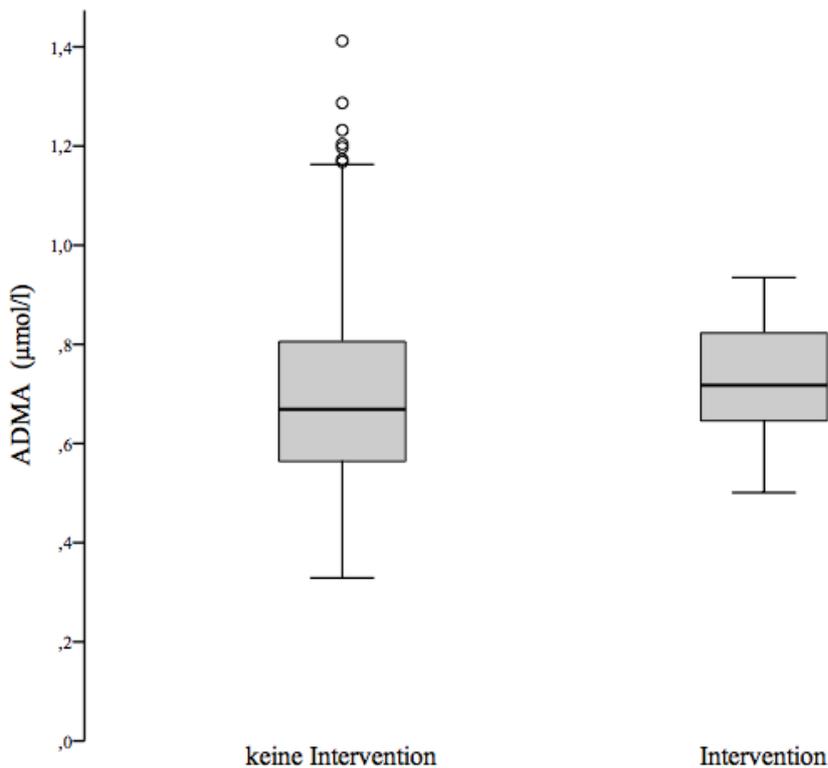
Abbildung 9: Boxplot Verteilung NT-proBNP, Beobachtungszeitraum 1



ADMA

Die Basalwerte von ADMA waren in der Interventionsgruppe im Median bei $0,718 \mu\text{mol/l}$ ($0,192$) und in der Population ohne detektiertes VT/VF-Ereignis bei durchschnittlich $0,669 \mu\text{mol/l}$ ($0,250$). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen bezüglich der Werte von ADMA ($p= 0,303$).

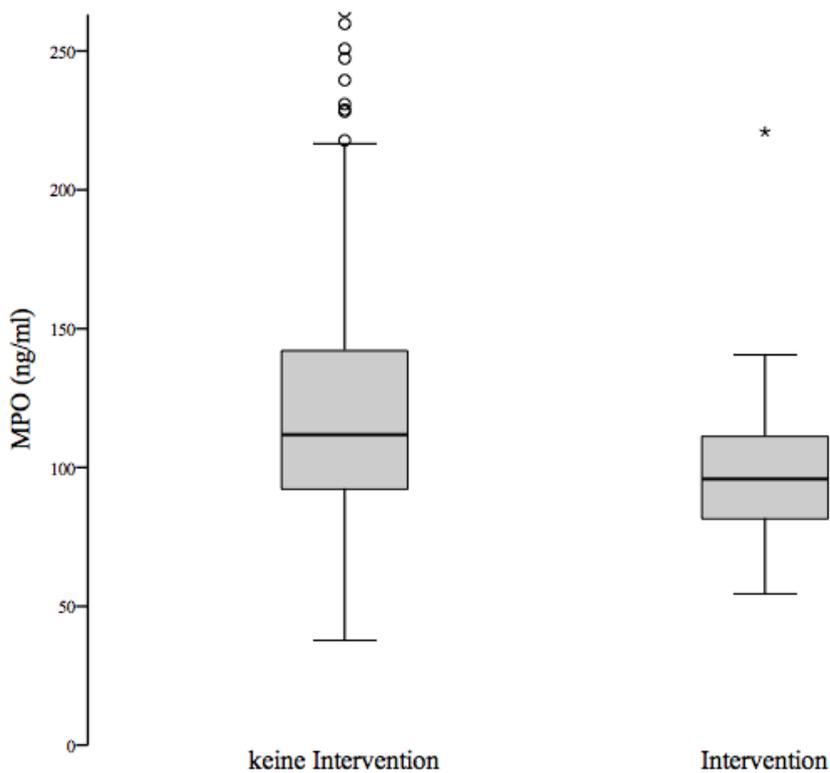
Abbildung 10: Boxplot Verteilung ADMA, Beobachtungszeitraum 1



MPO

Die Werte für die Myeloperoxidase lagen in der Interventionsgruppe bei 95,85 ng/ml (37,72) und in der Gruppe ohne ICD-Ereignis bei 112,6 ng/ml (50,2). Die Verteilung von MPO zwischen diesen beiden Gruppen war nicht signifikant verschieden ($p= 0,141$).

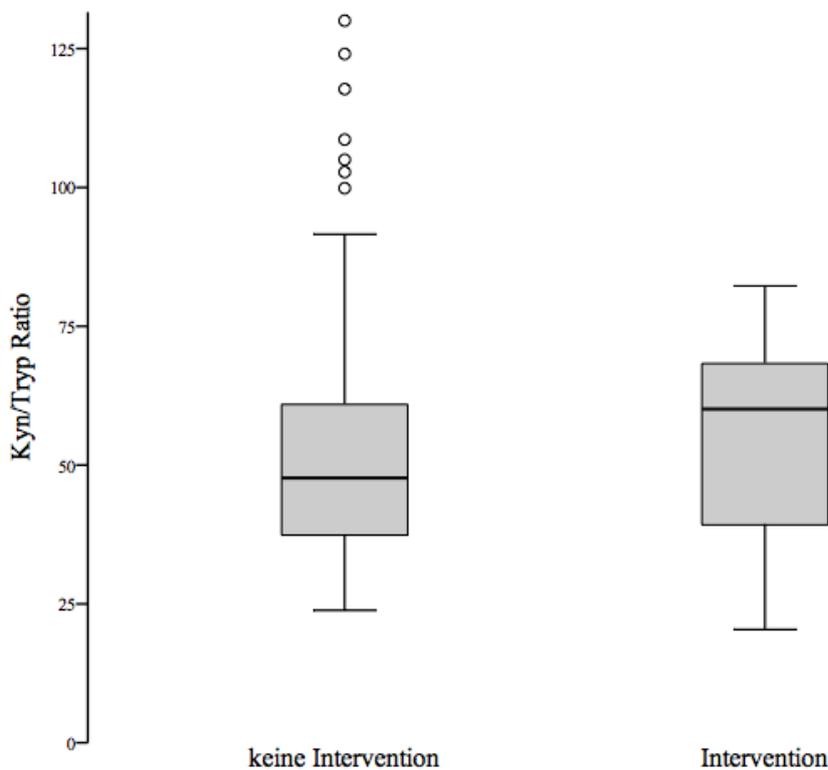
Abbildung 11: Boxplot Verteilung MPO, Beobachtungszeitraum 1



L-Kyn/Tryp

Für die statistische Analyse wurde das Verhältnis zwischen L-Kynurenin und Tryptophan in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ berechnet. Zwischen den beiden Gruppen gab es diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede ($p= 0,115$). Für Patienten mit ICD-Intervention lag L-Kyn/Tryp im Median bei 60,1 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ (31,3). In der Gruppe ohne Intervention lag das L-Kynurenin/Tryptophan Verhältnis im Median bei 47,68 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ (23,76).

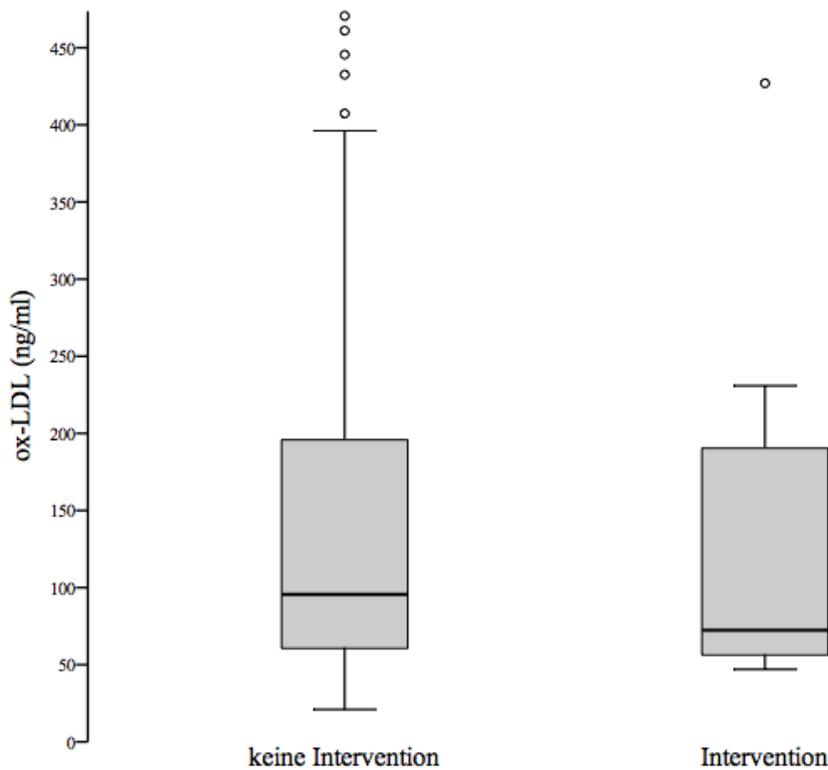
Abbildung 12: Boxplot Verteilung Kyn/Tryp Ratio, Beobachtungszeitraum 1



Ox-LDL

Die Ox-LDL Level lagen bei Patienten mit Intervention bei 72,35 ng/ml (144,25). Im Vergleich dazu wurden in der Gruppe ohne Intervention Werte von 95,60 ng/ml (136,9) gemessen. Die Verteilung von Ox-LDL zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant verschieden ($p= 0,445$).

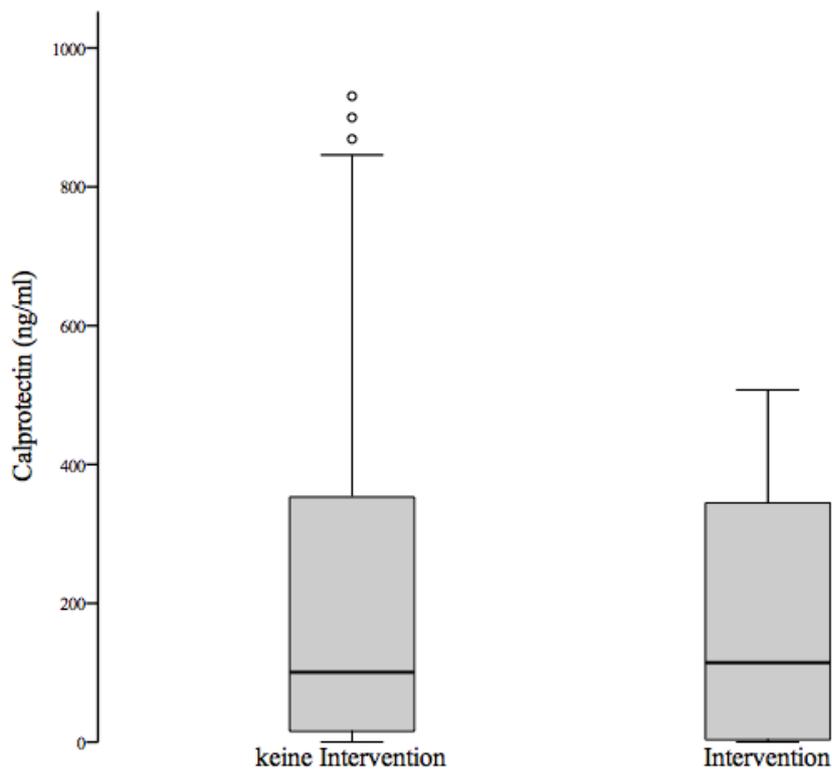
Abbildung 13: Boxplot Verteilung Ox-LDL, Beobachtungszeitraum 1



Calprotectin

Die Calprotectin Basalwerte lagen in der Interventionsgruppe bei 114,45 ng/ml (374,28). Sie unterschieden sich nicht signifikant von den Calprotectin Werten der Gruppe ohne Intervention 100,7 ng/ml (374,28), ($p= 0,987$).

Abbildung 14: Boxplot Verteilung Calprotectin, Beobachtungszeitraum 1



Mann-Whitney U Test

Keiner der abgenommenen Blutparameter war zwischen den beiden Gruppen (mit registrierter ICD-Intervention und ohne) signifikant verändert.

In Tabelle 4 sind die statistischen Kennzahlen des Mann-Whitney U Tests für die Gruppenvergleiche bezüglich der Biomarker zusammengefasst.

Tabelle 4: Mann-Whitney U Test Biomarker, Beobachtungszeitraum 1

	keine Intervention		Intervention		U	z	p
	n	Median	n	Median			
Nitrotyrosin	206	496,6	14	424,61	1524,5	0,358	0,720
Zonulin	206	10,36	14	9,26	1228,5	-0,926	0,354
CP	201	176,6	14	135,0	1288,0	-0,597	0,597
hsCRP	205	2,33	14	2,11	1539,5	0,456	0,649
NT-proBNP	205	16,76	14	17,65	1594	0,698	0,485
ADMA	204	,660	14	,718	1663	1,029	0,303
MPO	205	112,6	14	95,85	1097	-1,474	0,141
L-Kyn/Tryp	203	47,68	14	60,1	1779	1,576	0,115
Ox-LDL	203	95,6	14	72,35	1247,5	-0,764	0,445
Calprotectin	195	100,7	14	114,45	1368,5	0,016	0,987

n = Anzahl, U= Teststatistik, z= standardisierte Teststatistik,
p = asymptotische Signifikanz (2-seitiger Test)

ROC-Analyse

Die ROC-Kurven der Biomarker folgen tendenziell der Winkelhalbierenden (siehe Abbildung 14). Keiner der berechneten AUC-Werte der Biomarker war signifikant von 0,5 verschieden (siehe Tabelle 5).

Die diskriminatorischen Qualitäten der Biomarker für das Auftreten einer ICD-Intervention während des ersten Beobachtungszeitraums waren folglich nicht besser als der Zufall.

Abbildung 15: ROC-Analyse Biomarker, Beobachtungszeitraum 1

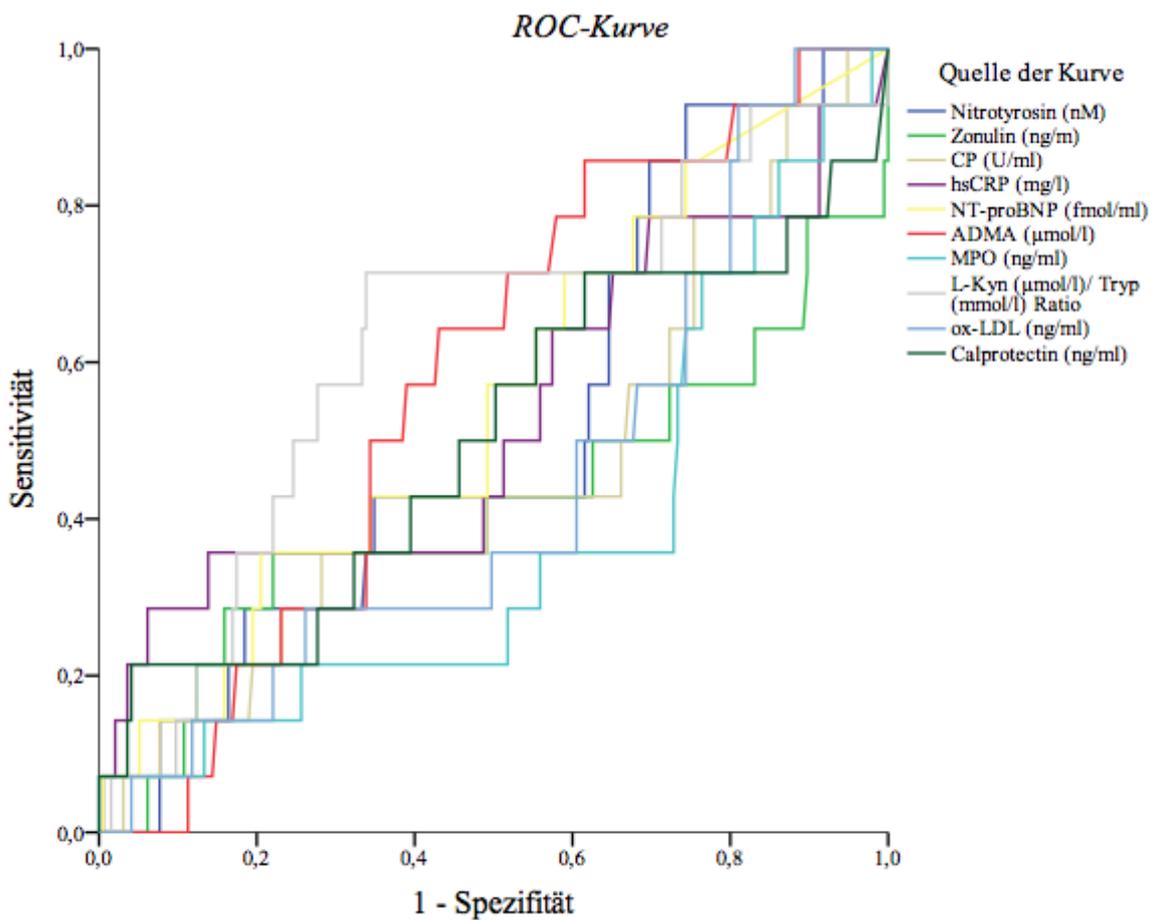


Tabelle 5: AUC (Fläche unter der Kurve), Beobachtungszeitraum 1

Biomaker	Bereich	95% Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
Nitrotyrosin (nM)	,517	,371	,664
Zonulin (ng/ml)	,419	,228	,611
CP (U/ml)	,462	,297	,626
hs-CRP (mg/l)	,532	,348	,715
NT-proBNP (fmol/ml)	,552	,398	,707
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	,579	,450	,707
MPO (ng/ml)	,375	,218	,531
L-Kyn ($\mu\text{mol/l}$)/ Tryp (mmol/l) Ratio	,623	,462	,785
Ox-LDL (ng/ml)	,442	,293	,592
Calprotectin (ng/ml)	,501	,321	,681

Regressionsanalyse

Mit Hilfe der binär logistischen Regression sollte analysiert werden, ob die gemessenen Biomarker unabhängige Prädiktoren für die Vorhersage von ICD-Interventionen sind. Im ersten Block wurden die etablierten Oxidationsstress-Parameter Carbonylproteine, Nitrotyrosin, MPO und Ox-LDL eingeschlossen. Im zweiten folgten die allgemein anerkannten Prädiktoren für ICD-Interventionen ADMA, hs-CRP und NT-proBNP. Zonulin, MDA und Calprotectin wurden für den dritten Block gewählt. Im letzten Block wurden klinische Parameter wie das Geschlecht, das Alter, die GFR, die LVEF, die NYHA-Klassifikation sowie die Krankheitsbilder KHK und Diabetes eingeschlossen. Insgesamt wurden 189 Fälle (82,2%) in die Regressionsanalyse einbezogen.

Im ersten Block konnte keiner der 14 erfolgten ICD-Interventionen korrekt erkannt werden.

Durch den Einschluss weiterer Parameter konnten insgesamt 3 der 14 ICD-Ereignisse richtig zugeordnet werden (21,4%). Calprotectin wies dabei eine grenzwertige Signifikanz ($p=0,043$) bei einem Odds Ratio von 1 auf. Als alleinige Variable in einer Regressionsanalyse war Calprotectin nicht mehr signifikant ($p=0,065$).

Insgesamt konnte für den ersten Beobachtungszeitraum kein Biomarker als unabhängiger Prädiktor identifiziert werden.

Tabelle 6: logistische Regression, Beobachtungszeitraum 1

Variablen	B	SD	Wald	df	Sig.	OR	95% CI (OR)	
							Unterer	Oberer
Nitrotyrosin	,000	,001	,022	1	,882	1,000	,998	1,002
Carbonylproteine	-,003	,005	,286	1	,593	,997	,988	1,007
MPO	,003	,002	2,100	1	,147	1,003	,999	1,008
Ox-LDL	,000	,001	,145	1	,704	1,000	,997	1,002
hs-CrP	,082	,049	2,835	1	,092	1,085	,987	1,193
NT-proBNP	,001	,005	,027	1	,868	1,001	,991	1,011
ADMA	-,416	1,758	,056	1	,813	,660	,021	20,704
Zonulin	-,089	,136	,425	1	,514	,915	,701	1,195
Kyn/Tryp	,009	,014	,412	1	,521	1,009	,981	1,038
Calprotectin	,001	,001	4,346	1	,037	1,001	1,000	1,003
Primärprophylaxe	,243	,737	,109	1	,741	1,275	,301	5,412
NYHA>2	-,317	,936	,115	1	,735	,729	,116	4,558
EF	,029	,029	1,000	1	,317	1,030	,972	1,090
KHK	,373	,772	,233	1	,629	1,452	,320	6,595
Diabetes	,548	,750	,533	1	,465	1,729	,398	7,520
AGE	-,008	,036	,047	1	,828	,992	,924	1,065
GFR	,006	,021	,087	1	,768	1,006	,966	1,048
Konstante	-3,943	3,893	1,026	1	,311	,019		

B= Regressionskoeffizient, SD= Standardabweichung, Wald= Wald-Statistik, df= Freiheitsgrade, sig= Signifikanz, OR = Odds Ratio, CI= 95% Konfidenzintervall

3.3 Auswertung Beobachtungszeitraum 2

3.3.1 Follow-Up

Zum zweiten Kontrolltermin erschienen 206 (93,6%) der 220 Patienten aus dem ersten Beobachtungszeitraum. Die 34 Patienten, die ab Oktober 2013 neu in die Studie aufgenommen wurden, kamen alle zu ihrem Nachsorgetermin. Vier Teilnehmer verstarben, einer davon an einem SCD. Insgesamt wurden bei 21 (8,8%) Teilnehmern VT-, FVT- oder VF-Episoden im Sinne einer ICD-Intervention aufgezeichnet.

Tabelle 7: ICD-Kontrolle, Beobachtungszeitraum 2

ICD -Intervention	n	%
Nein	219	91,3
Ja	21	8,8
VT	13	5,4
FVT	4	1,7
VF	4	1,7
Gesamtsumme	240	100,0

3.3.2 Biomarker

Einen Überblick über die grundlegende Verteilung der Biomarker für die gesamte Fallgruppe, sowie für Patienten mit und ohne Intervention bietet die Tabelle 8. Im Text werden die Basalwerte der Parameter in Median (IQR) angegeben. Die Ergebnisse der für die Biomarker durchgeführten statistischen Tests sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

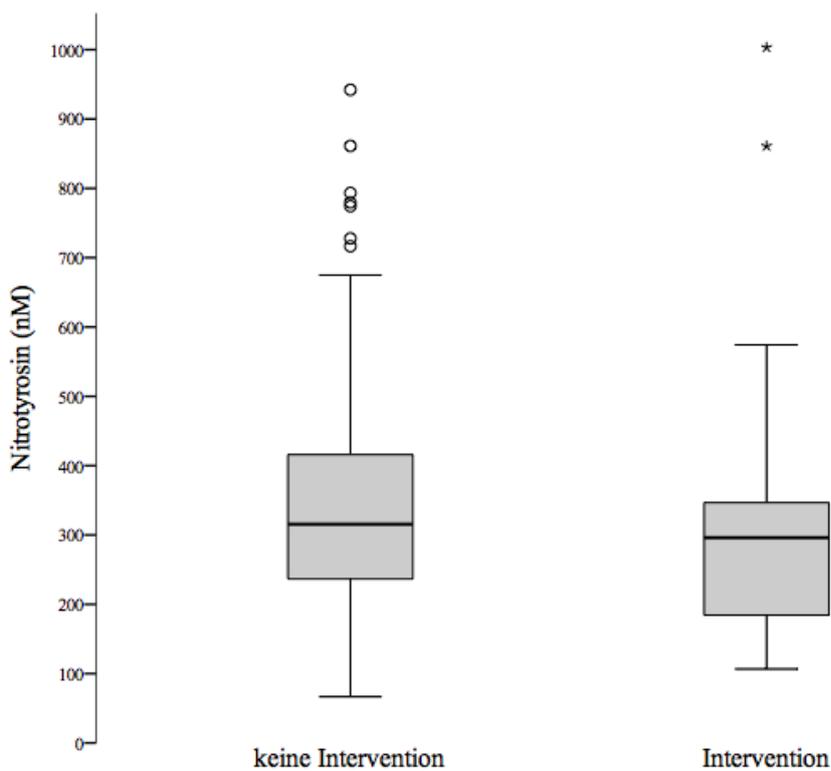
Tabelle 8: Deskriptive Statistik, Beobachtungszeitraum 2

Population		Nitrotyrosin (nM)	Zonulin Plasma (ng/ml)	Zonulin Serum (ng/ml)	CP (U/ml)	MDA (μ mol/l)	MPO (ng/ml)
Gesamte Population	Mittelwert	502	4,95	24,45	242	4,27	125
	Median	306,3	4,3	23,8	229,2	4,13	85,7
	SD	824,5	2,82	7,6	87,1	1,9	174,8
	Minimum	66,7	1	3,4	64,8	0,7	38,1
	Maximum	7721,9	24	54	768,2	10,12	1674,9
	IQR	175,6	2,9	9,5	93,6	2,6	40,5
Keine ICD- Intervention	Mittelwert	530,19	5,2	24,26	245,98	4,29	131,5
	Median	315,55	4,55	23,4	233,7	4,16	84,3
	SD	870,24	3,01	7,73	83,71	1,9	196,17
	Minimum	66,7	1,1	3,4	65,4	0,7	38,1
	Maximum	7721,9	24	54	662,7	10,12	1674,9
	IQR	180,4	3,03	9,18	100,35	2,43	39,25
ICD- Intervention	Mittelwert	347,07	4,97	25,33	216,71	4,2	103,99
	Median	296,1	5,2	25,5	207	4,05	83,2
	SD	241,22	1,94	5,94	72,11	1,86	56,26
	Minimum	106,7	1	15,2	64,8	1,34	54,2
	Maximum	1003,3	9,2	38,4	386,5	7,32	269,1
	IQR	212,9	3,3	9,5	97,5	3,38	36,1

Nitrotyrosin

Im Vergleich zum ersten Beobachtungszeitraum waren die gemessenen Nitrotyrosin Werte des zweiten Beobachtungsintervalls im Median geringer: 460 nM (242,3) vs. 306,3 nM (175,6). Zwischen den Teilnehmern mit ICD-Intervention 296,1 nM (212,9) und denen ohne 315,55 nM (180,4) gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Nitrotyrosin Werte ($p= 0,328$).

Abbildung 16: Boxplot Verteilung Nitrotyrosin, Beobachtungszeitraum 2

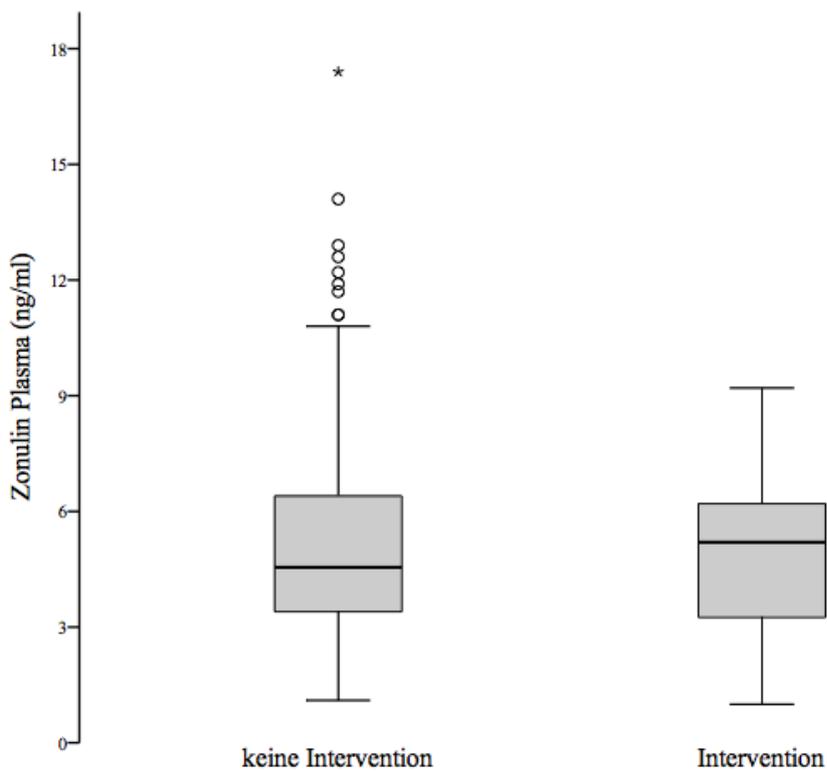


Zonulin Plasma

Für die gesamte Population lagen die im Plasma bestimmten Zonulin Werte des zweiten Beobachtungszeitraums im Median bei 4,3 ng/ml (2,9) und damit niedriger als im ersten Beobachtungszeitraum 10,24 ng/ml (3,13).

Plasma Zonulin Werte waren bei Patienten mit registrierter ICD-Intervention im Median bei 5,2 ng/ml (3,3) und damit im Vergleich zu den Patienten ohne Intervention 4,55 ng/ml (3,03) nicht signifikant verändert ($P= 0,776$).

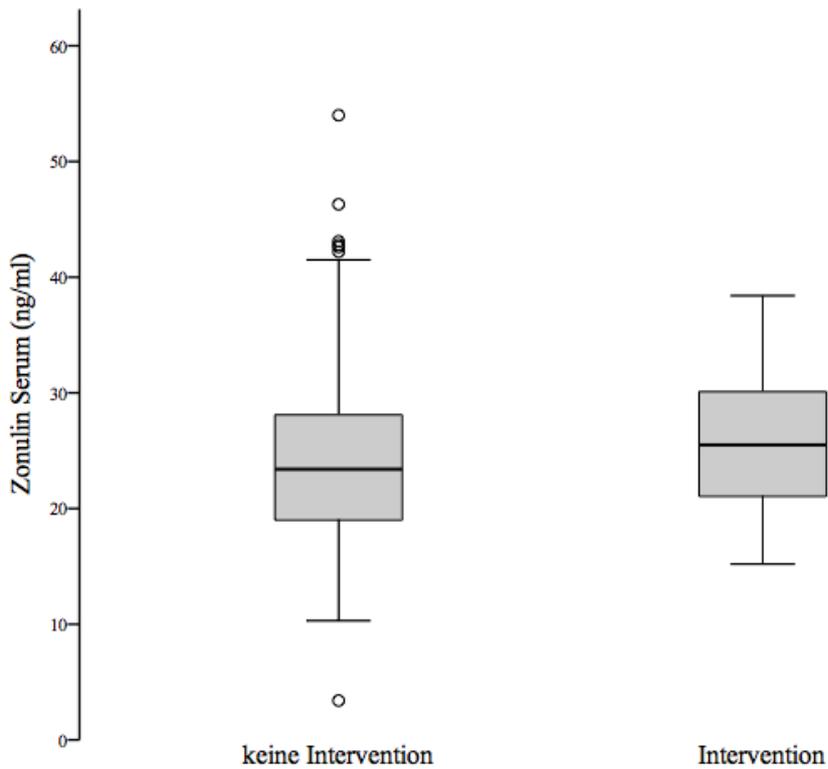
Abbildung 17: Boxplot Verteilung Zonulin Plasma, Beobachtungszeitraum 2



Zonulin Serum

Die Werte für Zonulin, bestimmt aus den Serum Proben, der Patienten mit Intervention lagen im Median bei 23,4 ng/ml (9,18). Im Vergleich zu den Werten bei Patienten ohne Ereignis 25,5 ng/ml (9,5) gab es keinen signifikanten Unterschied ($p= 0,301$).

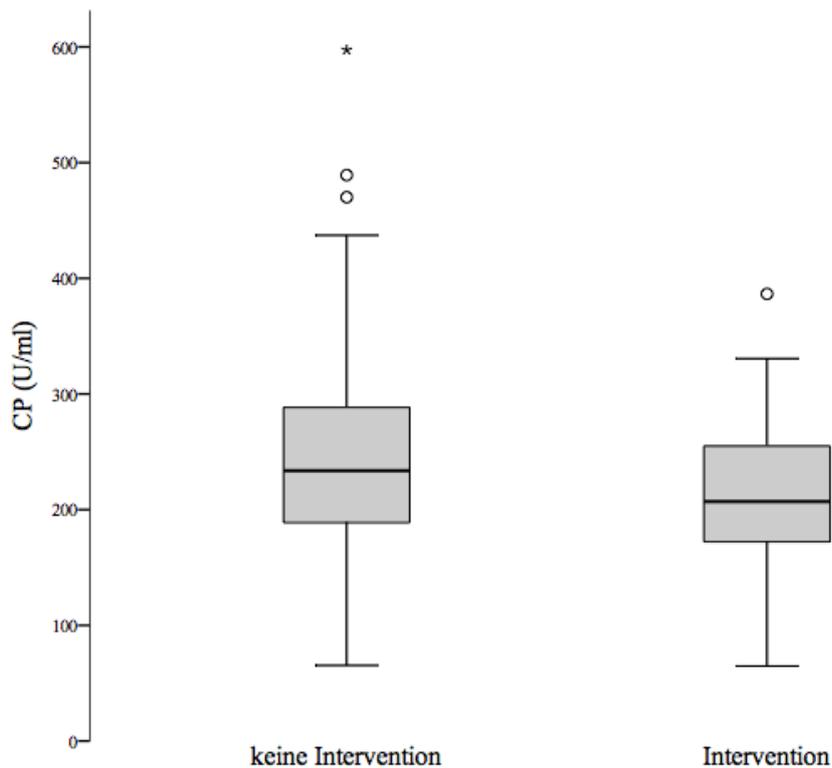
Abbildung 18: Boxplot Verteilung Zonulin Serum, Beobachtungszeitraum 2



Carbonylproteine

Die gemessenen Carbonylprotein Werte waren im zweiten Beobachtungsintervall höher als im ersten 229,2 U/ml (93,6) vs. 177 U/ml (102,4). Zwischen den beiden Gruppen der zweiten Messung, ICD-Intervention 207 U/ml (97,5) und keine ICD-Intervention 233,7 U/ml (100,35), gab es keine signifikante Differenz ($p= 0,133$).

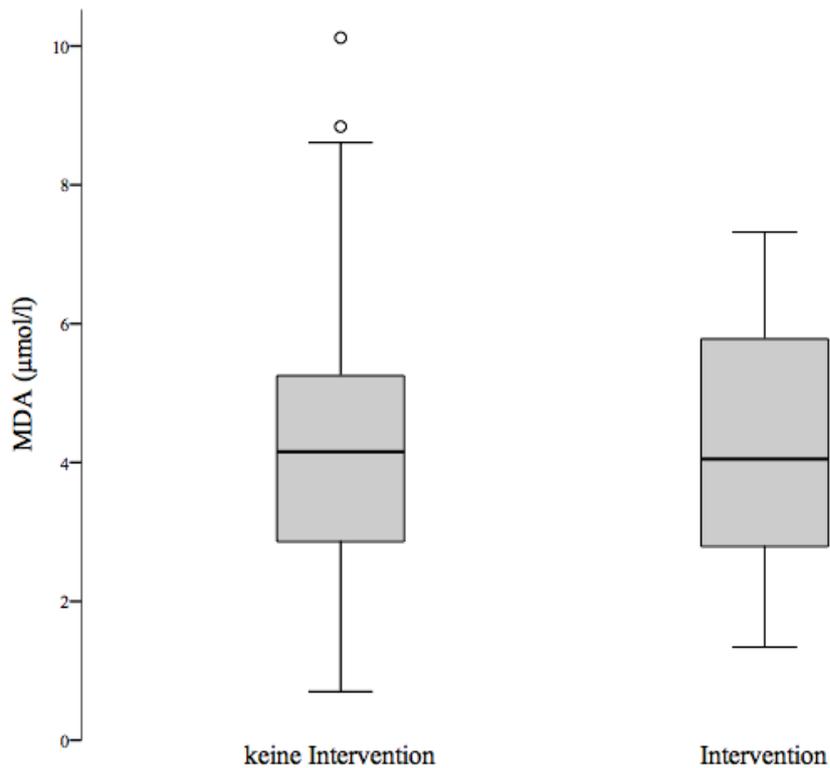
Abbildung 19: Boxplot Verteilung CP, Beobachtungszeitraum 2



MDA

Die MDA Werte lagen in der Gruppe mit ICD-Intervention im Median bei 4,05 $\mu\text{mol/l}$ (3,38). Damit unterschieden sie sich nicht signifikant von den MDA Messungen der Patienten ohne ICD-Ereignis 4,16 $\mu\text{mol/l}$ (2,43) ($p = 0,911$).

Abbildung 20: Boxplot Verteilung MDA, Beobachtungszeitraum 2

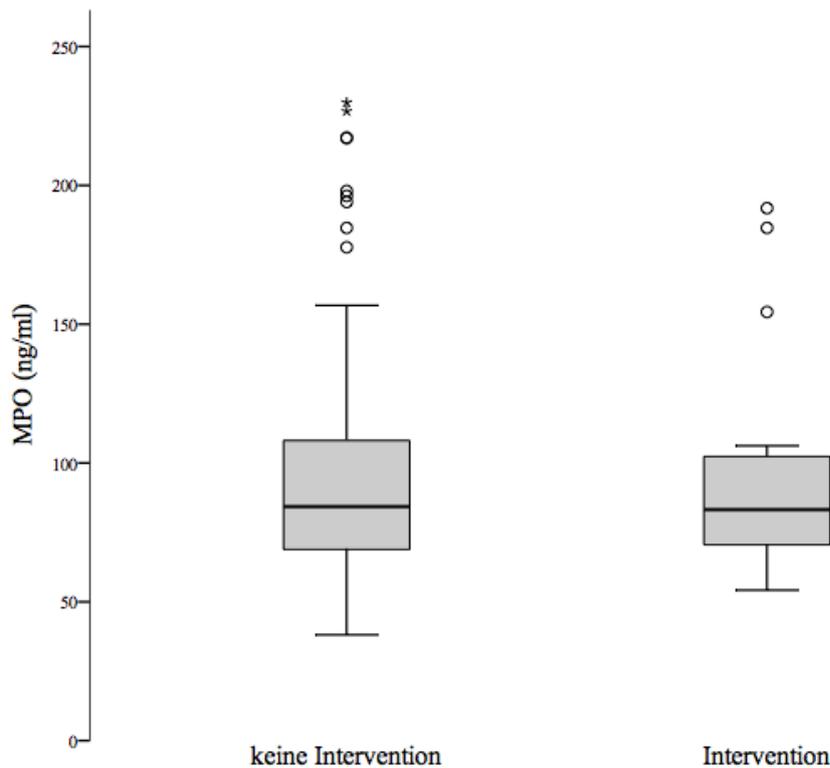


MPO

Bei Betrachtung der jeweiligen gesamten Fallgruppe waren die ersten MPO Werte mit einem Median von 110,4 ng/ml (48,2) im Durchschnitt größer als die MPO Werte des zweiten Beobachtungsintervalls 85,7 ng/ml (40,5).

Die Werte für die Myeloperoxidase lagen in der Interventionsgruppe des zweiten Beobachtungsintervalls bei 83,2 ng/ml (36,1) und in der Gruppe ohne ICD-Ereignis bei 84 ng/ml (39,25). Die Verteilung von MPO zwischen diesen beiden Gruppen war nicht signifikant verschieden ($p= 0,882$).

Abbildung 21: Boxplot Verteilung MPO, Beobachtungszeitraum 2



Mann-Whitney U Test

Keiner der gemessenen Biomarker war zwischen den Gruppen mit und ohne detektierte ICD-Intervention signifikant verschieden.

Tabelle 9: Mann-Whitney U Test Biomarker, Beobachtungszeitraum 2

	keine Intervention		Intervention		U	z	p
	n	Median	n	Median			
Nitrotyrosin	216	120,36	21	105,02	1974,5	-0,797	0,328
Zonulin Plasma	216	118,6	21	123,07	2353,5	0,285	0,776
Zonulin Serum	194	105,63	19	120,95	2108	1,034	0,301
CP	216	121,09	21	97,55	1817,5	-1,502	0,133
MDA	196	108,15	19	106,67	1833	-0,112	0,911
MPO	216	118,79	21	121,12	2312,5	0,148	0,882

n = Anzahl, U= Teststatistik, z= standardisierte Teststatistik, p = asymptotische Signifikanz (2-seitiger Test)

3.4 ROC-Analyse

Die ROC-Kurven aller Biomarker des zweiten Beobachtungszeitraumes verliefen tendenziell entlang der Diagonalen des Systems. Die ermittelten AUC Werte der Biomarker unterschieden sich nicht signifikant von 0,5. Damit entsprechen ihre Sensitivität und Spezifität am ehesten einem Zufallsprozess.

Abbildung 22: ROC-Analyse Biomarker, Beobachtungszeitraum 2

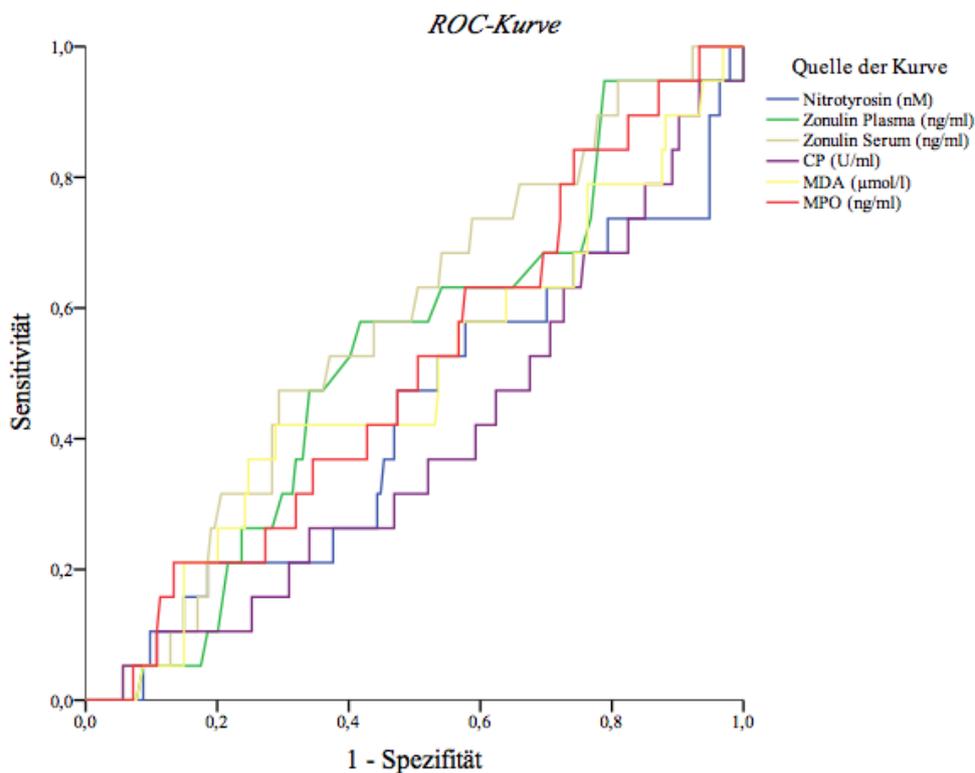


Tabelle 10: AUC (Fläche unter der Kurve), Beobachtungszeitraum 2

Biomaker	Bereich	95% CI	
		Untergrenze	Obergrenze
Nitrotyrosin (nM)	,428	,287	,569
Zonulin Plasma (ng/ml)	,523	,396	,650
Zonulin Serum (ng/ml)	,572	,449	,695
CP (U/ml)	,393	,262	,524
MDA (µmol/l)	,489	,347	,630
MPO (ng/ml)	,504	,376	,633

Regressionsanalyse

Für den zweiten Beobachtungszeitraum wurde ebenfalls durch eine multivariate logistische Regression untersucht, ob die abgenommenen Biomarker prädiktiv für das dichotome Zielkriterium (ICD-Intervention ja oder nein) sind. Insgesamt wurden 192 Fälle in die Analyse eingeschlossen. Für den ersten Block wurden die Parameter Nitrotyrosin, CP und MP ausgewählt. Anschließend folgten Zonulin-Plasma, Zonulin-Serum und MDA. Im dritten Block wurde das Modell um klinische Parameter ergänzt. Durch das Modell konnte keiner der detektierten Interventionen korrekt zugeordnet werden. Keiner der untersuchten Biomarker konnte als unabhängiger Prädiktor für das Auftreten einer ICD-Intervention identifiziert werden.

Statistische Kennzahlen für die einzelnen Biomarker sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: logistische Regression, Beobachtungszeitraum 2

Variablen	B	SD	Wald	df	Sig.	OR	95% CI OR	
							Unterer	Oberer
Nitrotyrosin	,000	,001	,259	1	,611	1,000	,998	1,001
CP	-,004	,004	1,352	1	,245	,996	,988	1,003
MPO	-,002	,004	,291	1	,589	,998	,989	1,006
Zonulin Plasma	,028	,128	,048	1	,826	1,028	,800	1,321
Zonulin Serum	,002	,043	,002	1	,960	1,002	,922	1,089
MDA	-,089	,154	,332	1	,564	,915	,676	1,238
BMI	,040	,054	,540	1	,462	1,040	,936	1,157
Sekundärprophylaxe	,613	,667	,846	1	,358	1,847	,500	6,823
NYHA>2	,427	,673	,402	1	,526	1,532	,410	5,727
EF	-,017	,025	,475	1	,491	,983	,936	1,032
KHK	-,228	,619	,136	1	,712	,796	,236	2,679
AGE	-,003	,027	,012	1	,912	,997	,945	1,051
männliches Geschlecht	1,390	1,098	1,601	1	,206	4,014	,466	34,561
Diabetes	1,466	,600	5,974	1	,015	4,330	1,337	14,024
Konstante	-2,867	3,371	,723	1	,395	,057		

4. Diskussion

4.1 Einleitung in die Diskussion

Der plötzliche Herztod verursacht bis zu 20% der Todesfälle in Industriestaaten. Zum großen Teil wird der SCD dabei durch VF/VT ausgelöst. Die präventive Therapie der Wahl stellt die ICD-Implantation dar. Der AICD kann ventrikuläre Arrhythmien detektieren und durch Interventionen im Sinne von antitachykardem Pacing oder einer Schockabgabe terminieren. Dabei ist die LVEF das wichtigste Kriterium für die Risikobeurteilung von Patienten. Allerdings wurde die LVEF von Expertenkomitees als weder sensitiv noch spezifisch in der Vorhersage des SCD eingestuft, sodass die Etablierung neuer Parameter zur besseren Risikostratifizierung klinisch von großem Interesse ist.

Bekannt ist, dass Vorläufererkrankungen des SCD wie die Herzinsuffizienz, die KHK oder der Diabetes mit erhöhtem oxidativen bzw. nitrosativem Stress assoziiert sind. Zudem vermehren sich die Hinweise in der Grundlagenforschung, dass ROS/RNS ventrikuläre Arrhythmien in Form von VT/VF direkt auslösen können. Da ROS/RNS in den Myozyten einer direkten Messung nicht zugänglich sind, können verschiedene Marker im Plasma oder Serum bestimmt werden, die das generelle Ausmaß an oxidativem Stress widerspiegeln.

Die Idee der Studie war folglich, Plasma Biomarker des oxidativen Stresses für die Identifikation von Hochrisikopatienten zu nutzen. Ziel der Pilotstudie war es, Normwerte mit Streuungsparametern für Oxidationsstressparameter bei ambulanten AICD-Trägern zu ermitteln. Außerdem sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Biomarker bei Patienten, bei denen im nachfolgenden Betreuungsintervall eine durch VF/VT ausgelöste ICD-Intervention detektiert wurde, verändert sind.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst werden und die Aussagekraft der einzelnen Biomarker kritisch analysiert werden. Dazu werden die gewonnenen Basalwerte mit in der Literatur verfügbaren Daten verglichen.

4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zwischen den Patienten mit ICD-Intervention und den Patienten ohne Intervention gab es in beiden Beobachtungsintervallen keine Differenzen hinsichtlich der gemessenen Biomarker.

Wie die vorliegenden Ereignisse gezeigt haben, war keiner der untersuchten Biomarker prädiktiv für die Vorhersage von ventrikulären Arrhythmien bei ICD-Trägern.

Für die Mehrzahl der untersuchten Biomarker präsentiert diese Pilotstudie die ersten Werte von Parametern des oxidativen Stresses in einer Kohorte von Patienten mit AICD.

4.3 Studienpopulation und Endpunkte

Insgesamt wurden 264 Patienten in die prospektive Studie eingeschlossen. Die Vorteile des gewählten Studiendesigns lagen insbesondere in der guten Rücklaufquote durch die Anbindung der Studienteilnehmer an die Rhythmusprechstunde. Außerdem war eine präzise Bestimmung der ICD-Interventionen durch die Speicherfunktion der ICD-Geräte möglich. Die Größe der untersuchten Kohorte ist vergleichbar mit der Teilnehmeranzahl anderer Studien (75). Allerdings konnten weniger Teilnehmer rekrutiert werden, als die in der Fallzahlplanung errechneten. Auch die angenommene Inzidenzrate von 10% ICD-Interventionen im sechs Monate Follow-Up konnte in beiden Beobachtungszeiträumen nicht erreicht werden (6,4% im ersten Beobachtungszeitraum und 8,8% im zweiten Beobachtungsintervall). Bei Betrachtung der 230 Patienten, die über einen Zeitraum von einem Jahr nachuntersucht wurden, ergab sich eine Inzidenzrate von 11%. Im Vergleich zu anderen Studien wurden weniger ICD-Interventionen detektiert (76). Das könnte durch die Tatsache bedingt sein, dass in dieser Studie nicht ausschließlich Patienten mit eingeschränkter LVEF, sondern auch Patienten mit Ionenkanal-Erkrankungen oder Kardiomyopathien eingeschlossen wurden. Möglicherweise spielt auch die gute medizinische Betreuung durch die Anbindung der ambulanten Rhythmusprechstunde an die Universitäts-Klinik eine Rolle. Außerdem kann darin eine Bestätigung der These gesehen werden, dass viele ICD-Träger diesen wohlmöglich gar nicht benötigen und eine bessere Identifikation der Hochrisikopatienten klinisch von großem Nutzen wäre. Das gewählte Follow-Up Zeitfenster von ca. 12 Monaten ist vergleichbar mit anderen Studien (77). Um eine größere Anzahl an ICD-Auslösern zu detektieren, wäre ein Follow-Up Zeitraum von 2 Jahren in homogenen Gruppen (z.B. ausschließlich Patienten mit ischämischer Herzinsuffizienz) sinnvoll (78).

4.4 Biomarker

In dieser Studie war kein Biomarker prädiktiv für die Risikoeinschätzung von ICD-Trägern hinsichtlich einer durch VT/VF ausgelösten ICD-Intervention. Einige der in dieser Arbeit untersuchten Biomarker wurden bereits in anderen aktuellen Studien auf ihre prognostische Aussagekraft bezüglich des plötzlichen Herztodes getestet. Die Ergebnisse dieser Studie sollen im Folgenden mit den Ergebnissen anderer Publikationen verglichen und alle untersuchten Parameter in Hinsicht auf ihre potentielle Rolle als Risikofaktoren analysiert werden.

hs-CRP

Das akute Phase Protein hs-CRP ist assoziiert mit entzündlichen Zuständen und gilt als prädiktiver Marker für die Mortalität bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit. Zudem scheint hs-CRP als Parameter zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos geeignet zu sein (79). Es existieren wenige Daten zur prognostischen Aussagekraft von hs-CRP bezüglich zukünftiger ventrikulärer Ereignisse und ICD-Interventionen. In der Cami-Guide Studie wurde das Ziel verfolgt, die prädiktive Rolle von hs-CRP hinsichtlich des plötzlichen Herztodes oder detektierter VT/VF-Episoden bei Patienten mit Myokardinfarkt und einer LVEF <30% festzustellen (80). Es wurden 280 Patienten ausschließlich mit ischämischer Herzinsuffizienz eingeschlossen und über zwei Jahre nachuntersucht. Die Inzidenzrate, gemessen über ein Jahr, lag mit 17% über derjenigen in dieser Studie (11%). Auch in der Cami-Guide Studie war hs-CRP kein Prädiktor für das Auftreten eines SCD oder VT/VF. Es gab keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen erhöhten hs-CRP Werten und einer ICD-Intervention. Allerdings hatten Patienten mit einem hs-CRP Wert größer 3 mg/l ein dreifach erhöhtes Risiko an Herzversagen zu sterben. In einer anderen Studien, in der 100 Patienten ebenfalls über zwei Jahre untersucht wurden, war hs-CRP ab einem cut-off Wert von 3 mg/l ein unabhängiger Prädiktor für ICD-Interventionen, ausgelöst durch ventrikuläre Arrhythmien.

hs-CRP lag in der Gruppe mit ICD-Intervention im Median bei 5.34 mg/l und damit deutlich über den hs-CRP Werten unseres Studienkollektivs (2,32 mg/l) (76). Eine endgültige Bewertung der publizierten Ergebnisse wird durch die unterschiedlich gewählten Designs der Studien, die hs-CRP einerseits als kontinuierliche und andererseits als dichotome Variable definieren, erschwert. Insgesamt scheint hs-CRP ein vielversprechender Plasma Biomarker für die durch die Herzinsuffizienz verursachte Gesamtmortalität zu sein. Ob und ab welchem Grenzwert hs-CRP prädiktiv für ICD-Interventionen sein könnte, bleibt durch weitere Studien zu beantworten.

NT-proBNP

Vergleichbare Schwierigkeiten scheint es bei der Interpretation der Aussagekraft von NT-proBNP zu geben. NT-proBNP ist ein Spaltprodukt von BNP, einem hauptsächlich von ventrikulären Myozyten synthetisiertem Polypeptid, dessen Freisetzung durch hohe intraventrikuläre Drücke und Dehnung ausgelöst wird.

BNP und NT-proBNP gelten als unabhängige Prädiktoren der Gesamtmortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz, KHK und ACS (81, 82). Da dehnungsabhängige Ionenkanäle in ventrikulären Myozyten Arrhythmien auslösen können, wurden BNP und NT-proBNP bereits als potentielle Prädiktoren hinsichtlich des Auftretens von VT/VF untersucht (83). In diesen Studien gelang es allerdings nicht, einen einheitlichen cut-off Wert für die prädiktive Aussagekraft von NT-proBNP bezüglich ICD-Intervention, ausgelöst durch VT/VF, zu finden. In einer Studie an 35 Patienten mit primärprophylaktisch indiziertem ICD hatte NT-proBNP ab einem Wert von 880 pmol/l mit einer Sensitivität von 73% und einer Spezifität von 88% prädiktive Wertigkeit. Im Vergleich dazu lagen die durchschnittlichen Werte der Patienten mit ICD-Intervention in dieser Studie bei 17,65 pmol/l (84). In zwei weiteren Studien waren NT-proBNP Werte größer >497 ng/l und >405 ng/l mit einem erhöhten Auftreten von ICD-Interventionen assoziiert (75, 85). Bei einem Umrechnungsfaktor von 8,456 ergeben sich für unsere Gruppe mit ICD-Interventionen Werte von 149,3 ng/l.

Die unterschiedlichen Bestimmungen von Grenzwerten zur Kategorisierung von Hochrisikopatienten sind zum Teil durch die Heterogenität der untersuchten Patientenpopulationen bedingt. Anhand der aktuellen Studienlage können keine endgültigen Aussagen bezüglich eines optimalen Grenzwertes zur Risikostratifizierung getroffen werden.

Insgesamt scheint NT-proBNP jedoch ein vielversprechender Marker für die Prädiktion von Patienten mit ICD zu sein. Größere und homogenere Studien sind allerdings nötig, um einen optimalen cut-off Wert zu finden. Eine weitere Herausforderung stellt die Unterscheidung zwischen SCD und nicht SCD bedingter Mortalität dar. Da NT-proBNP als starker Prädiktor der Gesamtmortalität bei herzinsuffizienten Patienten anerkannt ist, bleibt zweifelhaft, ob erhöhte NT-proBNP Werte überhaupt ausschließlich spezifisch für SCD-Todesfälle sein können.

ADMA

ADMA ist ein endogener Inhibitor der NOS und gilt als Marker des durch RNS ausgelösten nitrosativen Stresses. ADMA spielt eine Rolle in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose, sodass verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen wie die KHK oder die systolische Herzinsuffizienz mit erhöhten ADMA Werten assoziiert zu sein scheinen (86, 87). Unlängst wurde ADMA zudem als Prädiktor der kardiovaskulären Mortalität beschrieben (88). Stand September 2015 gibt es allerdings nur eine Studie, die ADMA und andere Parameter des nitrosativen Stresses hinsichtlich des Auftretens von ventrikulären Arrhythmien untersucht hat (78).

2011 wurden bei 106 Patienten mit primärprophylaktischer ICD-Implantation (LVEF im Median bei 24%) Biomarker des nitrosativen Stresses als potentieller Risikomarker untersucht. Erhöhte ADMA Werte waren dabei mit einem gehäuftem Auftreten von VT/VF-Episoden assoziiert. Sie lagen im Median bei Patienten mit registrierter ICD-Intervention bei einem Wert von $0.509 \mu\text{mol/l}$ und waren damit deutlich niedriger im Vergleich zu den ADMA Werten unserer Gesamtpopulation ($0,673 \mu\text{mol/l}$). Eine mögliche Erklärung liegt in der Abhängigkeit von der GFR begründet. ADMA wird hauptsächlich durch die Nieren ausgeschieden, sodass eine verringerte GFR mit erhöhten ADMA Werten korreliert (89). In der Studie galt eine GFR $<30 \text{ ml/min}$ im Gegensatz zu dieser Arbeit als Ausschlusskriterium.

Interessant war zudem, dass ein verringertes Arg/ADMA Ratio mit einer höheren Inzidenz von ICD-Interventionen assoziiert war. Arginin (Arg) gilt ebenso wie ADMA als Substrat der NOS und wird in Stickstoffmonoxid und L-Citrullin umgewandelt. Das Verhältnis von Arginin zu ADMA spiegelt somit die NO Verfügbarkeit wider, deren Mangel ein Risikofaktor für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion ist. Ein Stickstoffmonoxid Defizit wird hauptsächlich durch zwei Mechanismen verursacht. Erstens durch eine verminderte Synthese durch NOS-Inhibitoren wie ADMA oder zweitens infolge einer vermehrten oxidativen Inaktivierung durch ROS (90). Die Arginin Messungen für unsere Patientenpopulation standen zum Zeitpunkt des Promotionsverfahrens noch aus. Sie werden jedoch in eine geplante Publikation mit aufgenommen.

Auch für ADMA sollte in einer größeren und einheitlichen Kohorte (Patienten LVEF $<35\%$) eine erneute Studie durchgeführt werden, um eine präzisere Charakterisierung von ADMA Werten bei ICD-Trägern zu erreichen. Dabei muss der Einfluss der GFR auf die ADMA-Messungen berücksichtigt werden.

Carbonylproteine

Die Carbonylierung gilt als häufigste irreversible oxidative Modifikation von Proteinen. Da Carbonylproteine stabile Endprodukte sind, gelten sie als allgemeiner Indikator für die Protein-oxidation und des generellen Levels an oxidativem Stress (47).

In dieser Arbeit hat sich die Hypothese, dass CP bei Patienten mit SCD erhöht sind, nicht bestätigt. Zwischen den beiden Gruppen gab es hinsichtlich des mittleren Carbonylprotein Gehalts im Plasma keinen Unterschied.

Vergleichbare Daten zu Carbonylproteinen im Zusammenhang mit dem plötzlichen Herztod sind Stand September 2015 nicht vorhanden. In dieser Arbeit wurden meines Wissens zum ersten Mal Carbonylproteine bei ICD-Trägern untersucht.

Ein Vergleich mit anderen Messwerten scheint dabei ein generelles Problem bei der CP Quantifizierung zu sein. In dieser Studie wurde der Gehalt proteingebundener Carbonyle durch ein ELISA-Verfahren mittels Derivatisierung mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und anschließender Bestimmung des gebundenen anti-DNPH-Antikörpers ermittelt. Anschließend wurden die Werte in Bezug zum gesamten Proteingehalt der zu untersuchenden Probe gesetzt.

Die ELISA Methode gilt als robuste und beste verfügbare Analysemethode (91). Allerdings haben verschiedene Labore bei der Messung ihre eigenen Standards und keine einheitliche Referenzmethode. In einer aktuellen Studie wurden in identischen Proben 80-fach verschiedene Carbonylprotein Werte durch zwei verschiedene ELISA Kits gemessen (92). Dabei scheint das unterschiedliche Bindungsverhalten, der in den ELISA-Kits enthaltenden Antikörper, eine wichtige Rolle zu spielen.

Auch die CP Messungen in dieser Arbeit stellen folglich ein laborabhängiges biochemisches Verfahren dar, welches einen Vergleich der Werte mit anderen erschwert. Insgesamt scheint die Methode anfällig für analytische Fehler zu sein, wodurch sich die unterschiedlichen Messungen der Carbonylproteine zwischen den beiden Beobachtungszeiträumen erklären ließen (182 U/L im ersten Beobachtungsintervall und 242U/L im zweiten).

Voraussetzung für eine erneute Studie wäre die Etablierung eines einheitlichen Analyseprozesses und die Festlegung gültiger Standards unter den Laboren. Sinnvoll wäre zudem, anstelle einer Messung des globalen CP Gehalts, differenzieren zu können, welches Protein oder welche Aminosäure der oxidativen Modifikation zugrunde liegen.

Nitrotyrosin

Eine ähnliche Problematik ergibt sich bei der Quantifizierung von Nitrotyrosin, einem zunehmend an Bedeutung gewinnenden Biomarker des oxidativen Stresses. Die Nitrierung von freiem oder proteingebundenem Tyrosin entsteht unter anderem durch die Reaktion mit ROS/RNS wie Peroxynitrit und Stickstoffdioxid (93). Nitrotyrosin spiegelt dadurch indirekt die Konzentration an Peroxynitrit wider. Bei der Quantifizierung von Nitrotyrosin im Plasma muss zwischen freiem und proteingebundenem Nitrotyrosin unterschieden werden. Ein Nachteil der Messung von freiem Nitrotyrosin ist, dass es keine etablierten Normalwerte gibt (53). Da Studien bereits erhöhte Werte für Protein-gebundenes Nitrotyrosin bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung festgestellt haben, wurde auch in dieser Studie Protein-gebundenes Nitrotyrosin gemessen (54). Zudem vermehren sich die Hinweise, dass Nitrotyrosin die SERCA2a in den Myozyten direkt inaktivieren kann. Damit gäbe es einen direkten pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Nitrotyrosin und ventrikulären Arrhythmien (47).

Allerdings konnten in dieser Arbeit keine erhöhten Nitrotyrosin Werte bei Patienten mit VT/VF getriggerten ICD-Interventionen festgestellt werden.

Für die Prädiktion von ICD-Interventionen liegen Stand September 2015 keine vergleichbaren Daten vor. Anhand aktueller Studienergebnisse muss außerdem hinterfragt werden, ob Protein-gebundenes Nitrotyrosin im Plasma das tatsächliche Level an Nitrotyrosin in den Schlüsselproteinen der Myozyten widerspiegelt. Weitere Studien sind notwendig, um das Verhältnis von Protein-gebundenem Nitrotyrosin im Plasma und dem Gehalt an Nitrotyrosin im Myokard besser einordnen zu können.

MPO

Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, dessen Hauptfunktion die Verteidigung des Organismus gegen Infektionen darstellt. Die MPO katalysiert die Umwandlung von reaktiven Sauerstoffspezies und fördert die Oxidation von LDL. Insgesamt sind erhöhte MPO Werte mit pathophysiologischen Prozessen, wie der endothelialen Dysfunktion, der Plaque-Instabilität oder dem strukturellen Umbau des linken Ventrikels assoziiert. Als Marker des oxidativen Stresses wurden erhöhte MPO Werte insbesondere bei Patienten mit KHK und Myokardinfarkt untersucht (20-23).

In der veröffentlichten Literatur fallen unterschiedliche Messmodalitäten für die MPO Quantifizierung und ein großer Bereich an publizierten MPO Werten auf. In einer Studie wurden aus eingefrorenen Serum Proben im Median 10fach höhere MPO Werte detektiert im Vergleich zur Messung aus eingefrorenen Plasma Proben (1979 ng/ml vs.

198 ng/ml) (94). Es wird davon ausgegangen, dass es in Serum und Heparin Proben zu einer artifiziellen Freisetzung von MPO aus Leukozyten und damit falsch hohen Werten kommt.

Bei 50 Patienten mit Anzeichen eines akuten Koronarsyndroms lagen die Serum MPO Werte mit 644 ng/ml deutlich höher als in den untersuchten EDTA-Proben (149 ng/ml). Zudem scheinen Aufbewahrungszeit und Aufbewahrungstemperatur bis zur Zentrifugation die MPO Werte zu beeinflussen. Als Verfahren mit der größten Reliabilität wurde die MPO Messung aus EDTA-Proben vorgeschlagen, bei einer maximalen Aufbewahrungszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur vor der Zentrifugation (94, 95). Auch in dieser Studie wurden die MPO Werte aus EDTA-Proben gewonnen. Die gemessenen MPO Werte entsprechen den EDTA Werten anderer Studien. Allerdings sind identische Aufbewahrungszeiten der einzelnen Proben im klinischen Alltag schwierig einzuhalten, sodass mit einer gewissen Varianz gerechnet werden muss, welche die unterschiedlichen Messergebnisse über die beiden Beobachtungsintervalle erklären könnte (110 ng/ml vs. 85 ng/ml).

Insgesamt scheint die MPO ein geeigneter Biomarker für kardiale Komplikationen nach einem Myokardinfarkt zu sein. Ob die MPO eine prognostische Rolle als Risikofaktor für das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien spielen kann, muss durch weitere Studien geklärt werden. Dabei könnten serielle Messungen sinnvoller sein als einzelne Baseline Messungen, um die Dynamik der MPO Werte besser interpretieren zu können. Zudem sollte ein einheitlicher prä-Analyseprozess etabliert werden, um Messartefakte zu minimieren.

Ox-LDL

Ox-LDL ist ein primäres Lipidperoxidationsprodukt, das eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt. Ox-LDL Werte waren in Studien bei Patienten mit KHK erhöht und steigende Werte korrelierten mit klinischen Komplikationen, wie dem Myokardinfarkt (57, 96).

In vielen Studien wurden dabei Ox-LDL Autoantikörper als indirekte Marker des Ox-LDL Gehaltes gemessen. Allerdings gibt es neuerdings ELISA-Assays, die Ox-LDL direkt im Plasma detektieren können (97). Auch in dieser Studie wurde Ox-LDL direkt durch ein ELISA-Verfahren im EDTA-Plasma gemessen. Die technischen Vorteile dieses Verfahrens liegen insbesondere in der Stabilität von Ox-LDL bei -80°C und in der verlässlichen Reproduzierbarkeit der Messungen aus eingefrorenen Proben. Aktuelle Studien zeigen allerdings, dass Ox-LDL Werte einerseits eine hohe intersubjektive Variabilität aufweisen und andererseits von einer Cholesterol senkenden Therapie

abhängig sind. Gleichzeitig scheinen nicht alle ELISA Verfahren den Einfluss von Statinen auf die Ox-LDL Konzentration adäquat detektieren zu können.

Bei einem Vergleich zwischen einem ELISA Test (Mercodia, Uppsala, Schweden) mit dem in dieser Studie verwendeten ELISA-Kit (Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland) konnte nur der ELISA-Assay der Firma Immundiagnostik AG die zu erwartenden Ergebnisse reproduzieren (98). In dieser Studie konnte nicht nachgewiesen werden, dass Ox-LDL bei Patienten mit ICD-Intervention im Vergleich zu Patienten ohne Intervention erhöht sind. Für den Zusammenhang von Ox-LDL und VT/VF-SCD liegen keine vergleichbaren Daten vor. Für einen zukünftigen Vergleich müssen die verschiedenen Analysemethoden und die Medikation der Probanden bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Zudem sollten serielle Messungen, die den Verlauf der Ox-LDL Werte beim individuellen Patienten darstellen können, zur Überprüfung der klinischen Verwendbarkeit des Biomarkers herangezogen werden.

Calprotectin

Calprotectin, auch bekannt als S100A8/A9, ist ein von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sezerniertes Protein, das mit verschiedenen inflammatorischen Zuständen assoziiert ist. An Mäusen konnte festgestellt werden, dass Calprotectin Einfluss auf die kardiale Funktion hatte und an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt war (99). In der letzten Zeit wurden zudem Studien publiziert, die in Calprotectin einen nützlichen Biomarker für die Risikoeinschätzung von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen sehen (100).

In einer Studie an 193 herzinsuffizienten Patienten wurden Plasma Calprotectin Werte von 300 (193- 427) ng/ml im Median (IQR) festgestellt (70). In einer anderen Studien lagen die Werte in einer Gruppe von Diabetikern im Median bei 3754 ng/l (2290-6194) und in der gesunden Referenzgruppe bei 2437 ng/ml (1040-4262) (101). In dieser Arbeit wurden Werte von 102,9 ng/ml im Median für die gesamte Population gemessen. Die Ergebnisse deuten auf eine große Varianz bei der Ermittlung von Calprotectin Werten hin, insbesondere bei deren Messungen aus Plasma Proben. Wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen sowie eine längere Standzeit der Proben vor dem Zentrifugationsschritt führen zu erhöhten Calprotectin Konzentrationen. Eine konstante Präanalytik ist somit die Voraussetzung für vergleichbare Messungen. Im Vergleich zum Plasma können Calprotectin Werte im Serum

10-fach erhöht sein, da Granulozyten durch den Gerinnungsprozess im Serum angeregt werden, Calprotectin vollständig auszuschütten. Allerdings führen präanalytische Abweichungen bei Messungen aus Serum Proben zu keinen relevanten

Wertverschiebungen. Daher sollte in einer neuen Studie die Messung von Calprotectin aus Serum Proben bevorzugt werden.

MDA

Malondialdehyd entsteht als Endprodukt durch die Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren und spiegelt damit die Aktivität von ROS wider. Der Einfluss von MDA auf Ox-LDL und die Pathogenese der KHK wurde mehrfach beschrieben. Zudem konnte in einer tierexperimentellen Studie an Ratten der Einfluss von MDA auf der Ebene des einzelnen ventrikulären Myozyten demonstriert werden (102). MDA verminderte die Kontraktilität der Myozyten und beeinflusste den intrazellulären Ca²⁺-Gehalt. In unserer Studie konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen MDA Werten im Serum und dem Auftreten von ventrikulären Arrhythmien festgestellt werden. Für die MDA Quantifizierung gibt es mehrere Analyse Methoden. In vielen Studien wird das Addukt aus MDA und Thiobarbitursäure (TBA) spektrophotometrisch gemessen. Dabei kann es zu falsch erhöhten Messergebnissen kommen, da TBA auch mit anderen Aldehyden reagiert und somit nicht nur spezifisch MDA gemessen wird (103). ELISA Verfahren und die Quantifizierung durch die in dieser Studie durchgeführte HPLC-Methode scheinen präzisere Messergebnisse zu ermöglichen. Entscheidend für die korrekte Einschätzung der gemessenen Werte ist zudem, mögliche Einflussfaktoren auf den untersuchten Biomarker zu kennen. In der Literatur wurden erhöhte MDA Werte bei herzinsuffizienten Patienten kontrovers diskutiert. Ein Grund für die variierenden Messwerte könnte in der unterschiedlichen pharmakologischen Behandlung der Patientenkollektive liegen. Der Einfluss einer konsequenten Verschreibung von ACE-Hemmern, AT₂-Blockern und β -Blockern auf MDA Plasma Werte ist von großem klinischen Interesse (104). Für zukünftige Studien wäre eine genaue Beschreibung der Medikation erforderlich, um widersprüchliche Studienergebnisse besser einordnen zu können. Zudem muss zur korrekten Interpretation der MDA Werte das zugrundeliegende Analyseverfahren berücksichtigt werden.

L-Kyn/Tryp

Vergleichbares gilt für die Messung des Verhältnisses von Kynurenin zu Tryptophan.

Der Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan wird entweder durch die Enzyme TDO oder IDO initiiert. Unter physiologischen Bedingungen wird Tryptophan zu 99% über die TDO in der Leber abgebaut (105). Bei inflammatorischen Bedingungen und oxidativem Stress wird das Enzym IDO hochreguliert und Tryptophan vermehrt in außer-hepatischen Zellen über Kynurenin-Wege verstoffwechselt. Das Verhältnis von Kynurenin zu Tryptophan spiegelt dadurch die Aktivität der IDO und folglich auch das generelle Ausmaß an oxidativem Stress wider. Eine erhöhte Aktivität der IDO war in Studien mit Risikofaktoren der Atherosklerose assoziiert. Verminderte Tryptophan Werte wurden bei Patienten mit KHK festgestellt und eine Akkumulation von Kynurenin im Plasma korrelierte mit dem Ausmaß an oxidativem Stress (62, 63, 106).

In dieser Studie konnten keine Hinweise für ein erhöhtes L-Kyn/Tryp Verhältnis bei Patienten mit ventrikulären Arrhythmien festgestellt werden. Bisher gibt es keine vergleichbaren Studien, die Tryptophan oder Kynurenin bei ICD-Trägern bezüglich des Auftretens von ICD-Interventionen untersucht haben. Um die ermittelten Werte auf Plausibilität zu überprüfen, können sie mit den Ergebnissen einer aktuellen Studie verglichen werden, die Kynurenin und Tryptophan bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bestimmt haben.

Bei diesen Teilnehmern wurden erhöhte Kynurenin Werte und ein geringeres Level an Tryptophan nachgewiesen. Diese Patienten hatten zudem ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen. In einer parallel untersuchten gesunden Vergleichsgruppe lag das L-Kyn/Tryp Verhältnis bei $0,023 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ im Median.

In unserer Studie lag das Verhältnis bei $0,048 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$, was dafür sprechen würde, dass Patienten mit indiziertem ICD einem höheren Maß an oxidativem Stress ausgesetzt sind. Die Werte des L-Kyn/Tryp Verhältnis in der Kohorte mit Niereninsuffizienz lagen mit $0,036 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ deutlich unter den Werten in dieser Studie.

Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass eine Cholesterolsenkende Therapie Einfluss auf die im Plasma gemessenen L-Kyn/Tryp Werte haben könnte (105).

Für einen korrekten Vergleich zwischen Patientengruppen, sollte die verschriebene Medikation analysiert werden. Zudem wären Subgruppenanalysen für Patienten mit eingeschränkter GFR hinsichtlich des Kyn/Tryp Verhältnisses interessant.

Zonulin

Erst 2009 wurde festgestellt, dass Zonulin mit prä-Haptoglobin, dem inaktiven Präkursor von Haptoglobin (HP2), einem akute Phase Protein, identisch ist. Für Haptoglobin liegen zwei genetische Varianten vor, namentlich HP1 und HP2. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Hauptfunktion von HP darin liegt, den von Hämoglobin induzierten oxidativen Stress zu verhindern (66). Bei Diabetikern, bei denen das HP-2 Allel homozygot vorlag (HP 2-2), konnte im Vergleich zu Trägern der homozygoten Variante HP 1-1, ein um 500% größeres Risiko für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt werden. Zonulin selbst gilt als Marker der intestinalen Permeabilität und wurde in aktuellen Studien im Zusammenhang mit Diabetes und Autoimmunerkrankungen untersucht (64, 65). Wir hatten die Hypothese, dass Zonulin ähnlich wie das Haptoglobin eine Funktion in der Verhinderung von oxidativem Stress darstellt. Die vorliegende Arbeit präsentiert als erste Studie Zonulin Werte aus Serum und Plasma Proben bei ICD-Trägern. Insgesamt konnte kein Zusammenhang zwischen Zonulin und ICD-Ereignissen festgestellt werden. Die Rolle von Zonulin als Marker des oxidativen Stresses bleibt zweifelhaft.

4.5 Limitationen

Eine Einschränkung der Studie liegt in der Diskrepanz zwischen geplanter und wahrer Fallzahl. Zudem war die Inzidenzrate an ICD-Interventionen geringer als angenommen, sodass für mögliche Subgruppenanalysen die Stichprobenumfänge zu klein waren.

Auf Grundlage der in den beiden Beobachtungsintervallen gefundenen Ergebnisse wurde keine Analyse zwischen den beiden Zyklen und kein competing-risk-model, welches die nicht durch einen plötzlichen Herztod bedingten Todesfälle mit einschließt, durchgeführt.

Durch die Menge an untersuchten Biomarkern konnten nicht alle Biomarker für beide Beobachtungsintervalle bestimmt werden. Zudem konnten die Parameter jeweils nur einmal im Labor gemessen werden, sodass analytische Fehler nicht gänzlich ausgeschlossen werden können. Bisher ist nicht bekannt, ob dauerhaft erhöhte Werte, der plötzliche Anstieg der Biomarker oder das Überschreiten eines bestimmten Grenzwertes die besten Informationen hinsichtlich der Risikoeinschätzung liefern. Häufigere oder serielle Messungen der Biomarker könnten die dynamischen Veränderungen der Biomarker beim individuellen Patienten besser abbilden als eine einmalige Messung. Aufgrund der Untersuchung von ambulanten Patienten, die normalerweise alle sechs Monate in die Sprechstunde kamen, konnten serielle Messungen nicht durchgeführt werden.

4.6 Schlussfolgerung

Die LVEF ist für die Risikoeinschätzung des plötzlichen Herztodes von limitierter Sensitivität. Aktuell herrscht jedoch ein Mangel an zusätzlichen Parametern zur akkuraten Risikostratifizierung. Plasma Biomarker des oxidativen Stresses haben theoretisch ein großes Potential, Patienten mit hohem Risiko zu identifizieren.

In der Literatur finden sich wenig vergleichbare Normwerte, da es zum Teil große methodische Unterschiede bei der Quantifizierung der Biomarker gibt. Da das Wissen über die Varianz von Biomarkern entscheidend für deren korrekte Interpretation ist, sind die hier dargestellten Ergebnisse eine hilfreiche Informationsquelle für die Planung von neuen Studien. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass für die analysierten Biomarker einzelne Messungen weniger sinnvoll sind. Häufigere Messungen, sowie die Kombination mit zusätzlichen diagnostischen Untersuchungen, könnten zur optimalen Identifikation von Hochrisiko Patienten beitragen.

5. Literaturverzeichnis

1. https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/To desursachen2120400137004.pdf?__blob=publicationFile
2. Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(5):e247-346.
3. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, Evanado A, Kehr E, Al Samara M, et al. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Progress in cardiovascular diseases*. 2008;51(3):213-28.
4. Fishman GI, Chugh SS, Dimarco JP, Albert CM, Anderson ME, Bonow RO, et al. Sudden cardiac death prediction and prevention: report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop. *Circulation*. 2010;122(22):2335-48.
5. Martens E, Sinner MF, Siebermair J, Raufhake C, Beckmann BM, Veith S, et al. Incidence of sudden cardiac death in Germany: results from an emergency medical service registry in Lower Saxony. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. 2014;16(12):1752-8.
6. Nichol G, Thomas E, Callaway CW, Hedges J, Powell JL, Aufderheide TP, et al. Regional variation in out-of-hospital cardiac arrest incidence and outcome. *Jama*. 2008;300(12):1423-31.
7. Chugh SS. Early identification of risk factors for sudden cardiac death. *Nature reviews Cardiology*. 2010;7(6):318-26.
8. Burkhard-Meier C, Hoppe UC. [Primary prevention of sudden cardiac death]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2003;128(48):2547-52.
9. Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, et al. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *The New England journal of medicine*. 2005;352(3):225-37.
10. Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, Estes NA, 3rd, Freedman RA, Gettes LS, et al. 2012 ACCF/AHA/HRS focused update incorporated into the ACCF/AHA/HRS 2008 guidelines for device-based therapy of cardiac rhythm abnormalities: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;61(3):e6-75.
11. Connolly SJ, Gent M, Roberts RS, Dorian P, Roy D, Sheldon RS, et al. Canadian implantable defibrillator study (CIDS) : a randomized trial of the implantable cardioverter defibrillator against amiodarone. *Circulation*. 2000;101(11):1297-302.
12. A comparison of antiarrhythmic-drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from near-fatal ventricular arrhythmias. The Antiarrhythmics versus Implantable Defibrillators (AVID) Investigators. *The New England journal of medicine*. 1997;337(22):1576-83.
13. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, et al. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *The New England journal of medicine*. 2002;346(12):877-83.
14. Stecker EC, Vickers C, Waltz J, Socoteanu C, John BT, Mariani R, et al. Population-based analysis of sudden cardiac death with and without left ventricular systolic dysfunction: two-year findings from the Oregon Sudden Unexpected Death Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(6):1161-6.

15. Tung R, Zimetbaum P, Josephson ME. A critical appraisal of implantable cardioverter-defibrillator therapy for the prevention of sudden cardiac death. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(14):1111-21.
16. Ezekowitz JA, Rowe BH, Dryden DM, Hooton N, Vandermeer B, Spooner C, et al. Systematic review: implantable cardioverter defibrillators for adults with left ventricular systolic dysfunction. *Annals of internal medicine*. 2007;147(4):251-62.
17. Brigadeau F, Kouakam C, Klug D, Marquie C, Duhamel A, Mizon-Gerard F, et al. Clinical predictors and prognostic significance of electrical storm in patients with implantable cardioverter defibrillators. *European heart journal*. 2006;27(6):700-7.
18. Israel CW, Manegold JC. [Electrical storm: definition, prevalence, causes and prognostic implications]. *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie*. 2014;25(2):59-65.
19. Wathen MS, DeGroot PJ, Sweeney MO, Stark AJ, Otterness MF, Adkisson WO, et al. Prospective randomized multicenter trial of empirical antitachycardia pacing versus shocks for spontaneous rapid ventricular tachycardia in patients with implantable cardioverter-defibrillators: Pacing Fast Ventricular Tachycardia Reduces Shock Therapies (PainFREE Rx II) trial results. *Circulation*. 2004;110(17):2591-6.
20. Daubert JP, Zareba W, Cannom DS, McNitt S, Rosero SZ, Wang P, et al. Inappropriate implantable cardioverter-defibrillator shocks in MADIT II: frequency, mechanisms, predictors, and survival impact. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(14):1357-65.
21. Germano JJ, Reynolds M, Essebag V, Josephson ME. Frequency and causes of implantable cardioverter-defibrillator therapies: is device therapy proarrhythmic? *The American journal of cardiology*. 2006;97(8):1255-61.
22. Havmoller R, Chugh SS. Plasma biomarkers for prediction of sudden cardiac death: another piece of the risk stratification puzzle? *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*. 2012;5(1):237-43.
23. Goldberger JJ, Basu A, Boineau R, Buxton AE, Cain ME, Canty JM, Jr., et al. Risk stratification for sudden cardiac death: a plan for the future. *Circulation*. 2014;129(4):516-26.
24. Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *The New England journal of medicine*. 2001;345(20):1473-82.
25. Yang KC, Kyle JW, Makielski JC, Dudley SC, Jr. Mechanisms of sudden cardiac death: oxidants and metabolism. *Circulation research*. 2015;116(12):1937-55.
26. Gekle M WE, Gründer St, Petersen M, Schwab A, Markwardt F, Klöcker N, Baumann R, Marti H. *Taschenlehrbuch Physiologie*. Thieme, . 2010. Stuttgart2010. p. 139-51.
27. Antzelevitch C, Burashnikov A. Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Cardiac electrophysiology clinics*. 2011;3(1):23-45.
28. Bers DM, Despa S, Bossuyt J. Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1080:165-77.
29. Jeong EM, Liu M, Sturdy M, Gao G, Varghese ST, Sovari AA, et al. Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52(2):454-63.
30. Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circulation research*. 2015;116(12):1956-70.
31. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass spectrometry reviews*. 2005;24(1):55-99.
32. Sugamura K, Keaney JF, Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine*. 2011;51(5):978-92.
33. Li N, Frigerio F, Maechler P. The sensitivity of pancreatic beta-cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 5):930-4.
34. Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn)*. 2002;8(3):132-40.

35. Neuman RB, Bloom HL, Shukrullah I, Darrow LA, Kleinbaum D, Jones DP, et al. Oxidative stress markers are associated with persistent atrial fibrillation. *Clinical chemistry*. 2007;53(9):1652-7.
36. Sovari AA, Rutledge CA, Jeong EM, Dolmatova E, Arasu D, Liu H, et al. Mitochondria oxidative stress, connexin43 remodeling, and sudden arrhythmic death. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*. 2013;6(3):623-31.
37. Shang LL, Sanyal S, Pfahnl AE, Jiao Z, Allen J, Liu H, et al. NF-kappaB-dependent transcriptional regulation of the cardiac scn5a sodium channel by angiotensin II. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;294(1):C372-9.
38. Anzai K, Ogawa K, Kuniyasu A, Ozawa T, Yamamoto H, Nakayama H. Effects of hydroxyl radical and sulfhydryl reagents on the open probability of the purified cardiac ryanodine receptor channel incorporated into planar lipid bilayers. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;249(3):938-42.
39. Dremina ES, Sharov VS, Davies MJ, Schoneich C. Oxidation and inactivation of SERCA by selective reaction of cysteine residues with amino acid peroxides. *Chemical research in toxicology*. 2007;20(10):1462-9.
40. Qin F, Siwik DA, Lancel S, Zhang J, Kuster GM, Luptak I, et al. Hydrogen peroxide-mediated SERCA cysteine 674 oxidation contributes to impaired cardiac myocyte relaxation in senescent mouse heart. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2(4):e000184.
41. Liu T, Takimoto E, Dimaano VL, DeMazumder D, Kettlewell S, Smith G, et al. Inhibiting mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange prevents sudden death in a Guinea pig model of heart failure. *Circulation research*. 2014;115(1):44-54.
42. Hinata M, Matsuoka I, Iwamoto T, Watanabe Y, Kimura J. Mechanism of Na⁺/Ca²⁺ exchanger activation by hydrogen peroxide in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of pharmacological sciences*. 2007;103(3):283-92.
43. Aon MA. Mitochondrial dysfunction, alternans, and arrhythmias. *Frontiers in physiology*. 2013;4:83.
44. Aon MA, Cortassa S, Akar FG, Brown DA, Zhou L, O'Rourke B. From mitochondrial dynamics to arrhythmias. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(10):1940-8.
45. Brown DA, O'Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovascular research*. 2010;88(2):241-9.
46. Yang KC, Bonini MG, Dudley SC, Jr. Mitochondria and arrhythmias. *Free radical biology & medicine*. 2014;71:351-61.
47. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003;329(1-2):23-38.
48. Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass spectrometry reviews*. 2014;33(2):79-97.
49. Shao CH, Tian C, Ouyang S, Moore CJ, Alomar F, Nemet I, et al. Carbonylation induces heterogeneity in cardiac ryanodine receptor function in diabetes mellitus. *Molecular pharmacology*. 2012;82(3):383-99.
50. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *Journal of lipid research*. 2009;50 Suppl:S346-51.
51. Rudolph V, Andrie RP, Rudolph TK, Friedrichs K, Klinke A, Hirsch-Hoffmann B, et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nature medicine*. 2010;16(4):470-4.
52. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(6):1102-11.
53. Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovascular research*. 2007;75(2):291-302.
54. Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *Jama*. 2003;289(13):1675-80.

55. Lenaerts I, Driesen RB, Hermida N, Holemans P, Heidbuchel H, Janssens S, et al. Role of nitric oxide and oxidative stress in a sheep model of persistent atrial fibrillation. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. 2013;15(5):754-60.
56. Fefer P, Tsimikas S, Segev A, Sparkes J, Otsuka F, Kolodgie F, et al. The role of oxidized phospholipids, lipoprotein (a) and biomarkers of oxidized lipoproteins in chronically occluded coronary arteries in sudden cardiac death and following successful percutaneous revascularization. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions*. 2012;13(1):11-9.
57. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;103(15):1955-60.
58. Walter MF, Jacob RF, Jeffers B, Ghadanfar MM, Preston GM, Buch J, et al. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: a longitudinal analysis of the PREVENT study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(10):1996-2002.
59. Thomas SR, Stocker R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox report : communications in free radical research*. 1999;4(5):199-220.
60. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1991;5(11):2516-22.
61. Widner B, Werner ER, Schennach H, Wachter H, Fuchs D. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clinical chemistry*. 1997;43(12):2424-6.
62. Pertovaara M, Raitala A, Juonala M, Lehtimäki T, Huhtala H, Oja SS, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme activity correlates with risk factors for atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clinical and experimental immunology*. 2007;148(1):106-11.
63. Wirleitner B, Rudzite V, Neurauter G, Murr C, Kalnins U, Erglis A, et al. Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. *European journal of clinical investigation*. 2003;33(7):550-4.
64. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological reviews*. 2011;91(1):151-75.
65. Jayashree B, Bibin YS, Prabhu D, Shanthirani CS, Gokulakrishnan K, Lakshmi BS, et al. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;388(1-2):203-10.
66. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(39):16799-804.
67. Bertaglia E, Scabia G, Dalise S, Lo Verso F, Santini F, Vitti P, et al. Haptoglobin is required to prevent oxidative stress and muscle atrophy. *PloS one*. 2014;9(6):e100745.
68. Asleh R, Marsh S, Shilkrot M, Binah O, Guetta J, Lejbkovicz F, et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circulation research*. 2003;92(11):1193-200.
69. Striz I, Trebichavsky I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res*. 2004;53(3):245-53.
70. Jensen LJ, Kistorp C, Bjerre M, Raymond I, Flyvbjerg A. Plasma calprotectin levels reflect disease severity in patients with chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19(5):999-1004.

71. Peng WH, Jian WX, Li HL, Hou L, Wei YD, Li WM, et al. Increased serum myeloid-related protein 8/14 level is associated with atherosclerosis in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10:41.
72. Bouras G, Deftereos S, Tousoulis D, Giannopoulos G, Chatzis G, Tsounis D, et al. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Current topics in medicinal chemistry.* 2013;13(2):180-200.
73. Fröhlig G CJ, Jung J, Koglek W, Lemke B, Markewitz A, Neuzner J, Herzschrötmacher- und Defibrillator-Therapie. Stuttgart: Thieme; 2013. 477-534 p.
74. Bock J. Bestimmung des Stichprobenumfangs. Wien: Oldenbourg Verlag; 1998.
75. Klein G, Lissel C, Fuchs AC, Gardiwal A, Oswald H, Desousa M, et al. Predictors of VT/VF-occurrence in ICD patients: results from the PROFIT-Study. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology.* 2006;8(8):618-24.
76. Theuns DA, Smith T, Szili-Torok T, Muskens-Heemskerk A, Janse P, Jordaens L. Prognostic role of high-sensitivity C-reactive protein and B-type natriuretic peptide in implantable cardioverter-defibrillator patients. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE.* 2012;35(3):275-82.
77. Galante O, Amit G, Zahger D, Wagshal A, Ilia R, Katz A. B-type natriuretic peptide levels stratify the risk for arrhythmia among implantable cardioverter defibrillator patients. *Clinical cardiology.* 2008;31(12):586-9.
78. Lehmann HI, Goette A, Martens-Lobenhoffer J, Hammwöhner M, Rohl FW, Bukowska A, et al. Asymmetric dimethylarginine predicts appropriate implantable cardioverter-defibrillator intervention in patients with left ventricular dysfunction. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology.* 2011;13(10):1428-35.
79. Blake GJ, Ridker PM. High sensitivity C-reactive protein for predicting cardiovascular disease: an inflammatory hypothesis. *European heart journal.* 2001;22(5):349-52.
80. Biasucci LM, Bellocci F, Landolina M, Rordorf R, Vado A, Menardi E, et al. Risk stratification of ischaemic patients with implantable cardioverter defibrillators by C-reactive protein and a multi-markers strategy: results of the CAMI-GUIDE study. *European heart journal.* 2012;33(11):1344-50.
81. Kragelund C, Gronning B, Kober L, Hildebrandt P, Steffensen R. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *The New England journal of medicine.* 2005;352(7):666-75.
82. van Veldhuisen DJ, Linssen GC, Jaarsma T, van Gilst WH, Hoes AW, Tijssen JG, et al. B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *Journal of the American College of Cardiology.* 2013;61(14):1498-506.
83. Sharif-Naeini R, Folgering JH, Bichet D, Duprat F, Delmas P, Patel A, et al. Sensing pressure in the cardiovascular system: Gq-coupled mechanoreceptors and TRP channels. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2010;48(1):83-9.
84. Manios EG, Kallergis EM, Kanoupakis EM, Mavrakis HE, Kambouraki DC, Arfanakis DA, et al. Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide predicts ventricular arrhythmogenesis in patients with ischemic cardiomyopathy and implantable cardioverter-defibrillators. *Chest.* 2005;128(4):2604-10.
85. Yu H, Oswald H, Gardiwal A, Lissel C, Klein G. Comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide versus electrophysiologic study for predicting future outcomes in patients with an implantable cardioverter defibrillator after myocardial infarction. *The American journal of cardiology.* 2007;100(4):635-9.
86. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. [Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis]. *Journal of cardiology.* 1999;33(2):105-6.
87. Tang WH, Tong W, Shrestha K, Wang Z, Levison BS, Delfraino B, et al. Differential effects of arginine methylation on diastolic dysfunction and disease

- progression in patients with chronic systolic heart failure. *European heart journal*. 2008;29(20):2506-13.
88. Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, et al. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clinical chemistry*. 2007;53(2):273-83.
89. Bode-Boger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M, et al. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(4):1128-34.
90. Bode-Boger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacology & therapeutics*. 2007;114(3):295-306.
91. Augustyniak E, Adam A, Wojdyla K, Rogowska-Wrzesinska A, Willetts R, Korkmaz A, et al. Validation of protein carbonyl measurement: a multi-centre study. *Redox biology*. 2015;4:149-57.
92. Mohanty JG, Bhamidipaty S, Evans MK, Rifkind JM. A fluorimetric semi-microplate format assay of protein carbonyls in blood plasma. *Analytical biochemistry*. 2010;400(2):289-94.
93. Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends in biochemical sciences*. 2003;28(12):646-54.
94. Asselbergs FW, Tervaert JW, Tio RA. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *The New England journal of medicine*. 2004;350(5):516-8; author reply -8.
95. Shih J, Datwyler SA, Hsu SC, Matias MS, Pacenti DP, Lueders C, et al. Effect of collection tube type and preanalytical handling on myeloperoxidase concentrations. *Clinical chemistry*. 2008;54(6):1076-9.
96. Koenig W, Karakas M, Zierer A, Herder C, Baumert J, Meisinger C, et al. Oxidized LDL and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg Study. *Clinical chemistry*. 2011;57(8):1196-200.
97. Tsimikas S. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2006;8(1):55-61.
98. Pflutzner A, Efstrathios K, Lobig M, Armbruster FP, Hanefeld M, Forst T. Differences in the results and interpretation of oxidized LDL cholesterol by two ELISA assays--an evaluation with samples from the PIOstat study. *Clinical laboratory*. 2009;55(7-8):275-81.
99. Croce K, Gao H, Wang Y, Mooroka T, Sakuma M, Shi C, et al. Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation*. 2009;120(5):427-36.
100. Morrow DA, Wang Y, Croce K, Sakuma M, Sabatine MS, Gao H, et al. Myeloid-related protein 8/14 and the risk of cardiovascular death or myocardial infarction after an acute coronary syndrome in the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy: Thrombolysis in Myocardial Infarction (PROVE IT-TIMI 22) trial. *American heart journal*. 2008;155(1):49-55.
101. Pedersen L, Nybo M, Poulsen MK, Henriksen JE, Dahl J, Rasmussen LM. Plasma calprotectin and its association with cardiovascular disease manifestations, obesity and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus patients. *BMC cardiovascular disorders*. 2014;14:196.
102. Folden DV, Gupta A, Sharma AC, Li SY, Saari JT, Ren J. Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *British journal of pharmacology*. 2003;139(7):1310-6.
103. Moselhy HF, Reid RG, Yousef S, Boyle SP. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *Journal of lipid research*. 2013;54(3):852-8.

104. Tingberg E, Ohlin AK, Gottsater A, Ohlin H. Lipid peroxidation is not increased in heart failure patients on modern pharmacological therapy. *International journal of cardiology*. 2006;112(3):275-81.
105. Zinellu A, Sotgia S, Mangoni AA, Sanna M, Satta AE, Carru C. Impact of cholesterol lowering treatment on plasma kynurenine and tryptophan concentrations in chronic kidney disease: Relationship with oxidative stress improvement. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2014.
106. Pawlak K, Domaniewski T, Mysliwiec M, Pawlak D. The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*. 2009;204(1):309-14.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Felix Johannes Boschann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Biomarker des oxidativen Stresses als Prädiktoren des plötzlichen Herztodes – Eine klinische Studie in einer Kohorte von Patienten mit AICD“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Melzer für die Bereitstellung des Themas, die zielgerichtete Unterstützung und die Motivation bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dschietzig für die hervorragende Betreuung und die hilfreiche Unterstützung während der gesamten Zeit.

Bei den Mitarbeitern der Rhythmussprechstunde und der Immundiagnostik AG möchte ich mich für deren Hilfsbereitschaft bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei meiner Familie und meiner Freundin möchte ich mich für die liebevolle und vielseitige Unterstützung bedanken.