

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Kardiologie, Angiologie, Pneumologie, Sport- und Rehabilitationsmedizin

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

**Kolokalisation von C-reaktivem Protein
und dem terminalen Komplement-Komplex
bei dilatativer Kardiomyopathie**

**Implikationen für die
nicht ischämische Herzinsuffizienz**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Vorgelegt von
Bettina Julia Wolf

Ellwangen

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Torzewski

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Mertens

Tag der Promotion: 20.05.2010

Meinen Eltern

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	I
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	II
1 EINLEITUNG	
1.1 Die Einteilung der Kardiomyopathien	1
1.2 Die dilatative Kardiomyopathie	3
1.3 Das Komplementsystem	10
1.4 C-reaktives Protein	12
2 MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Material	15
2.2 Methoden	17
3 ERGEBNISSE	
3.1 Färbungen	29
3.2 Tabellen	31
3.3 Korrelationen	37
4 DISKUSSION	
4.1 Vorkommen und Kolokalisation von CRP und C5b-9	38
4.2 hsCRP-Plasmaspiegel	39
4.3 Virales Genom	40
4.4 Färbeergebnisse und Verteilungsmuster	41
4.5 Klinischer Ausblick	43
5 ZUSAMMENFASSUNG	45
6 LITERATURVERZEICHNIS	47
7 DANKSAGUNG	56

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADV	Adenovirus
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AHA	American Heart Association
ARVCM	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
BMI	Body Mass Index
BNP	Brain natriuretic peptide
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
cm	Zentimeter
COX	Coxsackievirus
CRP	C-reaktives Protein
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDD	Enddiastolischer Durchmesser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ESD	Endsystolischer Durchmesser
F _{ab}	Antigenbindendes Fragment / Variable Region
F _c	Komplementbindendes Fragment / Konstante Region
FS	Fractional shortening / Verkürzungsfraction
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HHV	Humanes Herpesvirus
HLA	Human leukocyte antigen
hsCRP	High sensitive / Hoch sensitives C-reaktives Protein

H ₂ O dest.	Destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
ISFC	International Society and Federation of Cardiology
KCL	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LGE	Late gadolinium enhancement / Späte Gadoliniumanreicherung
LV	Linker Ventrikel
LVF	Linksventrikuläre Funktion
MAC	Membrane attack complex
MAP-Kinase	Mitogenaktivierte Protein-Kinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Number / Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NF	Nuclear factor / Kernfaktor
NCCM	Nicht klassifizierbare Kardiomyopathie
nPCR	Nested Polymerase chain reaction
NT-proBNP	N-terminal / N-terminales pro brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pg	Picogramm
pH	Pondus hydrogenii
PVB	Parvovirus B19

p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
quant.	Quantitativ
qual.	Qualitativ
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase – Polymerase chain reaction
RV	Rechter Ventrikel
TEA	Thrombendarterektomie
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organisation
µg	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Die Einteilung der Kardiomyopathien

Nach der aktuellen WHO/ISFC-Klassifikation [52, 71] werden alle Erkrankungen des Herzmuskels als Kardiomyopathien bezeichnet, die mit einer objektivierbaren kardialen Funktionsstörung einhergehen. Eine Einteilung erfolgt hierbei anhand des klinischen Phänotyps, d.h. nach der Hämodynamik und der makroskopischen Anatomie [72]. Dabei werden fünf Formen der Kardiomyopathie unterschieden:

1. Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)
2. Die restriktive Kardiomyopathie (RCM)
3. Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVCM)
4. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM).
5. Die nicht klassifizierbare Kardiomyopathie (NCCM)

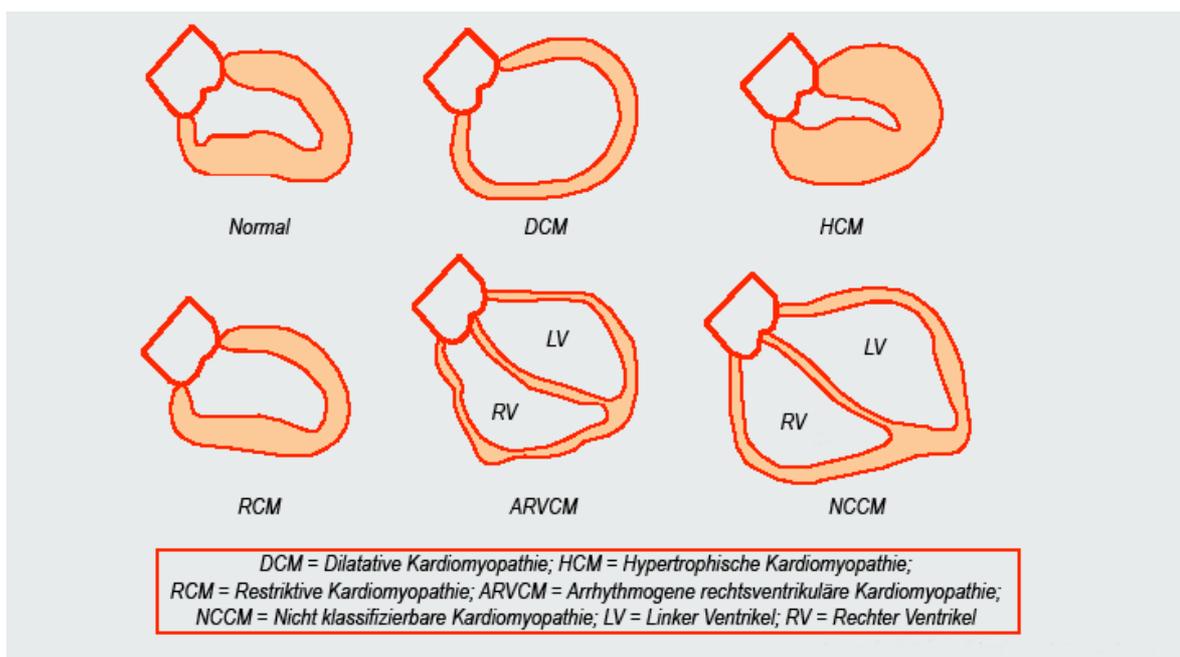


Abb. 1: Klassifikation der Kardiomyopathien [54]

Über diese fünf Formen hinaus gibt es noch den Begriff der „spezifischen Kardiomyopathie“. Dieser beschreibt Herzmuskelerkrankungen, die mit bestimmten kardialen oder systemischen Erkrankungen einhergehen.

Beispiele hierfür sind die ischämische, die valvuläre, die hypertensive, die inflammatorische und die metabolische Kardiomyopathie. Des Weiteren existieren spezifische Kardiomyopathien, die im Rahmen von Speichererkrankungen oder generalisierten Systemerkrankungen, wie z.B. beim Lupus erythematoses, bei der Polyarteritis nodosa oder der Sklerodermie auftreten, oder die aufgrund muskulärer Erkrankungen, wie Skelettmuskeldystrophien oder -myopathien entstehen.

Darüber hinaus gibt es auch medikamentös-toxische Herzmuskelerkrankungen, welche aufgrund verschiedener äußerer Faktoren, wie z.B. durch die Aufnahme von Alkohol, trizyklischen Antidepressiva, Katecholaminen oder auch Zytostatika entstehen können.

Die *American Heart Association* (AHA) hat im Jahr 2006 eine neue weitere Einteilung in primäre und sekundäre Kardiomyopathien vorgenommen [57].

Die primären Kardiomyopathien sind die am häufigsten vorkommenden Kardiomyopathien. Sie können genetisch bedingt oder erworben sein und beschränken sich überwiegend auf den Herzmuskel. Beispiele für deren zugrunde liegende Ursachen sind Vitien oder die hypertensive Herzkrankheit. Zu den primären Formen gehört auch die dilatative Kardiomyopathie (DCM), welche Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

Sekundäre Kardiomyopathien treten im Gegensatz dazu im Rahmen von generalisierten Funktionsstörungen, wie dem Diabetes Mellitus oder der Hämochromatose auf.

1.2 Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)

1.2.1 Epidemiologie der DCM

Die dilatative Kardiomyopathie ist die am häufigsten auftretende morphologische Form der Kardiomyopathien. Ihre Inzidenz beträgt momentan 3 pro 100.000 Einwohner und steigt stetig an [28]. Ihre Prävalenz liegt dabei bei 10-15 pro 100.000 Einwohner. Die höchste Inzidenz von 1 zu 100 bzw. 1 zu 1.000 findet sich auf dem afrikanischen Kontinent [84]. Das generelle Risiko, an DCM zu erkranken, ist für Menschen afroamerikanischer Abstammung, genauso wie für Männer im Vergleich zum weiblichen Geschlecht, jeweils um das 2,5-fache erhöht [7, 28].

Die Krankheit tritt generell in allen Altersgruppen auf, kommt jedoch bevorzugt bei jungen Menschen und im mittleren Lebensalter vor. In selteneren Fällen können auch bereits Kleinkinder und Säuglinge betroffen sein. Die Inzidenz von Kardiomyopathien im Kindesalter beträgt ca. 1 % aller angeborenen Herzfehler und die DCM ist dabei für 4-8 % aller kardialen Todesfälle verantwortlich [3]. Morbidität und Mortalität nehmen mit dem Alter zu [9].

1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild und strukturelle Veränderungen

Das klinische Erscheinungsbild der DCM ist gemäß der WHO durch chronisch fortschreitendes Herzversagen und eine Vergrößerung des Herzvolumens durch die Dilatation des linken oder beider Ventrikel ohne Verbreiterung der Ventrikelwände charakterisiert. Des Weiteren findet sich bei der Krankheit eine stark verminderte Ejektionsfraktion aufgrund einer überwiegend systolischen Kontraktionsstörung des Herzmuskels mit zusätzlicher diastolischer Komponente.

Entsprechend der strukturellen Veränderungen äußert sich die Krankheit durch das Auftreten belastungsabhängiger Dyspnoe und körperlicher Schwäche, sowie durch Rhythmusstörungen und Palpitationen.

Die Patienten können sich durch diese Symptome stark beeinträchtigt fühlen. Das klinische Kardinalsymptom der DCM, die nicht ischämische Herzinsuffizienz, kann zudem von Arrhythmien und Thrombembolien begleitet sein. Jede dieser Dysfunktionen kann in jedem Stadium der Krankheit zum plötzlichen Herztod führen. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt bei 40 Jahren [28]. Dass die DCM durch ihren langsamen Verlauf oft erst in späteren Stadien diagnostiziert wird, ist prognostisch sehr ungünstig. Daher liegt bei symptomatischen Patienten auch meist bereits eine fortgeschrittene Form der Krankheit vor, wobei 25 % der Patienten noch im Jahr der Diagnosestellung versterben. Bei voll entwickeltem Krankheitsbild können alle Schweregrade der Herzinsuffizienz angetroffen werden. Dabei kann Drittel aller Herzinsuffizienzen auf die DCM zurückgeführt werden [14].

Pathobiologisch zeigen sich bei der DCM interstitielle Fibrosen und strukturelle Alterationen der extrazellulären Matrix, die einen Verlust funktionstüchtiger Zellen verursachen und dadurch die Herzfunktion beeinträchtigen. Durchschnittlich übersteigt die Größe der Zellen die Norm. Trotzdem finden sich nicht nur deutlich hypertrophierte, sondern auch normal große und stark verschälerte Myozyten in histologischen Präparaten kardiomyopathischer Herzen [21, 63, 76, 97]. Die Hypertrophie scheint vor allem im Bereich von Narben besonders ausgeprägt zu sein [36]. Dennoch gibt es keine spezifischen pathognomonischen, makroskopischen Befunde für das Vorliegen einer dilatativen Kardiomyopathie und eindeutige histologische Beweise fehlen.

Das insgesamt erhöhte Volumen des Herzens beinhaltet auch einen erhöhten Fibroseanteil in der Herzmuskulatur, dessen Muster und Verteilungen verschieden ausfallen können. Diese Muster konnten bereits im MRT durch späte Gadoliniumanreicherung in fibrosierten Arealen des Herzmuskels beobachtet werden [60].

Die Ansichten über die Entstehung der Myokardfibrose gehen auseinander. Sie kommt vermutlich durch zuvor zugrunde gegangene Herzmuskelzellen zustande [39]. Da eine Persistenz kardiotroper Viren und autoimmunologische Prozesse als mögliche Ursachen dilatativer Kardiomyopathien diskutiert werden, liegt auch der Schluss nahe, dass eine lokale Entzündungsreaktion möglicherweise die Fibrose induziert [28].

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese der DCM

Die Ätiologie der DCM ist zumeist unbekannt. Sie tritt meist sporadisch auf, zeigt jedoch bei 10 – 20 % eine familiäre Häufung [28, 61, 62, 83, 86]. Bislang wurden 16 Gendefekte identifiziert, die muskuläre Proteine, wie z. B. Dystrophin, Desmin, Lamin, Troponin T und Aktin betreffen. Ungefähr zwei Drittel der DCM-Fälle sind viral bedingt [28].

1.2.3.1 Inflammation

Die Bildung von Autoantikörpern [47, 65, 79], T-Zell-getriggerte Immunantworten und Apoptose [39] werden bislang als hauptsächliche pathobiologische Mechanismen diskutiert, die zu kongestivem Herzversagen führen können. Neuere Daten lassen annehmen, dass eine persistierende Entzündung im Myokard in vielen Fällen zum Fortschreiten der Krankheit führen könnte. Damit ist auch die chronische Generation von Autoantikörpern gegen myokardiale Antigene kausalpathogenetisch in Verbindung zu bringen. Einzelheiten der entzündlichen Genese sind mittlerweile beschrieben worden [13, 50, 91]. Doch obwohl sowohl Antikörper als auch manche Viren und seltener Pilze oder Bakterien das Komplementsystem aktivieren können, ist die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der dilatativen Kardiomyopathie noch nicht systematisch untersucht worden.

Bei Patienten mit DCM wurden Abnormalitäten sowohl humoraler als auch zellulärer Bestandteile des Immunsystems entdeckt [18, 46, 47, 103].

So konnten kürzlich Oberflächenmarker wie HLA I, HLA II, CD 19, CD 54 und die Lymphozyten- und Makrophagenmarker CD 2 und CD 68 im entzündeten Myokard nachgewiesen und diagnostisch gewertet werden. Unter Verwendung dieser Marker kann bei fast der Hälfte der Patienten, die an dilatativer Kardiomyopathie erkrankt sind, ein chronischer Entzündungsprozess festgestellt werden [41]. Darüber hinaus gibt es bisher allerdings nur wenige Informationen darüber, ob die Befunde von myokardialen Biopsien mit dem Outcome von DCM korrelieren.

1.2.3.2 Viren

Virale Infektionen sind in den industrialisierten Ländern die häufigste Ursache für die akute Myokarditis, welche wiederum eine wesentliche Ursache für die Entstehung einer DCM darstellen kann. Ungefähr 60 % aller DCM-Fälle sind auf eine virale Genese mit vorangegangener, nicht ausgeheilte Virusmyokarditis zurückzuführen [28]. Enteroviren, besonders das Coxsackievirus B3 und B4, Adenoviren, Epstein-Barr-Viren, Zytomegalieviren, Herpesviren und das Parvovirus B19 gehören hierbei zu den häufigsten kardiotropen Viren, wobei wahrscheinlich alle humanpathogenen Viren eine Myokarditis hervorrufen können [4, 5, 27, 48]. Die Prävalenz der kardiotropen Viren in Endomyokardbiopsien scheint dabei außerordentlich variabel zu sein, wobei vor allem die Angaben für den Nachweis von enteroviraler RNA, je nach Nachweismethode, stark schwanken [24, 32, 68]. Eine akute Virusmyokarditis kann nach entsprechenden reparativen Vorgängen folgenlos ausheilen und ist im Gegensatz zu der chronischen Form der DCM in der Regel selbstlimitierend. Bis auf die Riesenzellmyokarditis und die Form der nekrotisierenden Myokarditis besitzen die Myokarditiden deshalb auch eine gute Prognose [51].

Bei einem Teil der Patienten kann das Virusgenom jedoch im Myokard persistieren und die Virusmyokarditis in ein chronisches Stadium übergehen.

Man unterscheidet deshalb die akute Myokarditis, eine chronisch aktive Form mit und ohne persistierendem Virusgenom, eine chronische autoimmunvermittelte Myokarditis und das mögliche Endstadium, die DCM.

Der klinische Verlauf der Myokarditis ist demzufolge sehr variabel und reicht von einem meist asymptomatischen oder milden, bis hin zu einem fulminanten Verlauf mit tödlichem Ausgang [51]. Es bestehen neben Entzündungszeichen meist Zeichen der Herzinsuffizienz. Eine kausale Therapie ist bei der Virusmyokarditis noch nicht etabliert und die Behandlung entspricht weitestgehend einer allgemeinen Herzinsuffizienztherapie. Im chronischen Stadium sind die Symptome weniger charakteristisch.

Es wurden lange Zeit Vermutungen darüber angestellt, ob die chronische Entzündung des Herzens zu der Pathogenese der DCM beitragen könnte [39, 80]. Zudem scheint es, als ob eine subklinische, viral induzierte Myokarditis eine Autoimmunantwort induzieren könnte, die ihrerseits zu dilatativer Kardiomyopathie führt. Das häufige Vorkommen viraler Genome im Myokard bei Patienten mit idiopathischer DCM liefert den Verdacht, dass die virale Myokarditis als hauptsächliche Ursache für die Entstehung der DCM in Frage kommen könnte [5, 28]. Schon das alleinige Vorhandensein von Viren im Myokard ist offensichtlich mit einer schlechteren Prognose assoziiert [99]. Ein Beweis dieses Zusammenhangs steht jedoch nach wie vor aus [58, 59].

1.2.4 Diagnostik und Therapie der DCM

Die Diagnostik der dilatativen Kardiomyopathie umfasst sowohl invasive als auch nicht-invasive Methoden [14]. Neben den konventionellen nicht-invasiven Maßnahmen wie Anamnese, körperlicher Untersuchung, Laboruntersuchung, Elektrokardiogramm (EKG) und Röntgen Thorax, zählt die Echokardiographie zu einer der wichtigsten Untersuchungsmethoden.

Die Diagnosestellung der idiopathischen DCM kann aufgrund vorliegender koronarer Herzerkrankungen, Herzklappenerkrankungen oder anderer Herzerkrankungen erschwert sein. Deshalb sind hierzu außerdem die Herzkatheteruntersuchung mit Koronarangiographie und eine Endomyokardbiopsie mit histologischer und immunhistologischer Untersuchung der Myokardbiopsiepartikel zum Ausschluss einer Myokarditis empfohlen [22, 23, 24, 53, 68].

Allgemein gelten die europäischen Therapierichtlinien der Herzinsuffizienz [34, 87] auch für die idiopathische DCM. Diese beschränken sich bislang auf symptomatische und konventionelle Therapien und umfassen diätetische Maßnahmen mit Kochsalz- und Wasserretention, die Meidung kardiotoxischer Medikamente und die Reduktion koronarvaskulärer Risikofaktoren. Des Weiteren beinhalten sie Alkohol- und Nikotinkarenz, die Anstrengung eines Normalgewichts und eine Minderung der kardialen Arbeitsbelastung durch körperliche Schonung und häufige Ruhephasen.

Die medikamentöse Behandlung der DCM richtet sich nach der symptomatischen Klassifizierung gemäß der NYHA-Stadien. Sie besteht aus Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmern (ACE-Hemmer) oder Angiotensin-Rezeptorblockern (ARB) in allen Stadien der chronischen Herzinsuffizienz, Diuretika (bei Herzinsuffizienz mit Lungenstauung oder peripheren Ödemen; NYHA II), Aldosteron-Antagonisten, wie z.B. Spironolacton (NYHA III), Herzglykosiden zur Besserung der Kontraktilität (NYHA III und IV) und Betablockern (NYHA II - IV).

Durch die kombinierte klassische Gabe dieser Medikamente konnte neben Erleichterung der subjektiven Symptomatik auch eine verbesserte Prognose hinsichtlich des Überlebens erreicht werden [2, 15, 34, 87, 100]. Eine dauerhafte Antikoagulation wird auf Grund der erhöhten Thrombemboliegefahr ebenfalls empfohlen [14].

Der Wert immunsuppressiver und antiviraler Therapie ist bislang nicht bewiesen, da verschiedene Studien inhomogene Ergebnisse erbracht haben [11, 25, 35, 43]. In manchen der Studien wurden die Patienten mit Immunsuppressiva behandelt, in anderen wiederum mit Interferon. Die sehr unterschiedlichen Erfolgsraten könnten dabei zwei Hauptgründe haben:

Erstens war eine mögliche virale Infektion vor der immunsuppressiven Behandlung nicht ausgeschlossen worden und zweitens benutzten die meisten Studien nur Lichtmikroskopie um eine Entzündung zu diagnostizieren. In Studien von Felix et al. konnte außerdem ein positiver Effekt von Immunoabsorption mit anschließender Immunglobulinsubstitution auf die kardiovaskuläre Funktion von Patienten mit DCM nachgewiesen werden [20].

1.2.5 Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeit

Der Verlauf der dilatativen Kardiomyopathie ist in der Regel chronisch progredient und seine Geschwindigkeit sehr stark abhängig vom klinischen Zustand und Alter des Patienten. Eine Heilung ist, bis auf die Möglichkeit einer Herztransplantation, bisher noch nicht möglich. Die jährliche Mortalität von Patienten im NYHA I-Stadium liegt bei 5 – 10 %. Bei NYHA II - III steigt die jährliche Mortalität auf 15 – 30 % und im Stadium NYHA IV liegt die Mortalitätsrate im ersten Jahr sogar bei annähernd 50 % [54]. Davon versterben 50 % an fortschreitender Herzinsuffizienz, 25 % an plötzlichem Herztod und weitere 25 % an thrombembolischen Komplikationen [28].

Die konservativ nicht beherrschbare DCM stellt die häufigste Indikation (> 50 %) für eine Herztransplantation als *ultima ratio* dar. Die 1-, 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate nach Herztransplantation liegt heute bei 88 %, 77 % bzw. 57 % [98]. Daher sind Differentialdiagnosen und die Erforschung der Entstehungsursachen für die Prävention und Therapie der DCM von entscheidender Bedeutung.

1.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein Teil des angeborenen Immunsystems, der durch die Evolution hinweg höchst effektiv konserviert wurde.

Die Hauptaufgabe der Komponenten des Komplementsystems besteht darin, als Opsonine und Chemokine für Phagozyten zu wirken und zudem eine Reihe von Entzündungsreaktionen auszulösen, die den Kampf gegen eine Infektion unterstützen. Eine weitere Funktion ist die direkte Zerstörung von Bakterien durch das Einfügen von Poren in deren Zellmembranen durch den so genannten Membranangriffskomplex, MAK (C5b-9).

Das ganze System besteht aus einer Kaskade von über 20 Serumproteinen, die durch die Bindung von Antikörpern oder z.B. CRP [89, 96] an die Komplementkomponente C1 über den klassischen Weg aktiviert werden kann. Außerdem kann eine Aktivierung über den alternativen Weg durch die Bindung von Partikeln, wie z.B. Zellwänden oder Cholesterinbausteinen, an die Komponente C3 oder den Lektin-Weg erfolgen.

Komplementaktivierung bis zum Schlussglied der Kaskade führt zu der Bildung von proinflammatorischen Molekülen, z.B. den Anaphylatoxinen C3a, C5a und C2b mit gefäßerweiternder und chemotaktischer Wirkung, als auch des terminalen Komplement-Komplexes C5b-9 [19]. Sie bewirkt demzufolge die chemotaktische Anlockung von Leukozyten, verstärkte Phagozytose und letztendlich die Lyse der kernlosen Zielzelle.

Der genaue Effekt von C5b-9 auf kernhaltige Zellen, also auch auf Kardiomyozyten, ist jedoch bislang noch ungeklärt. Im Gegensatz zu Erythrozyten überleben diese einen Angriff von C5b-9 und antworten mit der Bildung und Sekretion von proinflammatorischen Molekülen, wie z.B. Zytokinen, Chemokinen oder Wachstumsfaktoren [66].

Darüber hinaus löst C5b-9 Effekte der Signaltransduktion, z.B. die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAP-Kinase) und des Kernfaktors (NF)- κ B in kernhaltigen Zellen aus [66]. Die meisten dieser Effekte scheinen durch den C5b-9-induzierten Calcium-Einstrom in die Zellen verursacht zu werden.

Es gibt Berichte darüber, dass eine Komplementaktivierung zu myokardialer Entzündung führen könnte [89, 103]. So wurde erst kürzlich nachgewiesen, dass der terminale Komplement-Komplex C5b-9 die TNF- α -Synthese in Kardiomyozyten *in vitro* stimuliert und dass C5b-9 und TNF- α im Herzmuskelgewebe von DCM-Patienten gemeinsam auftreten [103]. Erste klinische Studien zur TNF- α -Inhibition mit Infliximab lassen jedoch vermuten, dass eine generelle Inhibition der Entzündungsprozesse therapeutisch nicht unbedingt günstig sein muss [6, 26].

1.4 C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein (CRP) besitzt eine pentagonförmige Struktur ohne Kohlenhydratanteil und wird in der Leber gebildet, wo seine Produktion am stärksten durch Interleukin 6 (IL-6) stimuliert wird. Seine Namensgebung beruht darauf, dass es zusammen mit Calciumionen mit dem C-Polysaccharid, einer Teichonsäurehaltigen C-Substanz von *Streptococcus pneumoniae*, reagiert und eine Präzipitation hervorruft [95]. Seine Hauptwirkung entfaltet das Molekül als Teil des Immunsystems. CRP gehört zu den Akute-Phase-Proteinen und seine Plasmakonzentration kann als Antwort auf Inflammation, Trauma oder Infektion von weniger als 1 µg/ml bis auf ca. 600 µg/ml ansteigen [64, 78, 93]. Pathomechanistisch bindet es an Liganden, die in geschädigtem Gewebe exprimiert werden, aktiviert das Komplementsystem und vergrößert auf diesem Weg myokardiale und zerebrale Infarkte, indem es den Entzündungsprozess verstärkt [29].

Schon seit einigen Jahren wird das C-reaktive Protein auch mit der Pathogenese der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht und auf seine mögliche Eigenschaft als starker und unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen hin genauer erforscht [45]. Im Gegensatz zu den erhöhten CRP-Spiegeln, die wie zuvor beschrieben im Rahmen von Entzündungen auftreten, geht es hierbei jedoch um Abstufungen im Normbereich (CRP < 5 µg/ml). In den letzten Jahren wurden dazu verschiedene Studien durchgeführt, in denen der Zusammenhang zwischen einem erhöhten basalen Serumspiegel an CRP im so genannten high-sensitive-Bereich (1 – 5 µg/ml) und der Atherosklerose untersucht wurde. Initial höhere Werte (4 – 5 µg/ml) können hierbei grundsätzlich ein erhöhtes Risiko für ein akutes kardiovaskuläres Ereignis bedeuten [40, 72, 74].

Je höher der durchschnittliche, basale Plasmaspiegel beim gesunden Patienten, desto höher ist z.B. das Risiko, einen Herzinfarkt zu erleiden. In die aktuellsten Richtlinien zur Risikostratifizierung kardiovaskulärer Krankheiten wurden Messungen des hsCRP-Spiegels aufgenommen und Risikobereiche definiert [69]. So korrespondieren Werte unter 1 mg/l mit einem niedrigen, Werte zwischen 1 mg/l und 3 mg/l mit einem mittleren und Werte über 3 mg/l mit einem hohen Risiko des Patienten an Atherosklerose oder anderen kardiovaskulären Krankheiten zu erkranken [69, 81].

Auch nach einem abgelaufenen akuten Myokardinfarkt zeigten Patienten mit einem bereits initial deutlich erhöhten CRP-Spiegel unabhängig von anderen Risikofaktoren einen schlechteren klinischen Verlauf als die Vergleichsgruppe [45]. Ridker et al. wiesen ein dreifach höheres Risiko für die Entwicklung eines akuten Myokardinfarkts für Männer mit hohen CRP-Werten im Vergleich zu Probanden mit niedrigen Werten nach, wobei diese Beobachtung unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren war [72]. Auch zeigt die Höhe des CRP-Wertes nach Infarkt eine signifikante Relation zum Ausmaß des ischämischen Areals [45] und kann somit auch weitere Komplikationen, sowie das Mortalitätsrisiko nach einem akuten Myokardinfarkt abschätzen.

Lagrand et al. haben dabei nicht direkt das CRP für eine schlechtere Prognose bei der Entwicklung einer KHK und deren Folgen verantwortlich gemacht, sondern das durch CRP aktivierte Komplementsystem [44]. Dieses induziert lokal die Einwanderung und Aktivität von neutrophilen Granulozyten, führt zur vermehrten Expression des *tissue factor* und damit zur verstärkten Thrombenbildung und kann zudem direkt die Zellwand von Endothelzellen und Kardiomyozyten schädigen. Ein initial hoher CRP-Spiegel soll dabei als "Substrat" für eine überdurchschnittliche Aktivierung des Komplementsystems dienen und so deren Folgen verursachen [31, 45].

Durch diese These ließe sich das Phänomen erklären, warum initial erhöhte CRP-Werte sowohl bei Gesunden als auch bei bekannten KHK-Patienten einen schlechteren Krankheitsverlauf vorhersagen können.

In den letzten Jahren wurde deshalb die Messung von hsCRP herangezogen, um instabile Phasen im Rahmen der Atherosklerose zu erkennen. Dem CRP wurde eine tragende Rolle bei der Atherosklerose [87, 90, 102], metabolischen Syndromen, koronaren Herzkrankheiten und ischämischem Herzversagen zugeschrieben [10, 38]. Es scheint bewiesen, dass erhöhte CRP-Spiegel eine prognostische Rolle sowohl für größere kardiovaskuläre Ereignisse, als auch für die Mortalität spielen und dass sie prognostische Informationen zur Risikostratifizierung bieten können [12, 73]. Studien zur Sekundärprävention von atherosklerotischen Erkrankungen (REVERSAL und PROVE-IT) lieferten eine positive Korrelation zwischen der Abnahme der CRP-Spiegel unter Statin-Behandlung und einer verminderten Bildung von Atheromen, sowie mit einer verbesserten Auswurffraktion [67, 75].

Basierend auf seinem zentralen Status bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde CRP zu einem versprechenden Ziel für therapeutische Ansätze [49, 70]. Mögliche Forschungsschwerpunkte könnten die Entwicklung von CRP-Rezeptorblockern, Antisense-Strategien oder Techniken zur Synthese-Blockade des Proteins sein. Es existieren bislang allerdings nur sehr wenige Untersuchungen über den Einfluss von CRP im Rahmen von nicht ischämischen Herzkrankheiten [82].

Diese Studie untersucht erstmals das Vorhandensein von myokardialem CRP bei nicht ischämischer, dilatativer Kardiomyopathie (DCM), seine Korrelation mit dem Plasmaspiegel von hsCRP und seine Kolokalisation mit dem terminalen Komplement-Komplex (C5b-9) im Myokard.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Produkt: _____ *Hersteller:* _____

Chemikalien

· Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
· Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
· KCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
· Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	J.T. Baker, Deventer, NL
· Hydrogen Peroxid (30 %)	J.T. Baker, Deventer, NL
· Kaisers Glyceringelatine Microscopy KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
· NaCl	AppliChem, Darmstadt, D
· Hämalan	ChromaDivision, Münster, D

Material / Geräte

· Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel, Braunschweig, D
· Objektträger	Menzel, Braunschweig, D
· pH-Meter	WTW, Weilheim, D
· Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, D
· Laborwaage	Scaltec, Göttingen, D
· Jung Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems, Nussloch, D

Produkt: _____ *Hersteller:* _____

Pipetten

· Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
· Pipetus-Akku®	Hirschmann, Eberstadt, D
· Falcon® 10 ml-Pipette	Becton Dickinson, Heidelberg, D
· Pipetten	Gilson, Middleton, USA
· Pipettenspitzen	Gilson, Middleton, USA

Antikörper

· Maus-anti-CRP [2 µl + 398 µl H ₂ O dest. = 1:200]	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
· Kaninchen-anti-C5b-9 [1 µl + 499 µl H ₂ O dest. = 1:500]	Calbiochem, Darmstadt, D
· Pferd-anti-Maus [10 µl + 990 µl H ₂ O dest. = 1:100]	Vector, Burlingame, USA
· Ziege-anti-Kaninchen [10 µl + 990 µl H ₂ O dest. = 1:100]	Vector, Burlingame, USA

Seren

· Pferde-Serum [100 µl + 900 µl H ₂ O dest. = 1:10]	Dianova, Hamburg, D
· Ziegen-Serum [30 µl + 870 µl H ₂ O dest. = 1:30]	Dianova, Hamburg, D

Kits

· Vectastain® ABC-Kit [10 µl A + 10 µl B + 1980 µl H ₂ O dest.]	Vector, Burlingame, USA
· Peroxidase Substrate AEC-Kit [5 Tropfen + 5 ml H ₂ O dest.]	Vector, Burlingame, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten

151 Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie gemäß der Definition der World Health Organisation [72], die im Zeitraum von 2000 bis 2006 am Universitätsklinikum Ulm behandelt worden waren, wurden retrospektiv für die Studie ausgewertet. Das Patientenkollektiv bestand aus 41 Frauen und 110 Männern mit einem mittleren Alter von 53 (19 - 73) Jahren, bei welchen sich Symptome von rechts- oder linksseitigem Herzversagen zeigten. Die für die Arbeit relevante Diagnose der dilatativen Kardiomyopathie wurde mittels klinischer Untersuchungen, Echokardiographie und einem koronaren Angiogramm gestellt. Die Diagnostik umfasste außerdem die Erhebung der NYHA-Klasse, EKG-Untersuchungen und eine Herzkatheteruntersuchung. Das enddiastolische Volumen und die Ejektionsfraktion wurden durch linksseitige Ventrikulographie ermittelt. Patienten, die an koronarer Herzkrankheit, Vitien oder an einer angeborenen Herzkrankheit litten wurden von der Studie ausgeschlossen. Ebenfalls nicht zu der Studie zugelassen wurden Patienten, die an akuter Myokarditis erkrankt waren. Zu deren Diagnose wurden die Dallas-Kriterien verwendet [1]. Diesen zufolge wird eine aktive Myokarditis bei Nachweis lymphozytärer Infiltrate in Verbindung mit Myokardzellnekrosen diagnostiziert. Vorhofflimmern hingegen stellte kein Ausschlusskriterium für die Studie dar.

Ab April 2004 wurden von den Patienten neben den Myokardbiopsien zusätzlich Blutproben (EDTA-Plasma) zur Bestimmung der NT-proBNP- und hsCRP-Spiegel im Serum entnommen. Diese Ergebnisse waren deshalb nur von den letzten 39 Patienten der Studie verfügbar, welche nach April 2004 in der Klinik behandelt und biopsiert wurden.

Ein positives Votum der lokalen Ethikkommission lag vor und alle Patienten, hatten nach Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zu den geplanten Untersuchungen gegeben.

2.2.2 Erhebung und Analyse der demographischen Daten und der klinischen Parameter

Die demographischen Daten der Patienten, wie z.B. Geburtsdatum, Gewicht und Körpergröße, wurden mittels Anamnese erhoben und zur Berechnung weiterer Parameter, wie z.B. des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie, deren Body Mass Index oder der jeweiligen Zeitintervalle vom Zeitpunkt der Erstmanifestation/Erstdiagnose bis zur Biopsie herangezogen. Durch gezielte Befragung zur körperlichen Belastbarkeit erfolgte die Einteilung in eine NYHA-Klasse [7]. Alle Patienten wurden echokardiographiert. Die bisherige Medikation wurde durch Anamnese oder mit Hilfe von aktuellen Arztbriefen ermittelt.

2.2.3 Body Mass Index

Zur Objektivierung des Körpergewichts wurde in dieser Studie der Body Mass Index (BMI) verwendet. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{BMI} = \text{Gewicht (kg)} / \text{Körpergröße}^2 (\text{m}^2)$$

2.2.4 NYHA-Klassifikation

Die funktionelle Einteilung der NYHA-Klassifikation entsprach den Richtlinien des Komitees der New York Heart Association [7]. Die NYHA-Klassifikation ist ein Schema zur generellen Einteilung von Herzkrankheiten. Sie wird jedoch am häufigsten zur Einteilung der Herzinsuffizienz in verschiedene Stadien entsprechend der körperlichen Leistungsfähigkeit des Patienten verwendet.

Dabei bezieht sie sich jedoch lediglich auf die Quantifikation eventueller Einschränkungen und liefert keinerlei Hinweise auf die eigentliche Ursache der kardialen Störung.

Verschiedene Versionen und Übersetzungen der NYHA-Klassifikation unterscheiden sich im Wortlaut geringfügig. Im deutschsprachigen Raum ist derzeit die u.a. 2005 in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie verwendete, auch in dieser Studie angewandte Version am gebräuchlichsten:

NYHA-Klassifikation:

- I. Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
- II. Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
- III. Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
- IV. Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit [34].

Die zur Beurteilung der Stadien herangezogenen Symptome beinhalten Dyspnoe, Nykturie, Zyanose, allgemeine Schwäche und Müdigkeit, Angina Pectoris oder kalte Extremitäten.

2.2.5 EKG

Ein bei allen Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie durchgeführtes 12-Kanal-EKG wurde auf Herzrhythmus, Lagetyp, Herzfrequenz, eventuelle Schenkelblockbilder oder Erregungsrückbildungsstörungen und den Sokolow-Index 1 hin ausgewertet. Schrittmacherinduzierte Rhythmen stellten hierbei kein Ausschlusskriterium dar, um an der Studie teilzunehmen. Außerdem wurde bei den meisten Patienten ein Belastungs-EKG durchgeführt, um deren physische Leistungsfähigkeit zu quantifizieren. Bei Patienten der NYHA-Klasse IV wurde aufgrund des hohen Komplikationsrisikos bei Belastung darauf verzichtet.

2.2.6 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde entsprechend den internationalen Standards durchgeführt [33]. Mit ihrer Hilfe wurden die Diameter der Ventrikel und Atrien gemessen. Ebenso ermöglichte sie es, die teilweise reduzierte Auswurfleistung des Herzens in Form des *Fractional Shortening* (FS) (in %) für den linken Ventrikel zu bestimmen. Diese sogenannte Verkürzungsfraktion wurde parasternal von der langen Achse aus beurteilt. Ebenso wurden der linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Durchmesser (EDD; ESD, mm) bestimmt. Die linksventrikuläre Funktion (LVF) der Patienten wurde qualitativ im apikalen 4-Kammer-Blick beurteilt und als normal (0), bzw. leichtgradig (1), mittelgradig (2) oder hochgradig (3) eingeschränkt beschrieben.

2.2.7 Entnahme der Myokardbiopsien

Die Biopsien wurden mittels perkutanem, transvenösem, femoralem Zugang über ein 1,8 mm Pilling Weck Bioptom entnommen. Dabei wurden sieben endomyokardiale Biopsien von jedem Patienten entnommen, um den *sampling error* zu reduzieren. Diese stammten hierbei stets aus dem rechten Ventrikelseptum, da die Komplikationsrate für die Patienten möglichst gering gehalten werden sollte. Vier der Myokardbiopsien wurden direkt nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff gegeben, um für die Virus-Analyse im Labor verwendet werden zu können. Drei weitere Proben wurden in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung aufbewahrt. Eine dieser Proben wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm einer histologischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurde sie unter Berücksichtigung der Dallas-Kriterien zusätzlich auf das Vorkommen von Amyloidose, Sarkoidose oder auf Speichererkrankungen hin geprüft. Diese stellten Ausschlusskriterien für unsere Studie dar. Die Diagnose der DCM wurde dort durch die histologische Untersuchung der Biopsie auf das Vorhandensein von interstitieller Fibrose, zellulären Infiltraten, zellulärer Hypertrophie und myokardialer Zelldegeneration bestätigt.

Die anderen beiden Biopsate wurden mit Hilfe von Einbettlösung (*tissue freezing medium*) über Isopentan und Stickstoff auf Kork fixiert und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert, um daraus später die histologischen Schnitte zu gewinnen.

2.2.8 Herstellung der Gefrierschnitte

Von jedem Patienten wurden zwei verschiedene Biopsate für die Herstellung der Gefrierschnitte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt (siehe 2.2.7). Dazu wurden die Proben mitsamt ihrem Träger aus Kork mittels Fixierlösung (*tissue freezing medium*) im Gefriermikrotom bei einer Temperatur von -22 °C auf einem vorgekühlten Objekthalter fixiert.

Pro Biopsie wurden zehn aufeinander folgende Schnitte mit einer Dicke von jeweils 6 μm angefertigt. Jeder Schnitt wurde anschließend auf einem Objektträger aus Glas fixiert und erneut bei $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.9 Immunhistochemische Färbung von CRP und C5b-9

Von jedem Patienten wurden insgesamt vier sequentielle Schnitte jeder Biopsie auf das Vorkommen von CRP und C5b-9 hin analysiert. Um den *sampling error* zu reduzieren, wurden die jeweiligen Schnitte derselben Färbung immer so gewählt, dass sie aus verschiedenen Bereichen der Biopsie stammten.

Die Schnitte wurden vor der Färbung für 10 min in kaltgestelltem Aceton gelagert, anschließend luftgetrocknet und nach Codierung unter dem Abzug für weitere 10 min in 200 ml Methanol und 5 ml H_2O_2 gegeben. Letzteres hemmt die endogene Peroxidase, die zu unerwünschten Hintergrundfärbungen führen kann. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit frischem PBS. Vor jeder neuen Färbung wurde der Objektträger um das Biopsat herum vorsichtig trocken gewischt.

Die auf CRP hin zu untersuchenden Gewebeproben wurden zunächst 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Hilfe von Pferdeserum geblockt. Anschließend wurde ein erster Antikörper gegen CRP (*monoklonales Maus-anti-Mensch-CRP [Klon CRP8] von SIGMA, Steinheim, D*) auf die Biopsien aufgetragen. Dieser bindet mit den beiden F_{ab} -Armen an das CRP, sofern es in der Biopsie vorhanden ist. Nach 40 min Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Biopsien in $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmem PBS einzeln gespült und erneut um das Biopsat herum trocken gewischt.

Ein zweiter, biotinylierter Pferd-anti-Maus-Antikörper (*VECTOR, Burlingame, USA*), der über seine beiden F_{ab} -Arme an den F_{c} -Arm des Erstantikörpers bindet, wurde anschließend aufgetragen. Nach weiteren 30 min Inkubation wurde jede einzelne Biopsie erneut in PBS gespült.

Die Gewebeproben, die auf C5b-9 angefärbt wurden, wurden mittels Ziegen-Serum geblockt. Zum Nachweis von C5b-9, wurde ein Kaninchen-anti-C5b-9-Antikörper (*CALBIOCHEM, Darmstadt, D*) als Erstantikörper verwendet. Ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (*VECTOR, Burlingame, USA*) diente als Zweitantikörper.

Der weitere Färbevorgang verlief für CRP und C5b-9 gleich. Im Anschluss an die Antikörperfärbungen, wurde Avidin-konjugierte Peroxidase (ABC-Kit) auf alle Schnitte gegeben. Dabei ermöglichen die freien Stellen des Avidinmoleküls die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Danach wurden die Schnitte erneut 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Für die Nachweisreaktion wurde ein AEC-Komplex als Chromogen verwendet. CRP und C5b-9 werden so unter dem Lichtmikroskop in Form einer Rotbraunfärbung sichtbar.

Die Objektträger wurden zum vervollständigen des Färbevorgangs 20 Sekunden in Hämalaun getaucht und anschließend zur Vermeidung von Überfärbung erneut 10 min in H₂O gewaschen.

Hämalaun dient der histomorphologischen Differenzierung und ist eine der am weitesten verbreiteten Routine-färbemethoden für morphologische Untersuchungen, da mit ihm verschiedene Gewebestrukturen eines feingeweblichen Schnittes unterschiedlich angefärbt werden können. Es färbt alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen blau. Das sind insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das rauhe Endoplasmatische Retikulum (rER). In dieser Studie fand die Hämalaun-Färbung als Gegenfärbung im Anschluss an die immunhistochemischen Färbungen statt, um die Zellkerne kontrastreicher darzustellen. So konnte die Verteilung von CRP und C5b-9 im fertigen Präparat verschiedenen Gewebestrukturen wie z.B. Zellen, Gefäßen oder dem Interstitium zugeordnet werden.

Zum Abschluss wurde erhitzte Glyceringelatine auf die fertig gefärbten Biopsien gegeben, um diese mit Hilfe eines Deckblattes auf ihrem Objektträger zu fixieren.

Carotispräparate von Patienten mit fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen wurden im Rahmen einer TEA von der Chirurgischen Abteilung unseres Hauses gewonnen und bereitgestellt. Sie wurden als Positivkontrolle für den Nachweis von CRP und C5b-9 verwendet.

2.2.10 Auswertung der Schnitte

Zur quantitativen Erfassung der CRP- und C5b-9-Verteilung im Myokard wurde ein semiquantitatives Zähl-System jeweils getrennt für die myokardiale CRP- und C5b-9-Analyse angewendet. Dieses umfasst die Farb-Intensität der Biopsien von nicht wahrnehmbar (0) bis hin zu starker Anfärbung (3). Das Endergebnis wurde blind ohne Kenntnis der zugehörigen Patientendaten mit Hilfe des Lichtmikroskops ausgewertet. Die abschließende Beurteilung erfolgte durch die Übereinstimmung zweier unabhängiger Untersucher.

2.2.11 Spezifische Diagnostik von viraler und entzündlicher DCM

Für die virologische Analyse der enteroviralen RNA und der adenoviralen DNA wurde eine PCR, bzw. RT-PCR durchgeführt. Das Ergebnis wurde durch Southern blot-Analyse bestätigt.

Die gesamte RNA/DNA wurde unter Verwendung von *Rneasy-Protect-Mini-Kit/QIAamp-DNA-Mini-Kit (Qiagen)* extrahiert. Für RNA-Viren wurde zunächst eine RT-PCR durchgeführt, um die cDNA zu erhalten. Die PCR-Produkte wurden dann unter Anwendung des *HotStar-Master-Mix-Kit (Qiagen)* amplifiziert. Nach der PCR wurde eine nested PCR (nPCR) durchgeführt. Die nPCR ist eine Methode, welche die Spezifität der PCR weiter erhöht.

Hierbei wird in einem ersten Schritt die PCR mit einem Template über wenige Zyklen durchgeführt. Anschließend werden in einer zweiten Runde neue Primer eingesetzt. Diese neuen Primer liegen zentraler als die ersten, so dass in diesem zweiten Schritt nur noch die spezifischen DNA Abschnitte des ersten Schrittes amplifiziert werden. Dabei kann auch nur ein einzelner zentraler liegender Primer eingesetzt werden.

GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein Schlüsselenzym der Glykolyse, das als so genanntes *house keeping gene* in allen Zellen des Körpers vorkommt, wurde als Ladekontrolle verwendet. Es gilt neben α -Tubulin hierfür als etablierter Standard. Adenovirus-DNA (Typ 2) von *GIBCOBRL* (KAT. Nr. 15270-010) und ein in T-easy geklontes enterovirales Template (Schultheiss, Berlin) wurden als Positivkontrollen verwendet.

Die virologischen Analysen von 2000 bis 2004 beinhalten Entero- und Adenoviren. Ab 2005 wurden die Biopsien zusätzlich auf humanes Herpesvirus Typ 6 und Parvovirus B19 hin untersucht, da diese in der neuesten Literatur als äußerst relevant für die Entstehung der viralen Myokarditis beschrieben wurden [4, 42, 48, 92].

Tabelle 1:

Zur spezifischen Diagnostik und virologischen Analyse der DNA und RNA in den Myokardbiopsien verwendete Primer der Firma Roth.

Primertabelle (Firma Roth):

GAPDH sense:	5' > TAC ATG GTC GGG GTG TTG AA < 3'
GAPDH antisense:	5' > AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT < 3'
ADV sense:	5' > ACT ACA A (CT) A TTG GCT ACC AGG < 3'
ADV antisense:	5' > CAA AAC ATA AAG AAG (GT) GT GGG C < 3'
ADV nested sense:	5' > AAC TTC CAG CCC ATG AGC (AC) G < 3'
ADV nested antisense:	5' > CTC AAA AGT CAT GTC (GCT) AG CGC < 3'
COX sense:	5' > CGG TAC CTT TGT GCG CCT GT < 3'
COX antisense:	5' > CAG GCC GCC AAC GCA GCC < 3'
COX nested sense:	5' > CCC CGG ACT GAG TAT CAA TA < 3'
COX nested antisense:	5' > GGC CGC CAA CGC AGC CAC CG < 3'
PVB sense:	5' > AGC ATG TGG AGT GAG GGG GC < 3'
PVB antisense:	5' > AAA GCA TCA GGA GCT ATA CTT CC < 3'
PVB nested sense:	5' > GCC AAC TCT GTA ACT TGT AC < 3'
PVB nested antisense:	5' > AAA TAT CTC CAT GGG GTT GAG < 3'
HHV sense:	5' > CAT CGC ATA CGT CTC CCA G < 3'
HHV antisense:	5' > TCT CTA ACG TGT CCG TGC C < 3'
HHV nested sense:	5' > CCC ATT GGA ACT GTG GTC T < 3'
HHV nested antisense:	5' > TAG AGA TAT GCA CTC ACC G < 3'

Abkürzungen: ADV = Adenovirus; COX = Coxsackievirus (Enterovirus);
 GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase;
 HHV = Humanes Herpesvirus; PVB = Parvovirus B19

2.2.12 Die Bestimmung von NT-proBNP und hsCRP

NT-proBNP wurde unter Verwendung des *NT-proBNP electrochemiluminescence immunoassay (Modular Analytics E170, Roche Diagnostics, Mannheim, D)* gemessen. Da EDTA-Plasma benutzt wurde, wurden NT-proBNP-Spiegel erwartet, deren Werte den Herstellerangaben zufolge 10 % unter den *in vivo* Spiegeln im Blut liegen.

hsCRP wurde mit Hilfe des *CardioPhase hsCRP assay (No OQIY21, Dade Behring, Marburg, D)* und des *Behring Nephelometers II* gemessen. Werte, die unter 1 mg/l liegen, korrelieren mit einem niedrigen, Werte zwischen 1 mg/l und 3 mg/l mit einem hohen Risiko des Patienten an Atherosklerose und verwandten kardiovaskulären Störungen zu erkranken [69]. Werte über 10 mg/l wurden für die Auswertung nicht in Betracht gezogen, da diese Hinweis auf eine systemische Infektion geben und im Rahmen unserer Studie deshalb keine Rolle spielten.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung wurde mit Hilfe der *SigmaStat Version 2.0* Software durchgeführt. Dabei wurden die *Spearman Rank Order Correlation* und die *Pearson Product Moment Correlation* berechnet.

Der Korrelationskoeffizient, oder die Produkt-Moment-Korrelation (von Bravais und Pearson, daher auch Pearson-Korrelation genannt), ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen. Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale nicht linear voneinander ab.

Der p-Wert (statistische Signifikanz) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein gemessener Unterschied dem Zufall entspringt. $p < 0,05$ bedeutet demzufolge, dass die Wahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ist, dass der gemessene Unterschied zwischen zwei Vergleichswerten nur auf Zufall beruht. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wird ein Messergebnis als statistisch signifikant angenommen.

Die statistische Signifikanz ist von der Größe der untersuchten Population abhängig. Wenn die Population groß genug ist, erlangen schon kleine Unterschiede zwischen zwei Gruppen statistische Signifikanz.

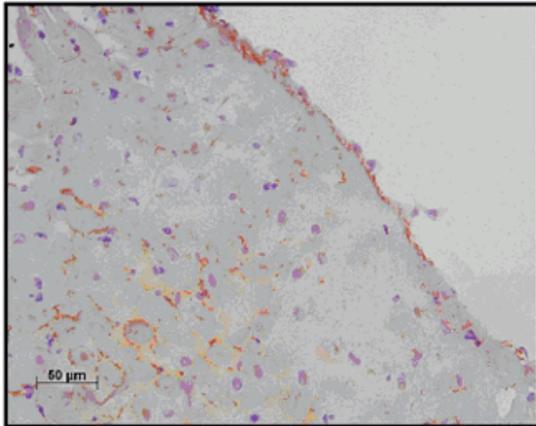
Der p-Wert ist ein rein statistischer Ausdruck und sagt nichts über die klinische Relevanz des Ergebnisses aus. Er liefert keine Information darüber, wie stark der untersuchte Effekt ist, sondern zeigt lediglich an, ob überhaupt ein Effekt besteht.

3 Ergebnisse

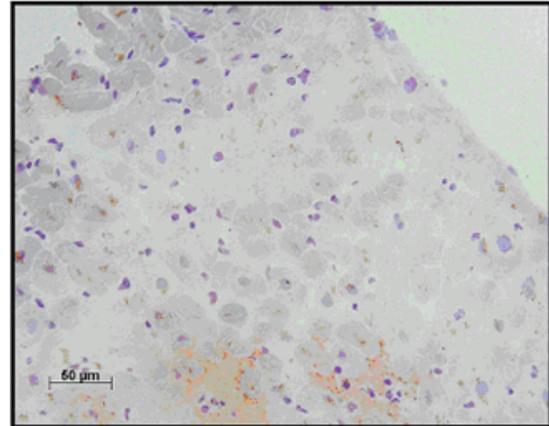
3.1 Färbungen

In 47 Myokardbiopsien unseres Kollektivs, also bei 31 %, konnte CRP durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Bei 141 Patienten, also 93 %, wurde C5b-9 immunhistochemisch nachgewiesen. Durch die Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun lies sich die immunhistochemische Färbung auch morphologischen Strukturen im Präparat zuordnen. CRP war im Myokard sowohl in der Nähe von Myozyten und Gefäßen, als auch im Bindegewebe zu finden. Es konnte bei 45 Patienten (30 %) eine starke und signifikante Kolokalisation zwischen CRP und C5b-9 beobachtet werden ($p < 0,001$). CRP fand sich isoliert bei nur 2 Patienten (1 %). C5b-9 lies sich ohne das gleichzeitige Vorhandensein von CRP dagegen bei 96 Patienten nachweisen (64 %).

Die Verteilungsmuster beider Moleküle im Myokard fielen verschieden aus: *Abb. 2a und 2b* zeigen ein fleckförmiges Verteilungsmuster (Rotbraun-Färbung) von CRP und C5b-9, wobei beide Moleküle hier vorwiegend im Bindegewebe lokalisiert sind. In *Abb. 2a* lässt sich zusätzlich eine starke Anfärbung des Endokards auf C5b-9 beobachten. *Abb. 3a und 3b* hingegen stellen die Kolokalisation der beiden Moleküle in einem flächigen Verteilungsmuster in den linken Schnitthälften dar. Die beiden Biopsien mit den unterschiedlichen Verteilungsmustern stammen hierbei von unterschiedlichen Patienten. Die Anfärbung auf CRP und C5b-9 fand dabei jeweils an sequentiellen Schnitten statt.



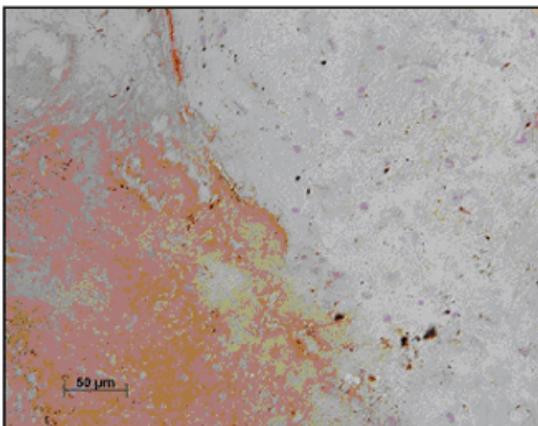
C5b-9

Abb. 2a: C5b-9 im Myokard

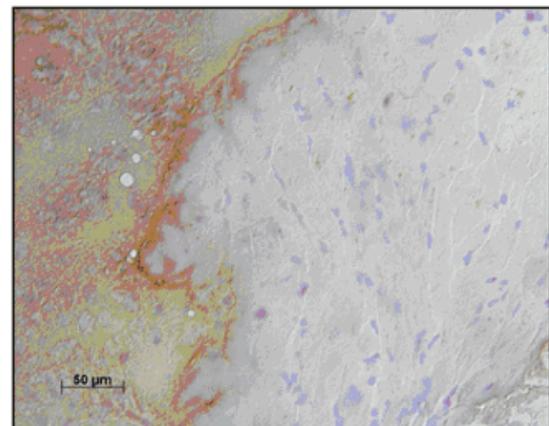
CRP

Abb. 2b: CRP im Myokard

Die Auswertung der endomyokardialen Biopsien eines Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, der im Zeitraum von 2000-2006 am Universitätsklinikum biopsiert wurde, zeigt eine Kolokalisation von C5b-9 (Abb. 2a) und C-reaktivem Protein (CRP) (Abb. 2b) bei der immunhistochemischen Anfärbung in einem fleckigen, unregelmäßigen Muster. Es werden aufeinander folgende Schnitte dargestellt. Vergrößerung: 40x.



C5b-9

Abb. 3a: C5b-9 im Myokard

CRP

Abb. 3b: CRP im Myokard

Die Auswertung der endomyokardialen Biopsien eines anderen Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, der im Zeitraum von 2000-2006 am Universitätsklinikum biopsiert wurde, zeigt eine Kolokalisation von C5b-9 (Abb. 3a) und C-reaktivem Protein (CRP) (Abb. 3b) in einem flächigen Verteilungsmuster. Es werden aufeinander folgende Schnitte dargestellt. Vergrößerung: 40x.

3.2 Tabellen

Die demographischen Daten aller an der Studie beteiligten Patienten ($n = 151$) sind in *Tabelle 2* in einer Übersicht zusammengefasst (linke Spalte). Hierbei wurden das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie, die Geschlechtsverteilung, sowie der Body Mass Index (BMI), der Zeitraum von den ersten Symptomen, bzw. der Erstdiagnose bis zur Biopsie, die damalige Ejektionsfraktion und die Ergebnisse der Färbung auf CRP und C5b-9 aufgeführt.

Aufgrund der erst ab April 2004 entnommenen Blutproben wurden zwei verschiedene Auswertungsreihen durchgeführt: Die erste Gruppe umfasst alle an der Studie beteiligten Patienten ($n = 151$), wohingegen die zweite Gruppe eine Untergruppe der ersten Gruppe darstellt und nur die Patienten beinhaltet, von denen zum Zeitpunkt der Biopsie bereits zusätzliche Blutproben entnommen wurden ($n = 39$). Die Ergebnisse der hsCRP- und NT-proBNP-Plasmaspiegel des kleineren Patientenkollektivs ($n = 39$) sowie alle anderen Ergebnisse, die für dieses Kollektiv gesondert berechnet wurden, sind ebenfalls in *Tabelle 2* aufgelistet (rechte Spalte). Außerdem finden sich dort auch die Ergebnisse der Untersuchung auf das Vorhandensein von viralem Genom und/oder Entzündungszeichen im Myokard.

Tabelle 2:

Demographische Daten der kardiologischen Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, welche im Zeitraum von 2000 bis 2006 am Universitätsklinikum Ulm behandelt wurden. Die Ejektionsfraktion (EF) wurde durch Linksventrikulographie während der Herzkatheterisierung zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme ermittelt.

Quantitative Parameter: Median (Intervall); Qualitative Merkmale: Absolute Zahlen.

	Alle Patienten (n = 151)	Patienten mit Blutprobe (n = 39)
Alter (in Jahren)	53 (19; 73)	46 (19; 71)
Geschlecht (maskulin : feminin)	110 : 41	29 : 10
BMI (kg/m ²)	26,3 (15,6; 43,4)	26,8 (16,7; 43,4)
Zeitraum von der klinischen Erstmanifestation bis zur Biopsie (in Monaten)	2 (0; 252)	1 (0; 52)
Zeitraum von der Erstdiagnose bis zur Biopsie (in Monaten)	1 (0; 120)	2 (0; 52)
Ejektionsfraktion zum Zeitpunkt der Biopsie (%)	32 (7; 58)	36 (9; 55)
Patienten mit Nachweis von myokardialem CRP	47 (31 %)	9 (23 %)
Patienten mit Nachweis von myokardialem C5b-9	141 (93 %)	37 (95 %)
Plasmaspiegel: hsCRP (mg/l)	-	1,3 (0,2; 10)
Plasmaspiegel: NT-proBNP (pg/ml)	-	605,7 (9,6; 4258)
Patienten mit Nachweis von viralem Genom	28 (19 %)	20 (51 %)
Patienten mit Nachweis von myokardialer Entzündung	62 (41 %)	7 (18 %)

Abkürzungen: ACE = Angiotensin converting enzyme; BMI = Body Mass Index;
BNP = Brain natriuretic peptide;
(hs)CRP = (hoch sensitives) C-reaktives Protein; n = number (Anzahl)

Eine Zusammenfassung der klinischen Daten beider Patientenkollektive (obere, bzw. untere Zeile) ist in *Tabelle 3* dargestellt. Diese umfassen den Grad der Herzinsuffizienz (NYHA-Klassifikation), die Ergebnisse des EKG mit Angaben über Herzrhythmus, Herzfrequenz, Lagetyp, eventuelle Schenkelblöcke und/oder Erregungsrückbildungsstörungen und die Untersuchungsbefunde der Echokardiographie, entsprechend der qualitativen (Grad 0 - 3) und quantitativen (FS in %) linksventrikulären Funktion der Studienpopulation.

Bei der Beurteilung des Herzrhythmus war entscheidend, ob ein Sinusrhythmus vorlag. Den Lagetyp des Herzens betreffend wurde zwischen einem Indifferenztyp oder Linkstyp (QR-Achse: -30° bis $+60^{\circ}$) und allen anderen Lagetypen unterschieden.

Tabelle 3:

Klinische Daten der kardiologischen Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, welche im Zeitraum von 2000 bis 2006 am Universitätsklinikum Ulm behandelt wurden zum Zeitpunkt der Myokardbiopsie. Die linksventrikuläre Funktion wurde qualitativ gemessen und als normal (0), leichtgradig (1), mittelgradig (2) oder hochgradig (3) erhöht klassifiziert. Jeder Klasse wurde ein Rang zugeordnet (0 - 3).

Quantitative Parameter: Median (Intervall); Qualitative Merkmale: Absolute Zahlen.

	NYHA	EKG					Echokardiographie	
		Sinus-rhythmus	Herzfrequenz (/min)	Lagetyp (-30° - +60°)	Schenkel-block	Erregungsrückbildungsstörungen	LVF (qual.)	LVF (quant.) /FS (%)
Alle Patienten (n = 151)	I: 20 II: 27 III: 57 IV: 47	125	74 (45; 170)	95	69	101	0: 5 1: 12 2: 54 3: 80	17 (2; 44)
Patienten mit Blutpobe (n = 39)	I: 5 II: 14 III: 18 IV: 2	37	67 (45; 105)	23	18	22	0: 1 1: 2 2: 19 3: 17	18 (7; 33)

Abkürzungen: EKG = Echokardiographie;
 FS = Fractional shortening (Verkürzungsfraktion);
 LVF = Linksventrikuläre Funktion; n = number (Anzahl);
 NYHA = New York Heart Association;
 quant. = quantitativ; qual. = qualitativ

Tabelle 4 beinhaltet ausschließlich Daten der kleineren Patientenpopulation mit Blutprobe (n = 39) und zeigt die Korrelation zwischen den gemessenen hsCRP-Plasmaspiegeln (in mg/l) und der jeweils quantitativ in vier Stufen (0 - 3) bestimmten Farbintensität von CRP und C5b-9 im Myokard.

Tabelle 4:

Korrelation der hsCRP Plasmaspiegel im Blut der kardiologischen Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, welche im Zeitraum von April 2004 bis 2006 am Universitätsklinikum Ulm behandelt wurden, mit den Färbeergebnissen ihrer endomyokardialen Biopsiebefunde. hsCRP-Plasmaspiegel über 10 mg/l wurden nicht bewertet. Ein semi-quantitatives Bewertungssystem, das die Färbung von nicht wahrnehmbar (0) bis stark immunoreaktiv (3) beschreibt, wurde für die myokardiale Auswertung angewandt.

hsCRP- Plasmaspiegel (mg/l)	Farbintensität in den Endomyokardbiopsien							
	CRP 0	CRP 1	CRP 2	CRP 3	C5b-9 0	C5b-9 1	C5b-9 2	C5b-9 3
< 1	8	6	1	0	1	6	8	0
1 - 3	11	2	0	0	1	4	5	3
> 3	11	0	0	0	0	2	9	0

Abkürzungen: (hs)CRP = (hoch sensitives) C-reaktives Protein

Wie sich aus *Tabelle 5* herauslesen lässt, stand ein Teil der Patienten zum Zeitpunkt der myokardialen Biopsie unter medikamentöser Therapie mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-Rezeptorblockern (91 % bzw. 100 %), Betablockern (89 % bzw. 85 %), Diuretika (87 % bzw. 100 %), Spironolacton (58 % bzw. 54 %), Digitalis (43 % bzw. 36 %), Marcumar (41 % bzw. 36 %) und/oder Calcium-Antagonisten (3 % bzw. 5 %).

Tabelle 5:

Medikamentöse Behandlung der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, welche im Zeitraum von 2000 bis 2006 am Universitätsklinikum Ulm behandelt wurden zum Zeitpunkt der Myokardbiopsie. Die linke mittlere Spalte beinhaltet die Daten aller Patienten (n = 151). Die rechte Spalte enthält nur Daten der Patienten, von welchen ab April 2004 zusätzliche Blutproben entnommen wurden (n = 39).

	Alle Patienten (n = 151)	Patienten mit Blutprobe (n = 39)
<i>ACE-Hemmer und/oder Angiotensin-Rezeptorblocker</i>	138 (91 %)	39 (100 %)
<i>Betablocker</i>	135 (89 %)	33 (85 %)
<i>Diuretika</i>	132 (87 %)	39 (100 %)
<i>Spironolacton</i>	88 (58 %)	21 (54 %)
<i>Digitalis</i>	65 (43 %)	14 (36 %)
<i>Marcumar</i>	62 (41 %)	14 (36 %)
<i>Calcium-Antagonisten</i>	5 (3 %)	2 (5 %)

Abkürzungen: ACE = Angiotensin converting enzyme; n = number (Anzahl)

3.3 Korrelationen

Zwischen den hsCRP-Plasmaspiegeln und dem myokardialen C5b-9 konnte keine Korrelation nachgewiesen werden ($p = 0,10$). Die berechneten Korrelationen zwischen der gemessenen Ejektionsfraktion zum Zeitpunkt der Biopsie und dem myokardial nachgewiesenen CRP ($p = 0,41$), sowie zwischen der Ejektionsfraktion und den gemessenen hsCRP-Plasmaspiegeln ($p = 0,72$) waren ebenfalls nicht signifikant. Letztere korrelierten auch nicht mit den NT-proBNP-Plasmaspiegeln ($p = 0,60$). Außerdem war weder eine signifikante Korrelation zwischen myokardialem viralem Genom und myokardialem CRP ($p = 0,75$), noch zwischen myokardialem viralem Genom und myokardialem C5b-9 ($p = 0,90$) nachweisbar.

Es zeigte sich jedoch eine signifikant negative Korrelation zwischen den hsCRP-Plasmaspiegeln und dem ermittelten myokardialen CRP ($p = 0,003$; Korrelationskoeffizient $-0,47$).

Zur Kontrolle wurden etablierte Marker für Herzinsuffizienz verwendet. Zwischen der Ejektionsfraktion und den NT-proBNP-Plasmaspiegeln ($p = 0,04$), sowie zwischen der Ejektionsfraktion und der NYHA-Klasse ($p = 0,02$) war in beiden Fällen eine signifikant negative Korrelation nachweisbar.

Das Myokard eines Patienten, der an einer nicht-kardialen Ursache verstorben war, wurde ebenfalls analysiert. Es war jedoch nicht möglich CRP oder C5b-9 nachzuweisen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 151 Patienten, die aufgrund von dilatativer Kardiomyopathie an chronischem Herzversagen leiden, auf das myokardiale Vorkommen von CRP und dem terminalen Komplement-Komplex C5b-9 hin untersucht. Hierbei ließen sich drei Hauptbeobachtungen machen:

1. CRP und C5b-9 sind häufig im Myokard von Patienten vorzufinden, die an dilatativer Kardiomyopathie leiden.
2. Myokardiales CRP und C5b-9 sind hierbei signifikant miteinander kolokalisiert.
3. Zwischen den hsCRP-Plasmaspiegeln und dem myokardialen CRP konnte eine negative Korrelation nachgewiesen werden.

4.1 Vorkommen und Kolokalisation von CRP und C5b-9

Die Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie ist zumeist unbekannt. Dennoch steht das Auftreten der Krankheit oft im Zusammenhang mit einer chronischen Entzündung des Myokards. Der Risikomarker CRP und der Poren bildende Membranangriffskomplex C5b-9 sind beide Moleküle, welche im Rahmen von Entzündungsreaktionen auftreten. CRP kann eine Entzündung über die Aktivierung des Komplementsystems auslösen und verstärken [31] und C5b-9 stellt das Schlussglied dieser Serumkaskade dar. Dieser Zusammenhang könnte das häufige Vorkommen der beiden Moleküle (C5b-9: 93 %, CRP: 31 %) im Myokard von DCM-Patienten erklären.

Die signifikante Kolokalisation von CRP und C5b-9 und ihre oft ähnlichen Verteilungsmuster könnten durch ihre verschiedenen Rollen bei Entzündungsprozessen im Herzmuskelgewebe bedingt sein.

CRP kann eine unspezifische Immunreaktion auf dem klassischen Aktivierungsweg einleiten. Im Laufe dieser Reaktion entsteht als Endprodukt der terminale Komplement-Komplex C5b-9. Auf diese Weise könnte es bei der Expression von CRP in geschädigtem Gewebe zu einer nachfolgenden Bildung von C5b-9 kommen [31, 44, 89, 96]. Dies würde das häufige gemeinsame Auftreten der beiden Moleküle erklären (30 %). Es könnte auch den Rückschluss darauf zulassen, dass CRP wegen dieses Zusammenhangs nur äußerst selten isoliert in den Myokardbiopsien anzutreffen war (1 %).

C5b-9 konnte im Gegensatz dazu jedoch bei vielen Patienten (64 %) nachgewiesen werden, bei denen kein CRP im Myokard vorhanden war. Dieses insgesamt vermehrte Auftreten von C5b-9 wäre dadurch erklärbar, dass eine Immunreaktion auch völlig unabhängig von CRP durch die Aktivierung über Antikörper, Troponin oder auf alternativen Wegen (Lektin) stattfinden kann. In diesen Fällen wäre auch eine Anhäufung von C5b-9 möglich, ohne dass sich zugleich auch CRP im Myokard befinden muss [50].

4.2 hsCRP-Plasmaspiegel

Studien von Ridker et al. zufolge stellt das hsCRP einen myokardialen Risikofaktor dar. Deshalb wurden im Blut von DCM-Patienten zunächst hohe Plasmaspiegel an CRP erwartet [72]. Dies war jedoch nicht der Fall. Des Weiteren wurde entweder mit einer positiven oder aber einer fehlenden Korrelation der hsCRP-Plasmaspiegel mit dem myokardialen CRP gerechnet. Überraschenderweise wurde diesbezüglich jedoch eine negative Korrelation beobachtet (*Tabelle 4*). Diese Phänomene könnten durch das so genannte *trapping* von zuvor freiem hsCRP in nekrotischen und entzündeten Bereichen bei chronischer Herzinsuffizienz erklärt werden. Das zuvor im Blut befindliche hsCRP könnte sich aufgrund des *trapping* in den entsprechenden Bereichen des Herzmuskels vermehrt eingelagert haben.

Durch die Anreicherung des CRP im Myokard ließe sich so der parallel dazu ablaufende Konzentrationsabfall des hsCRP im Blutserum erklären. Anders als bei ischämischem Herzversagen [38] waren die hsCRP-Plasmaspiegel bei der dilatativen Kardiomyopathie nicht signifikant mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion und den NT-proBNP-Plasmaspiegeln korreliert.

4.3 Virales Genom

Bei 20 (51 %) Patienten mit zusätzlich zur Biopsie entnommener Blutprobe und 28 (19 %) aller in der Studiengruppe befindlichen Patienten konnte virales Genom im Myokard nachgewiesen werden. Da Viren in den letzten Jahren vermehrt als Ursache für die dilatative Kardiomyopathie diskutiert werden, war ein solcher Anteil an viralem Genom in unserer Studienpopulation nicht überraschend [4, 27, 47, 48, 50, 68, 80]. Abweichende Ergebnisse aus vergleichbaren Studien lassen sich durch das andere Studiendesign erklären, das für unsere Studie verwendet wurde. So wurde z.B. das Patientenkollektiv retrospektiv erhoben.

Die relativ hohe Anzahl von Patienten mit viralem Genom in der zweiten Gruppe (n = 39) lässt sich unter anderem durch die erweiterte virologische Analyse der Myokardbiopsien ab 2005 erklären, da diese ungefähr zum selben Zeitpunkt begonnen hat, wie die zusätzliche Blutentnahmen. Diese erweiterte Analyse umfasst neben Entero- und Adenoviren zusätzlich den Nachweis von Parvovirus B19 und humanem Herpesvirus 6, da diese ab diesem Zeitpunkt als ebenfalls sehr relevant für die Entstehung von Myokarditis beschrieben wurden [4, 27, 32, 42, 48, 68]. Durch das größere Spektrum an Viren, auf welche das Myokard der DCM-Patienten hin untersucht wurde, erhöht sich demzufolge auch die Wahrscheinlichkeit, virales Genom festzustellen.

Bei den meisten der Patienten, die an viraler Kardiomyopathie litten, konnte Parvovirus B19 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht auch den neuesten Studien von Schultheiss et al. aus dem Jahr 2008 [17].

In unserer Studie wurden nur rechtsventrikuläre Biopsien entnommen, um das Risiko für die Patienten zu minimieren. Man könnte sie alternativ z.B. auch aus Arealen gewinnen, die zuvor durch MRT-Untersuchungen bereits als auffällig diagnostiziert wurden. Die selektive Auswahl des Biopsieortes könnte Einfluss auf den Nachweis von viralem Genom haben und die erhebliche Variabilität bei den Angaben über den Nachweis viraler DNA und RNA verschiedener Studien mit bedingen [24, 32, 68].

Die Power unserer Studie ist durch die geringe Anzahl an Patienten, von denen Blutproben vorhanden waren ($n = 39$), limitiert und die Ergebnisse müssen in einer größeren Studienpopulation bestätigt werden.

4.4 Färbeergebnisse und Verteilungsmuster

47 Patienten, also 31 %, zeigten eine positive Färbung auf CRP. Myokardiales CRP war hierbei, genau wie myokardiales C5b-9, in verschiedenen Verteilungsmustern zu finden (*Abb. 2a+b und 3a+b*). Dabei waren sowohl fleckige, unscharf begrenzte, als auch laminare Anfärbungen des Myokards zu beobachten. Ähnliche Muster wurden bereits bei der Verwendung der kardialen Magnetresonanztomographie (MRT) bei später Gadoliniumanreicherung (LGE) im Herzgewebe entdeckt. Anhand des LGE kann eine Unterscheidung von koronarer Herzkrankheit und DCM als zu Grunde liegende Ursachen linksventrikulärer Dysfunktion ermöglicht werden. Denn bei der DCM zeigen sich Muster der Gadoliniumanreicherung, die nur im Rahmen dieser Erkrankung vorzufinden sind.

Diese Muster stimmen auch mit dem Vorkommen von Fibrosierung überein [60, 85]. Weil sich das Gadolinium bevorzugt in diesen Arealen anzusammeln scheint, können mit diesem Verfahren Fibrosierungen und Nekrosen im Herzgewebe dargestellt werden [101].

Da sich die Muster im MRT, die von McCrohon et al. nur bei der DCM festgestellt werden konnten, und die von uns beschriebenen Arten der Anfärbung durch die CRP-Anreicherung ähneln, könnte das Verteilungsmuster von CRP im Myokard mit den verschiedenen Mustern der späten Gadoliniumanreicherung im kardialen MRT korrespondieren [60].

Demzufolge wäre eine Anreicherung von CRP in fibrosierten und nekrotisierten Arealen im Myokard von DCM-Patienten vorhanden und entsprechend würden sich Fibrosierungen im Herzmuskelgewebe dann auch durch den Nachweis von CRP darstellen lassen. Dies könnte die Hypothese des *trapping* von CRP in diesen Bereichen und den darauf folgenden Abfall des CRP-Plasmaspiegels erklären. Der Verdacht, dass CRP über die Initiierung und Verstärkung einer Entzündung mit nachfolgender Chronifizierung, Gewebszerstörung und -umstrukturierung mit Fibrosebildung an der Pathogenese der DCM erheblichen Anteil haben kann, lässt sich durch diese Annahmen erhärten.

Das Material, das zur Kontrolle verwendet wurde, stammt aufgrund ethischer Bedenken nur von einem einzelnen Patienten und wurde bei einer Autopsie entnommen, da keine herzgesunden Patienten dem Risiko einer Herzkatheterisierung unterzogen und biopsiert werden sollten.

4.5 Klinischer Ausblick

Die wichtige Rolle des C-reaktiven Proteins als unabhängiger Risikomarker für kardiovaskuläre Krankheiten scheint offensichtlich zu sein [40]. Bisher stehen nur operative oder rein symptomatische, medikamentöse oder alternative Therapieansätze, wie Gewichtsreduktion, Ernährungsumstellung, etc., zur Behandlung der DCM zur Verfügung. Deshalb wurde das Molekül zu einem viel versprechenden Ziel für therapeutische Ansätze [49, 70].

Auf der einen Seite gibt es Ansätze, kardiovaskuläre Krankheiten durch die Inhibition der CRP-Synthese oder aber seiner Wirkung zu behandeln [37, 94]. Hierdurch könnte eine vermehrte Entzündungsaktivität bei Patienten mit grundsätzlich basal erhöhten CRP-Spiegeln unterdrückt oder vermieden werden, die durch zuvor beschriebene Mechanismen den Auslöser für verschiedene Herzkrankheiten darstellen kann. Andererseits gewinnt die Entwicklung von Antisense-Strategien und eines CRP-Rezeptorblockers an Bedeutung. Dieser letzte Ansatz wird jedoch kontrovers diskutiert, da die Grundstruktur der CRP-Rezeptoren noch nicht genügend erforscht ist und diesbezüglich viele Spekulationen im Raum stehen [16, 55, 56, 77].

An Tiermodellen wird bereits an der Entwicklung von CRP-Rezeptorblockern oder -Synthesehemmern geforscht. Das Mausmodell hat sich als ungünstig hierfür erwiesen, da CRP dort kein Akute-Phase-Protein darstellt, sondern z.B. durch Serumamyloid A vertreten wird. Aus diesem Grund wurde in aktuelleren Studien von Sun et al. das Kaninchenmodell für weitere Untersuchungen verwendet [87].

Erst in jüngerer Vergangenheit wurde das Vorkommen von CRP im Rahmen von Atherosklerose [87, 102], ischämischen Herzerkrankungen [10] und Herzversagen [38] beschrieben. Während die potentiell Krankheiten verursachende oder verstärkende Rolle von CRP in diesen Bereichen festzustehen scheint und weiterhin daran geforscht wird, existieren bis heute jedoch kaum Daten dazu, welche Rolle CRP bei nicht ischämisch bedingten Herzerkrankungen spielt.

In dieser Studie zeigen wir zum ersten Mal, dass CRP im Myokard von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nachgewiesen werden kann und dass es dort auch signifikant mit dem terminalen Komplement-Komplex C5b-9 kolokalisiert ist.

Es müssen auch andere Komplementaktivatoren, wie z.B. der Antikörper IgG, als wichtige Faktoren für die Pathogenese der DCM in Betracht gezogen werden. Dennoch zeigen unsere Daten die möglicherweise zentrale Rolle von CRP bei kardiovaskulären Erkrankungen und im speziellen bei der dilatativen Kardiomyopathie auf und prädestinieren dieses Molekül in der kommenden Zeit für weitere Nachforschungen und als Ziel für therapeutische Anwendungen am Menschen.

5 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist ein Syndrom, das bisher noch nicht ausreichend erforscht wurde. Sie ist die am häufigsten auftretende Form der Kardiomyopathien und äußert sich durch das Auftreten von belastungsabhängiger Dyspnoe, körperlicher Schwäche, Rhythmusstörungen und Palpitationen. Ihre Ätiologie ist dabei zumeist unbekannt. Viele DCM-Fälle werden neuerdings jedoch auf eine virale Genese zurückgeführt. Bei voll entwickeltem Krankheitsbild können alle Schweregrade der Herzinsuffizienz angetroffen werden. Aufgrund ihrer langsamen Entwicklung wird die DCM oft erst in einem späten Stadium entdeckt. Zu ihrer Therapie stehen bislang nur unzureichende operative oder rein symptomatische, medikamentöse Therapieansätze zur Verfügung. Die Herzinsuffizienz steht aufgrund ihrer hohen Morbidität und Mortalität dabei als Kardinalsymptom und größtes zu behandelndes Problem im Vordergrund.

In jüngerer Vergangenheit wurde festgestellt, dass das C-reaktive Protein (CRP) in einem hochsensitiven Bereich einen Risikofaktor für verschiedene kardiovaskuläre Krankheiten darstellt und es konnte erst in den letzten Jahren mit dem Auftreten von ischämischem Herzversagen beim Menschen in Verbindung gebracht werden. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass das Molekül an Liganden, welche in ischämisch zerstörtem Gewebe exprimiert werden, binden und dadurch das Komplementsystem aktivieren kann. Eine solche Aktivierung, die unter anderem in der Bildung des terminalen Komplement-Komplexes C5b-9 resultiert, kann ihrerseits durch das Auslösen einer Entzündung mit eventueller Chronifizierung zu weiterer Nekrose- und Fibrosebildung im Myokard führen. Letztere scheinen in verschiedenen Erscheinungsformen für die DCM typisch zu sein und stellen eine der morphologisch charakteristischen Komponenten der Krankheit dar.

In dieser Studie haben wir das Vorkommen von CRP und dem terminalen Komplement-Komplex C5b-9 im Myokard von Patienten erforscht, die an nicht ischämisch bedingter Herzinsuffizienz leiden.

Von 151 Patienten, die an dilatativer Kardiomyopathie erkrankt waren, wurden endomyokardiale Biopsien entnommen. Diese wurden immunhistochemisch auf das Vorkommen und die Verteilung von CRP und C5b-9 hin untersucht. Bei 39 Patienten wurden außerdem die Serumspiegel von hochsensitivem CRP (hsCRP) und N-terminalem *pro brain natriuretic peptide* (NT-proBNP) gemessen und mit den Biopsieergebnissen korreliert. Bei 47 der DCM-Patienten konnte CRP und bei 141 Patienten konnte C5b-9 im Myokard nachgewiesen werden. Die beiden Moleküle waren dabei signifikant kolokalisiert.

Die Muster der Anfärbungen ließen sich hierbei mit Mustern vergleichen, welche bereits bei der späten Gadoliniumanreicherung in der Magnetresonanztomografie (MRT) als in ihrer Form typisch für die DCM entdeckt wurden. Diese charakteristischen Muster im MRT zeigten fibrosierte Areale im Herzmuskel auf. In diesen Gebieten könnte ein *trapping* des CRP stattfinden, was die negative Korrelation erklären würde, die zwischen den Serumwerten von hsCRP und dem Vorhandensein von myokardialem CRP beobachtet wurde.

Diese Studie zeigt erstmals, dass CRP häufig im Myokard von Patienten vorkommt, die an nicht ischämisch bedingter dilatativer Kardiomyopathie leiden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass CRP dort häufig mit dem terminalen Komplement-Komplex C5b-9 kolokalisiert.

Daraus lässt sich schließen, dass CRP bei der dilatativen Kardiomyopathie durch die Aktivierung des Komplementsystems zu myokardialen Schäden führen könnte. Dies könnte einen neuen Ansatzpunkt für nicht nur symptomatische sondern auch ursächliche Therapien bieten und sollte in größeren Studien weiter untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Aretz HT: Myocarditis. The Dallas criteria. *Hum Pathol* 18: 619-624 (1987)
- 2) Bauriedel G, Skowasch D, Lüderitz B: Zertifizierte medizinische Fortbildung. Die chronische Herzinsuffizienz. *Dtsch Arztebl* 102: 592-601 (2004)
- 3) Bostan OM, Cil E: Dilated cardiomyopathy in childhood. Prognostic features and outcome. *Acta Cardiol* 61: 169-174 (2006)
- 4) Bowles NE, Ni J, Kearny DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Briker JT, Bowles KR, Towbin JA: Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 42: 466-472 (2003)
- 5) Chapman NM, Kim KS: Persistent coxsackievirus infection. Enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol* 323: 275-292 (2008)
- 6) Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT: Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure. Results of the Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 107: 3133-3140 (2003)
- 7) Connor CAR, Bronstein LH, Doyle EF, Franco SC, Hellerstein HK: Nomenclature and Diagnosis for the Cardiac Diagnosis. In: Little, Brown and Company (Hrsg) *Diseases of the heart and blood vessels. Nomenclature and Criteria for Diagnosis*, by The Criteria Committee of the New York Heart Association / Kossmann CE, Chasis H, Connor CAR, De la Chapelle CE, Foley WT, Harvey RM, Maynard EP, Schwedel JB, 6th edition, Boston, S. 3-115 (1964)
- 8) Coughlin SS, Szklo M, Baughman KL, Pearson TA: The epidemiology of idiopathic dilated cardiomyopathy in a biracial community. *Am J Epidemiol* 131: 48-56 (1990)
- 9) Coughlin SS, Tefft MC, Rice JC, Gerone JL, Baughman KL: Epidemiology of idiopathic dilated cardiomyopathy in the elderly. Pooled results from two case-control studies. *Am J Epidemiol* 143: 881-888 (1996)
- 10) Cushman M, Arnold AM, Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Burke GL, Polak JF, Tracy RP: C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women. The cardiovascular health study. *Circulation* 112: 25-31 (2005)

- 11) Daliento L, Calabrese F, Tona F, Caforio ALP, Tarsia G, Angelini A, Thiene G: Successful treatment of enterovirus-induced myocarditis with interferon- α . *J Heart Lung Transpl* 22: 214-217 (2003)
- 12) Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V: C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350: 1387-1397 (2004)
- 13) Dec GW: Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N Engl J Med* 12: 885-890 (1985)
- 14) Dietz R, Friedrich K, Schulz-Menger J: Kardiomyopathien und Myokarditiden. In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M (Hrsg) *Harrisons Innere Medizin*, Bd 2, 17. Aufl, ABW-Wissenschaftsverlag GmbH, S. 1824-1833 (2009)
- 15) Di Lenarda A, Pinamonti B, Mestroni L, Salvi A, Sabbadini G, Gregori D, Perkan A, Zecchin M, Carniel E, Bussani R, Silvestri F, Morgera T, Camerini F, Sinagra G, Gruppo di Studio sulle Malattie del Miocardio: The natural history of dilated cardiomyopathy. A review of the Heart Muscle Disease Registry of Trieste. *Ital Heart J* 5: 253-266 (2004)
- 16) Du Clos TW: Function of C-reactive protein. *Ann Med* 32: 274-278 (2000)
- 17) Escher F, Kuhl U, Sabi T, Suckau L, Lassner D, Poller W, Schultheiss HP, Noutsias M: Immunohistological detection of Parvovirus B19 capsid proteins in endomyocardial biopsies from dilated cardiomyopathy patients. *Med Sci Mon* 14: 333-338 (2008)
- 18) Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR: From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* 16: 175-186 (2001)
- 19) Fearon DT: The complement system and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10: 335-361 (1998)
- 20) Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G: Hemodynamic effects of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy. Three-months results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 35: 1590-1598 (2000)
- 21) Ferrans VJ: Pathologic Anatomy of the dilated cardiomyopathies. *Am J Cardiol* 64: 9-11 (1989)
- 22) Figulla HR, Rahlf G, Nieger M, Luig H, Kreuzer H: Spontaneous hemodynamic improvement or stabilization and associated biopsy findings in patients with congestive cardiomyopathy. *Circulation* 71: 1095-1104 (1985)

- 23) Figulla HR, Kellermann AB, Stille-Siegener M, Heim A, Kreuzer H: Significance of coronary angiography, left heart catheterization, and endomyocardial biopsy of the diagnosis of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 124: 1251-1257 (1992)
- 24) Figulla HR, Stille-Sieger M, Mall G, Heim A, Kreuzer H: Myocardial enterovirus infection with left ventricular dysfunction. A benign disease compared with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 25: 1170-1175 (1995)
- 25) Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A: Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis. Virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 107: 857-863 (2003)
- 26) Fuchs M, Drexler H: Mechanisms of Inflammation in Heart Failure. *Herz* 29: 782-787 (2004)
- 27) Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A, Deguchi H, Kawamura K, Isomura T, Suma H, Shimizu A: Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 36: 1920-1926 (2000)
- 28) Giannitsis E, Korowski V, Schwabe K, Stierle U: Kardiomyopathien. In: Renz-Polster H, Krautzig S (Hrsg) *Basislehrbuch Innere Medizin*, 4. Aufl, Elsevier, München Jena, S. 126-196 (2008)
- 29) Gill R, Kemp JA, Sabin C, Pepys MB: Human C-reactive protein increases cerebral infarct size after middle cerebral artery occlusion in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1214-1218 (2004)
- 30) Goser S, Andrassy M, Buss SJ, Leuschner F, Volz CH, Ottl R, Zittrich S, Blaudeck N, Hardt SE, Pfitzer G, Rose NR, Katus HA, Kaya Z: Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation* 117: 1693-1702 (2006)
- 31) Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, Pepys MB: C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* 190: 1733-1739 (1999)
- 32) Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, Vonhof S, Hein WJ, Müller G, Figulla HR: Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol* 54: 83-88 (1999)
- 33) Henry WI, Gardin JM, Ware JH: Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age. *Circulation* 62: 1054-1061 (1980)
- 34) Hoppe UC, Erdmann E: Guidelines for the treatment of chronic heart failure. Issued by the Executive Committee of the German Society of Cardiology. Heart and circulation research, compiled on behalf of the Commission of Clinical Cardiology in cooperation with Pharmaceutical Commission of the German Physicians' Association. *Z Kardiol* 90: 218-237 (2001)

- 35) Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schonian U, Maisch B: The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* 25: 279-285 (2000)
- 36) Imai M, Takeishi M, Hirayama A, Toyoda C, Koyama K: Idiopathic cardiomyopathy - pathological study of 16 cases. *Acta Pathol Jpn* 20: 153-169 (1970)
- 37) Ivashchenko Y, Kramer F, Schafer S, Bucher A, Veit K, Hombach V, Busch A, Ritzeler O, Dedio J, Torzewski J: Protein kinase C pathway is involved in transcriptional regulation of C-reactive protein synthesis in human hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 186-192 (2005)
- 38) Kardys I, Knetsch AM, Bleumink GS, Deckers JW, Hofman A, Stricker BH, Witteman JC: C-reactive protein and risk of heart failure. The Rotterdam Study. *Am Heart J* 152: 514-520 (2006)
- 39) Kawai C: From myocarditis to cardiomyopathy. Mechanisms of inflammation and cell death. Learning from the past for the future. *Circulation* 99: 1091-1100 (1999)
- 40) Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, Thorand B, Loewel H, Chambless L, Meisinger C, Schneider A, Martin S, Kolb H, Herder C: Increased concentrations of C-reactive protein and IL-6 but not IL-18 are independently associated with incident coronary events in middle-aged men and women. Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2745-2751 (2006)
- 41) Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP: Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 75: 295-300 (1996)
- 42) Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CPL, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R: Parvovirus B19 Infection Mimicking Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 108: 945-950 (2003)
- 43) Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP: Interferon- β treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 107: 2793-2798 (2003)
- 44) Lagrand WK, Niessen HWM, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FWA, Meijer C, Hack E: C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* 95: 97-103 (1997)
- 45) Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, Hack CA: C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: More than an epiphenomenon? *Circulation* 100: 96-102 (1999)

- 46) Lauer B, Schannwell M, Kuhl U, Strauer BE, Schultheiss HP: Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 35: 11-18 (2000)
- 47) Liu PP, Opavsky MA: Viral myocarditis. Receptors that bridge the cardiovascular with the immune system? *Circ Res* 86: 253-254 (2000)
- 48) Lotze U, Egerer R, Tresselt C, Glück B, Dannberg G, Stelzner A, Figulla HR: Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* 193: 75-82 (2004)
- 49) Lowe GD, Pepys MB: C-reactive protein and cardiovascular disease. Weighing the evidence. *Curr Atheroscler Rep* 8: 421-428 (2006)
- 50) Lubinsky J, Wang L, Mastellos D, Sahu A, Lambris JD, Friedman HM: In vivo role of complement-interacting domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *J Exp Med* 190: 1637-1646 (1999)
- 51) Magnani JW, Dec GW: Myocarditis. Current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 113: 876-885 (2006)
- 52) Maisch B: Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC Task Force – mehr Fragen als Antworten? *Med Klin* 93: 199-209 (1998)
- 53) Maisch B, Funke R, Alter P, Portig I, Pankuweit S: Dilatative Kardiomyopathie und Myokarditis. *Internist* 43: 45-65 (2002)
- 54) Maisch B, Portig I: Entzündliche Herzerkrankungen. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schniegel W, Böhm M, Berdel WE (Hrsg) *Innere Medizin*, 5. Aufl, Urban und Fischer, München Jena, S. 324-362 (2004)
- 55) Manolov DE, Rucker C, Hombach V, Nienhaus GU, Torzewski J: Ultrasensitive confocal fluorescence microscopy of C-reactive protein interacting with FcγRIIIa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2372-2377 (2004)
- 56) Marnett L, Mold C, Du Clos TW: C-reactive protein. Ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol* 117: 104-111 (2005)
- 57) Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB: Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. An American Heart Association scientific statement from the council on clinical cardiology, heart failure and transplantation committee, Quality of care and outcomes research and functional genomics and translational biology interdisciplinary working groups and council on epidemiology and prevention. *Circulation* 113: 1807-1816 (2006)
- 58) Mason JW: Viral latency. A link between myocarditis and dilated cardiomyopathy? *J Mol Cell Cardiol* 34: 695-698 (2002)

- 59) Mason JW: Myocarditis and dilated cardiomyopathy: An inflammatory link. *Cardiovasc Res* 60: 5-10 (2003)
- 60) McCrohon JA, Moon JCC, Prasad SK, McKenna WJ, Lorenz CH, Coats AJS, Pennell DJ: Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 108: 54-59 (2003)
- 61) Mestroni L, Giacca M: Molecular genetics of dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 12: 303-309 (1997)
- 62) Mestroni L, Rocco C, Vatta M, Miodic S, Giacca M: Advances in molecular genetics of dilated cardiomyopathy. The heart muscle disease study group. *Cardiol Clin* 16: 611-621 (1998)
- 63) Meyer R, Flegel HG: Morphologische Befunde bei dilatativer Kardiomyopathie. *Z Ges Inn Med* 44: 426-477 (1989)
- 64) Mold C, Rodriguez W, Rodic-Polic B, Du Clos TW: C-reactive protein mediates protection from lipopolisaccharide through interactions with Fc γ R. *J Immunol* 169: 7019-7025 (2002)
- 65) Nakamura H, Yamamura T, Umemoto S, Fukuta S, Shioi T, Matsumori A, Sasayama S, Matsuzaki M: Autoimmune response in chronic ongoing myocarditis demonstrated by heterotopic cardiac transplantation in mice. *Circulation* 94: 3348-3354 (1996)
- 66) Niculescu F, Badea T, Rus H: Sublytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells. Role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Arteriosclerosis* 142: 47-56 (1999)
- 67) Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Orazem J, Magorien RD, O'Shaughnessy C, Ganz P: Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 29-38 (2005)
- 68) Pauschinger M, Neil E, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kuhl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP and Towbin JA: Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 99: 1348-1354 (1999)
- 69) Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F, Centers for Disease Control and Prevention, American Heart Association: Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 107: 499-511 (2003)

- 70) Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, Gallimore JR, Kahan MC, Bellotti V, Hawkins PN, Myers RM, Smith MD, Polara A, Cobb AJ, Ley SV, Aquilina JA, Robinson CV, Sharif I, Gray GA, Sabin CA, Jenvey MC, Kolstoe SE, Thompson D, Wood SP: Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature* 440: 1217-1221 (2006)
- 71) Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P: Report of the 1995 World Health Organisation/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-842 (1996)
- 72) Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH: Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336: 973-979 (1997)
- 73) Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N: C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events. An 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 107: 391-397 (2003)
- 74) Ridker PM, Cook N: Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham Risk Scores. *Circulation* 109: 1955-1959 (2004)
- 75) Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E: C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 352: 20-28 (2005)
- 76) Roberts WC, Siegel RJ, McManus BM: Idiopathic dilated cardiomyopathy. Analysis of 152 necropsy patients. *Am J Cardiol* 60: 1340-1355 (1987)
- 77) Rucker C, Manolov DE, Kuzmenkina EV, Tron K, Slatosch H, Torzewski J, Nienhaus GU: Affinity of C-reactive protein towards FcγRI is strongly enhanced by the g-chain. *Am J Pathol* 170: 755-763 (2007)
- 78) Rosalki SB: C-reactive protein. *Int J Clin Pract* 55: 269-270 (2001)
- 79) Rose NR, Hill SL: The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 80: 92-99 (1996)
- 80) Rose NR: Viral damage or „molecular mimicry“ - placing the blame in myocarditis. *Nat Med* 6: 631-632 (2000)
- 81) Sabatine MS, Morrow DA, Jablonski KA, Rice MM, Warnica JW, Domanski MJ, Hsia J, Gersh BJ, Rifai N, Ridker PM, Pfeffer MA, Braunwald E, PEACE Investigators: Prognostic significance of the Centers for Disease Control/American Heart Association high-sensitivity C-reactive protein cut points for cardiovascular and other outcomes in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 115: 1528-1536 (2007)

- 82) Satoh M, Nakamura M, Akatsu T, Shimoda Y, Segawa I, Hiramori K: C-reactive protein co-expresses with tumor necrosis factor-alpha in the myocardium in human dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 7: 748-754 (2005)
- 83) Schoenberger J, Zimmer M, Ertl G: Genetik der dilatativen Kardiomyopathie. *Dtsch Arztebl* 101: 1099-1105 (2004)
- 84) Sliwa K, Damasceno A, Mayosi BM: Epidemiology and ethiology of cardiomyopathy in Africa. *Circulation* 112: 3577-3583 (2005)
- 85) Staudt A, Hummel A, Ruppert J, Dorr M, Trimpert C, Birkenmeier K, Krieg T, Staudt Y, Felix SB: Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy. 6-month results from a randomized study. *Am Heart J* 152: 712-716 (2006)
- 86) Stierle U: Kardiomyopathien. In: Stierle U, Niederstadt C (Hrsg) *Klinikleitfaden Kardiologie*, 3. Aufl, Urban und Fischer, München Jena, S. 407-448 (1996)
- 87) Sun H, Koike T, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, Kitajima S, Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen YE, Fan J: C-reactive protein in atherosclerotic lesions. Its origin and pathophysiological significance. *Am J Pathol* 167: 1139-1148 (2005)
- 88) Swedberg K, Remme WJ, Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary. *Eur Heart J* 26: 1115-1140 (2005)
- 89) Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, Fitzsimmons C: Processes in arterogenesis. Complement activation. *Arteriosclerosis* 132: 131-138 (1997)
- 90) Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich M, König W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V: C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1386-1392 (1998)
- 91) Towbin JA: Inflammatory cardiomyopathy. There is a specific matrix destruction in the course of the disease. *Ernst Schering Res Found Workshop* 55: 219-250 (2006)
- 92) Tschöpe C, Bock CT, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck PL, Pauschinger M, Poller WC, Kühl U, Kandolf R, Schultheiss HP: High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* 111: 879-886 (2005)
- 93) Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y: Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol* 7: 64-69 (2001)
- 94) Verma S, Szmitko PE, Ridker PM: C-reactive protein comes of age. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2: 29-36 (2005)

- 95) Volanakis JE, Kaplan MH: Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med* 136: 612-614 (1971)
- 96) Volkanis JE: Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann NY Acad Sci* 389: 235-250 (1982)
- 97) Waller TA, Hiser WL, Capehart JE, Roberts WC: Comparison of clinical and morphologic cardiac findings in patients having cardiac transplantation for ischemic cardiomyopathy, idiopathic dilated cardiomyopathy, and dilated hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 81: 884-894 (1998)
- 98) Wei J, Chang CY, Chuang YC, Young MS, Huang CM, Yin WH, Tung DY, Lee WC, Lee SL, Chu CH: Heart transplantation at Cheng Hsin General Hospital in Taiwan. 15 year-experience. *Transplant Proc* 36: 2274-2276 (2004)
- 99) Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC: Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 89: 2582-2589 (1994)
- 100) Young JB, Dunlap ME, Pfeffer MA, Probstfield JL, Cohen-Solal A, Dietz R, Granger CB, Hradec J, Kuch J, McKelvie RS, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Held P, Solomon SD, Yusuf S, Swedberg K: Candesartan in Heart failure Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM). Mortality and morbidity reduction with Candesartan in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction. Results of the CHARM low-left ventricular ejection fraction trials. *Circulation* 110: 2618-2626 (2004)
- 101) Zimmermann O, Grebe O, Merkle N, Nusser T, Kochs M, Bienek-Ziolkowski M, Hombach V, Torzewski J: Myocardial biopsy findings and gadolinium enhanced cardiovascular magnetic resonance in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 8: 162-166 (2006)
- 102) Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages. Implications for atherosclerosis. *Circulation* 103: 1194-1197 (2001)
- 103) Zwaka TP, Manolov D, Özdemir C, Marx N, Kaya Z, Kochs M, Höher M, Hombach V, Torzewski J: Complement and dilated cardiomyopathy. A role of sublytic terminal complement complex-induced tumor necrosis factor- α synthesis in cardiac myocytes. *Am J Pathol* 161: 449-457 (2002)

7 Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Dr. med. V. Hombach für seine freundliche Unterstützung und die Ermöglichung meiner Dissertation danken. Insbesondere für die Bereitstellung der finanziellen Mittel und der nötigen Laborräume für die Durchführung der Experimente dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Professor Dr. med. M. phil. Jan Torzewski, der mich auf dem gesamten Weg zu meiner Promotion begleitet hat und jederzeit bereit war, mir bei Fragen und Problemen weiter zu helfen. Auch danke ich ihm für die Ermöglichung dieser Arbeit durch die Überlassung des Themas und das Bereitstellen der notwendigen Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Außerdem möchte ich gerne Frau Andrea Bucher, Frau Dr. biol. hum. Juliane Wiehe und Herrn Dr. biol. hum. Dimitar Manolov dafür danken, dass sie mir ebenfalls stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Sie haben entscheidend zu der guten Atmosphäre im Labor beigetragen und ich habe mich dort bei ihnen stets sehr wohl gefühlt.

Mein ganz besonderer Dank gilt zum einen Frau Magdalena Bienek-Ziolkowski für die unermüdliche und nette Betreuung meiner Arbeit. Sie hat mich zu Beginn sehr fachkundig und geduldig in die praktische Labortätigkeit eingeführt und mich bei der Durchführung aller meiner experimentellen Arbeiten unterstützt.

Zum anderen möchte ich Dr. Oliver Zimmermann meinen größten Dank aussprechen. Er hat mir damals ermöglicht, diese Arbeit überhaupt zu beginnen und stand mir die ganze Zeit über für Fragen, Korrekturen und auch im Rahmen der statistischen Auswertung der Arbeit immer sehr freundlich und hilfreich zur Seite.

Außerdem danke ich dem Cusanuswerk für seine finanzielle und vor allem für seine ideelle Förderung während meiner letzten Studienjahre. Des Weiteren danke ich meinen Freunden von ganzem Herzen dafür, dass sie immer für mich da waren, mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und so erheblich mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern danken, denn sie haben mir mein Studium und meinen gesamten Werdegang überhaupt erst ermöglicht.