

Aus der Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Prognostische und diagnostische Bedeutung von
macrophage migration inhibitory factor in der
nichtischämischen
Kardiomyopathie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schwille, Johannes Philipp

2020

Dekan: Professor Dr. med. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Ong

Tag der Disputation: 09.01.2020

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Diagnostik, Therapie und Prognose der nicht-ischämischen Kardiomyopathie (NICM).....	1
1.1.1. ICD-Therapie in der nicht-Ischämischen Kardiomyopathie.....	2
1.2. Definition und Klassifikation struktureller Herzerkrankungen	3
1.2.1. Klassifikation der Kardiomyopathien nach der European Society of Cardiology (ESC).....	4
1.2.2. Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)	5
1.2.3. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)	7
1.2.4. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC/D)	9
1.2.5. Restriktive Kardiomyopathie (RCM)	10
1.2.6. Nicht-klassifizierte Kardiomyopathien.....	11
1.3. Biomarker struktureller Herzerkrankungen.....	12
1.3.1. Gremlin-1.....	12
1.3.2. MHC-II, CD3, CD68.....	13
1.4. Macrophage migration inhibitory factor	13
1.5. Hypothese.....	15
2. Materialien und Methoden.....	17
2.1. Materialien	17
2.1.1. Antikörper	17
2.1.2. Kits	17
2.1.3. Reagenzien	17
2.1.4. Klinikausstattung	18
2.1.5. Software	18
2.2. Studiendesign, Patientenkollektiv und Erhebung der klinischen Risikofaktoren	18
2.3. Studienpunkte und Follow-up.....	20
2.4. Endomyokardbiopsie.....	21
2.5. Histopathologische Analyse und Immunhistochemie	21
2.6. Molekularer Nachweis von Virus-DNA durch „nested PCR“	23
2.7. Bestimmung linksventrikulärer Risikomarker durch Kontrastmittel- Magnetresonanztomographie	24
2.8. Statistische Analyse	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Patientenkohorte und Baseline-Charakteristika	27
3.2. MIF wird im Myokard von Patienten mit NICM exprimiert	31
3.3. Myokardiale MIF-Expression korreliert mit dem Ausmaß myokardialer Fibrosierung	35

3.4. Myokardiale MIF-Expression ist ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechtes klinisches Outcome bei Patienten mit NICM	37
4. Diskussion.....	43
5. Zusammenfassung.....	48
6. Literaturverzeichnis	50
7. Eigenanteil	56
8. Veröffentlichungen.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Baseline-Charakteristika der Patientenkohorte [5]	28
Tabelle 2. Klassifikation der Kardiomyopathien bezüglich klinischer und histologischer Kriterien [5]	31
Tabelle 3. Hazard ratios für die Vorhersage des primären Studienendpunkts [5]	37
Tabelle 4. Hazard ratios für die Vorhersage des sekundären kombinierten Studienendpunkts* [5]	39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenfassung des empfohlenen Klassifikationssystems der CMP durch die ESC von 2008 HCM, hypertrophe Kardiomyopathie; DCM, dilatative Kardiomyopathie, ARVC, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, RCM, restriktive Kardiomyopathie [23]	5
Abbildung 2: Representative Darstellung von Myokardgewebeschnitten mit unterschiedlichen Graden der myokardialen Fibrose und MIF-Expression bei Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie. Die hier dargestellten Myokardgewebeschnitte wurden gefärbt mit Masson-Trichrom-Färbung, Anti-MIF (Anti-Macrophage-migration-inhibitory-factor), Isotyp und PBS- (Phosphat-buffered-saline-) Kontrolle. LinkeSpalte: Myokard eines Patienten mit normaler linksventrikulärer Ejektionsfraktion ohne Zeichen der Inflammation und Fibrose. Das Myokard weist keine MIF-Expression auf. Mittlere Spalte: Myokard eines Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mit geringer Infiltration durch inflammatorische Zellen und geringer Myokardfibrose. Es zeigt sich geringe MIF-Expression innerhalb der geschädigten Kardiomyozyten und inflammatorischen Zellen.	

Rechte Spalte: Myokard eines Patienten mit chronischer Myokarditis mit ausgeprägter Infiltration inflammatorischer Zellen und schwerer Myokardfibrose [5] 33

Abbildung 3: Korrelation myokardialer MIF-Expression mit Schweregrad der Fibrose in der nicht-ischämischen Kardiomyopathie. Die Abbildung stellt die Korrelation zwischen positiver myokardialer MIF-Expression und Schweregrad der Myokardfibrose dar. Die Ausprägung der Myokardfibrose ist unterteilt in keine/mild (87 Patienten, 8,0% MIF-positiv), moderat (123 Patienten, 30,9% MIF-positiv) und schwer (114 Patienten, 70,2% MIF-positiv), die MIF-Expression wird eingeteilt in positiv und negativ. [5] 36

Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Auftretens des primären Studienendpunkts Gesamtmortalität in Abhängigkeit zu positiver myokardialer MIF-Expression (LogRank 40.24, $p < 0,001$) im Nachverfolgungszeitraum [5] 40

Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Auftretens des kombinierten sekundären Studienendpunkts (Gesamtmortalität, Herztransplantation, herzinsuffizienzbedingte Rehospitalisierung, Verschlechterung der LV-Funktion während des Nachverfolgungszeitraums) in Abhängigkeit zu positiver bzw. negativer myokardialer MIF-Expression (LogRank 19.25, $p < 0,001$) [5] 41

Abbildung 6: Vorhersage der kardiovaskulären Sterblichkeit durch positive MIF-Expression im Myokard. Die ROC- (Receiver-Operator-Characteristic-) Kurve veranschaulicht den prognostischen Wert positiver MIF-Expression für die Mortalität von Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie; AUC – area under the curve [5, 74] 42

Abkürzungsverzeichnis

AHA	American Heart Association
ARB	Angiotensin-II-Rezeptorblocker
ARVC	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
BMI	Body-mass-index
BMP	knochenmorphogenetisches Protein
BNP	B-natriuretisches Peptid
CK	Kreatinkinase
CLP	coecal ligation and puncture / zökale Ligatur und Punktion
CMP	Kardiomyopathie
CMV	humanes Zytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
CRT	cardiac resynchronization therapy / kardiale Resynchronisationstherapie
CVB3	Coxsackie Virus B3
DCM	dilatative Kardiomyopathie
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EKG	Elektrokardiogramm
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer, CD147
ESC	europäische Gesellschaft für Kardiologie
EV	Enterovirus species
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HHV	humanes Herpes Virus
HI	Herzinsuffizienz
HI-Virus	humanes Immundefizienz-Virus
HNCM	hypertrophe nicht-obstruktive Kardiomyopathie
HOCM	hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
HSV	Herpes simplex Virus
ICD	implantierbarer Cardioverter-Defibrillator
LGE	late-gadolinium-enhancement
LVAD	left ventricular assist device / linksventrikuläres Unterstützungssystem
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVNC	Non-Compaction-Kardiomyopathie
MHC-II	major histocompatibility complex II
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MRA	Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NICM	nicht-ischämische Kardiomyopathie
NYHA	New York Heart Association
PAPsys	systolischer pulmonaler arterieller Druck
PVB19	Parvovirus B19

RCM	restriktive Kardiomyopathie
RVEDD	rechtsventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
SCD	plötzlicher Herztod
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
TnI	Troponin I
TTE	transthorakale Echokardiographie
VSMC	vascular smooth muscle cell / Zelle der glatten Gefäßmuskulatur
VT/NSVT	ventrikuläre Tachykardie/nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie
VZV	Varizella zoster Virus

1. Einleitung

1.1. Diagnostik, Therapie und Prognose der nicht-ischämischen Kardiomyopathie (NICM)

Die NICM umfasst eine Vielzahl unterschiedlichster erworbener und genetischer Herzmuskelerkrankungen und ist eine verbreitete Ursache für die Entstehung der Herzinsuffizienz (HI).[1, 2] Ihre klinische Symptomatik ist äußerst vielseitig und reicht von gänzlich asymptomatischen Patienten bis hin zu schweren Symptomen der HI. [3-5] Die NICM prädisponiert für den plötzlichen Herztod (SCD).[6] Im Jugend- und jungen Erwachsenenalter sowie insbesondere unter jungen Leistungssportlern stellen die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) und die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) als Entitäten der NICM eine der häufigsten Ursachen für SCD dar.[7]

Es gibt etablierte Parameter der HI wie eine eingeschränkte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)[8-10], ein fortgeschrittenes New-York-Heart-Association- (NYHA-)Stadium[11, 12], erhöhtes B-natriuretisches Peptid (BNP)[13, 14] und Troponin I (TnI) [14, 15], die mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert sind.[5]

Dennoch stellt die Identifikation von Hochrisikopatienten aus dem klinisch sehr heterogenen Patientenkollektiv die Medizin weiterhin vor eine große Herausforderung.[5]

Therapeutische Optionen bestehen in der medikamentösen Therapie mit Angiotensin-converting-enzyme-Hemmern (ACE-I) bzw. Angiotensin-II-Rezeptorblockern (ARB) und Betablockern (Klasse IA-Empfehlung bei symptomatischer Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF)) sowie Diuretika (Klasse IB-Empfehlung bei symptomatischer HFrEF mit Stauungszeichen) und Mineralokortikoidrezeptorblockern (MRA) (Klasse IA-Empfehlung bei symptomatischer HFrEF zusätzlich zu ACE-I und Betablockern).[16] Seit 2016 gibt es nach den ESC-Leitlinien zudem eine Klasse IB-Empfehlung für Angiotensin-Rezeptor/Neprilysin-Hemmer anstelle von ACE-I bei symptomatischer HFrEF unter optimaler Therapie mit ACE-I,

Betablocker und MRA.[16] Bei voranschreitender Erkrankung kann der Einsatz einer kardialen Resynchronisationstherapie (CRT) und linksventrikulärer Unterstützungssysteme (LVAD) notwendig werden, im Endstadium der Erkrankung sind Herztransplantationen oft die letzte Option.[3, 6, 16, 17] Aufgrund des erhöhten Risikos für den plötzlichen Herztod ist häufig eine ICD-Implantation indiziert[16]. Trotz zahlreicher diagnostischer und therapeutischer Fortschritte bleibt die Prognose der Erkrankung jedoch weiterhin schlecht. [5, 18]

1.1.1. ICD-Therapie in der nicht-ischämischen Kardiomyopathie

Bei symptomatischen Patienten mit ischämischer und nicht-ischämischer Kardiomyopathie und einer LVEF<35% ist bisher eine ICD-Implantation indiziert (Klasse IA-Empfehlung für ischämische Kardiomyopathie, Klasse IB-Empfehlung für NICM, ESC Leitlinie 2016).[16] Diese Empfehlung fußt auf Studienergebnissen, die insbesondere bei der ischämischen Kardiomyopathie einen prognostischen Nutzen durch eine ICD-Therapie nachweisen konnten.[19]

In der 2016 veröffentlichten DANISH-Studie wurde daher der Nutzen der ICD-Therapie in der NICM untersucht. Entgegen den bisherigen Studien, in welchen hauptsächlich Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie untersucht wurden, konnte bei der NICM durch eine ICD-Therapie zwar die Zahl der plötzlichen kardialen Todesfälle halbiert werden, ein signifikanter Überlebensvorteil konnte durch eine prophylaktische ICD-Implantation jedoch nicht nachgewiesen werden.[19]

Dennoch scheint die ICD-Therapie in bestimmten Situationen sinnvoll. So zeigten Subgruppenanalysen, dass insbesondere junge Patienten mit einem hohen Risiko für tödliche Herzrhythmusstörungen durchaus von einer prophylaktischen ICD-Implantation profitieren können. Für ältere und gebrechliche Patienten mit einer ohnehin niedrigeren Lebenserwartung scheint der Nutzen geringer, was dafür spricht, die Indikation zur ICD-Therapie in diesem Patientenkollektiv strenger zu stellen.[19]

Ein Vergleich der Studienergebnisse der DANISH-Studie mit vorangehenden Studien zur ICD-Therapie legt zudem nahe, dass eine leitliniengerechte medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz das Risiko für Herzrhythmusereignisse senkt.[19]

1.2. Definition und Klassifikation struktureller Herzerkrankungen

Der Begriff Kardiomyopathie (CMP) zur Beschreibung struktureller Herzerkrankungen fand erstmals Ende der 50er, Anfang der 60er Jahre Verwendung.[20-22] Mit dem wachsenden Verständnis für diese Erkrankung wurde er in den letzten 65 Jahren zahlreich neu definiert und überarbeitet.[6, 23, 24] 2006 definierte die American Heart Association (AHA) die CMP als heterogene Gruppe von Herzmuskelerkrankungen mit mechanischer und/oder elektrischer Dysfunktion, die meist (aber nicht immer) eine inadäquate ventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation aufweisen, bedingt durch eine Vielzahl unterschiedlicher, häufig genetischer Ursachen.[6] Hierbei wurden zwei Gruppen unterschieden: primäre CMP, die ausschließlich oder hauptsächlich den Herzmuskel betreffen, und sekundäre CMP, die eine Herzmuskelbeteiligung im Rahmen einer systemischen Erkrankung aufweisen.[6]

Dieses Definitions- und Klassifikationsschema wurde 2008 in einem Positionspapier von der European Society of Cardiology (ESC) überarbeitet (s.u.) mit dem Ziel, die klinische Anwendbarkeit zu verbessern und das Bewusstsein für die Bedeutung genetischer Ursachen der Erkrankung zu schärfen.[25] Dabei werden kongenitale, hypertoniebedingte, valvulärbedingte und ischämiebedingte Erkrankungen des Myokards aus der Begriffsdefinition der CMP ausgeschlossen und der NICM gegenübergestellt.[23] Die in dieser Dissertation vorgestellte Studie orientiert sich primär an dem Definitions- und Klassifikationsschema der ESC von 2008.[23]

1.2.1. Klassifikation der Kardiomyopathien nach der European Society of Cardiology (ESC)

In einem Positionspapier der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) wird die CMP als eine myokardiale Funktionsstörung mit einem strukturell und funktionell veränderten Herzmuskel definiert in Abwesenheit einer koronaren Herzkrankheit, Hypertonie, Klappenvitien und kongenitaler Herzerkrankung, die ausreichend wäre, die myokardiale Funktionsstörung zu erklären.[23] Die von der ESC 2008 empfohlene Klassifikation orientiert sich zunächst an klinischen Gesichtspunkten wie Morphologie und Funktion des Herzmuskels und unterscheidet fünf Formen: die hypertrophe Kardiomyopathie/HCM, die dilatative Kardiomyopathie/DCM, die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/ARVC, die restriktive Kardiomyopathie/RCM und die nicht-klassifizierte Kardiomyopathie. Nach dieser morphologisch/funktionellen Einteilung folgt die Unterscheidung zwischen familiärer/genetischer CMP und nicht-familiärer/nicht-genetischer CMP. Bei der familiär genetischen Form tritt bei mindestens einem weiteren Familienmitglied eine CMP mit dem gleichen Phänotyp auf oder einem anderen Phänotyp, der durch den gleichen genetischen Defekt erklärt werden kann. Den meisten familiären CMP liegt eine monogenetische Ursache, d.h. ein einzelner Gendefekt zugrunde. Monogenetische CMP können sporadisch durch Neumutationen und somit zum ersten Mal in einer Familie auftreten. Obwohl hier keine weiteren Familienmitglieder betroffen sind, werden diese Fälle ebenfalls zu der familiären Form gezählt, da sie weitervererbt werden können.

Die nicht familiäre Form wird klinisch definiert als CMP in Abwesenheit der gleichen Erkrankung in der Familie. Sie wird weiter unterteilt in eine idiopathische Form mit unbekannter Ursache und eine erworbene Form. Spezifische Erkrankungs-Subtypen der CMP, beispielsweise die Tako-Tsubo-Kardiomyopathie oder die CMP i.R. von Speichererkrankungen können diesem Klassifikationssystem untergeordnet werden.[23]

Dieses Klassifikationssystem bedeutet eine Abkehr von der bisherigen Unterscheidung zwischen CMP und spezifischen Herzmuskelerkrankungen mit Ausnahme der definitionsgemäß ausgeschlossenen CMP durch Hypertonie,

koronare Herzkrankheit, Klappenvitien und angeborene Herzfehler. Dies soll den Umgang mit dem komplexen Krankheitsbild in der täglichen Klinik erleichtern und das Bewusstsein für eine mögliche genetische Genese der Erkrankung schärfen.[23]

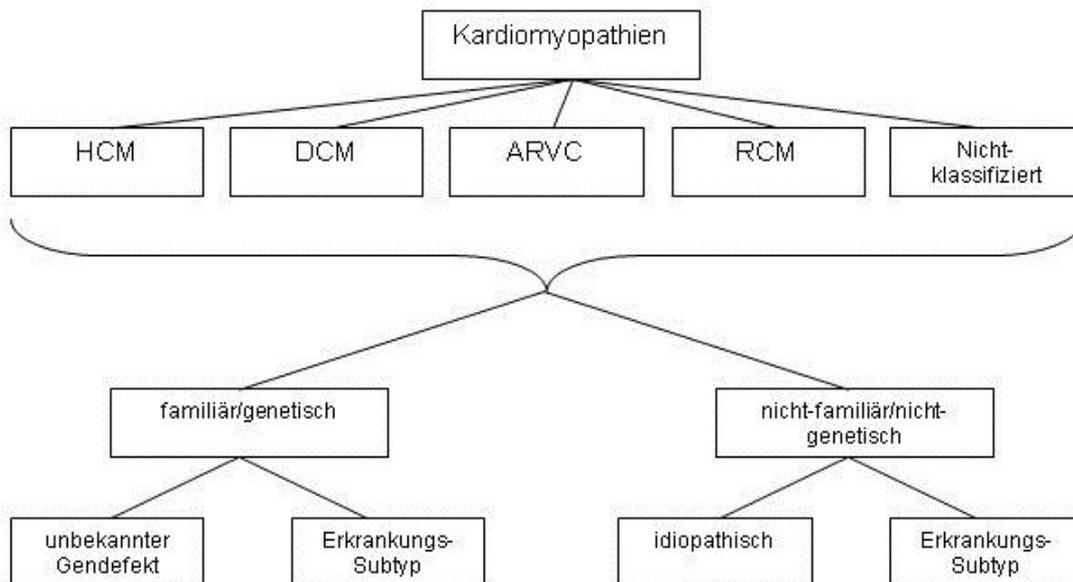


Abbildung 1: Zusammenfassung des empfohlenen Klassifikationssystems der CMP durch die ESC von 2008
 HCM, hypertrophe Kardiomyopathie; DCM, dilatative Kardiomyopathie, ARVC, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, RCM, restriktive Kardiomyopathie[23]

In vielen Fällen ist eine eindeutige Zuordnung der Erkrankung in eine der fünf Gruppen aus folgenden Gründen nicht möglich: der gleiche Phänotyp einer CMP kann durch unterschiedliche Genmutationen bedingt sein, ebenso kann die gleiche Genmutation zu phänotypisch unterschiedlichen CMP führen. Zudem können sich während eines Krankheitsverlaufs Funktion und Morphologie des Herzmuskels ändern. Spezifische Herzmuskelerkrankungen werden daher teilweise in mehreren Untergruppen aufgeführt.[23]

1.2.2. Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Die HCM ist eine weit verbreitete genetisch bedingte Erkrankung und betrifft Patienten aller Altersklassen vom Kindes- bis ins späte Erwachsenenalter. Sie ist eine der häufigsten Gründe für den Herztod im Jugend- und jungen

Erwachsenenalter. Die Mortalitätsrate liegt bei ca. 0,5%, die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung liegt bei ca. 1:500. Definitionsgemäß liegt eine erhöhte linksventrikuläre Wanddicke oder Wandmasse vor in Abwesenheit von kardialen Belastungszuständen wie Hypertonie, Klappenvitien oder Speichererkrankungen, die ausreichend wären, die Myokardhypertrophie zu erklären. Die Myokardhypertrophie kann den linken Ventrikel und/oder das Septum und/oder den Papillarmuskel betreffen. Das Ausmaß der linksventrikulären Wanddicke reicht dabei von mild (13-15mm) bis massiv (\geq 30mm). Die linksventrikuläre Hypertrophie ist in der Regel asymmetrisch und betrifft in vielen Fällen den Herzmuskel im Bereich des Übergangs von Vorderwand zu anteriorem Septum.[26] Man unterscheidet die HCM mit linksventrikulärer Ausflusstraktobstruktion (HOCM) und die HCM ohne linksventrikuläre Ausflusstraktobstruktion (HNCM). Die HCM wird autosomal dominant vererbt und ist bedingt durch eine genetische Störung der Sarkomere. Dabei treten verschiedene Genmutationen auf, welche die kontraktile, strukturellen und regulatorischen Funktionen der Myofilamente beeinträchtigen. Dies führt zu einer Hypertrophie und zunehmenden Versteifung des linken Ventrikels mit Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion. Der hieraus resultierende erhöhte enddiastolische Füllungsdruck führt im Verlauf zu einer systolischen Dysfunktion. Die einzelnen molekularen Gendefekte, welche die Störung der Sarkomere bedingen, unterscheiden sich zwischen nicht verwandten Individuen.[26] Nach dem Klassifikationsschema der ESC werden unter der Gruppe der HCM noch weitere hereditäre Erkrankungen zusammengefasst, die nicht auf einer Sarkomerstörung beruhen, aber dennoch einen hypertrophen Phänotyp aufweisen (z.B. Morbus Fabry).[25] Die klinische Diagnose der HCM erfolgt am einfachsten mittels Darstellung des hypertrophierten, aber nicht dilatierten linken Ventrikels in zweidimensionaler Echokardiographie. Bei 75-95% der Patienten finden sich Veränderungen im 12-Kanal-EKG. [27] Die Kardio-Magnetresonanztomographie hat einen steigenden Stellenwert in der Beurteilung der HCM, da hiermit eine exakte Darstellung der Herzanatomie gelingt. Zudem erlauben Untersuchungen mittels late-gadolinium-enhancement (LGE) eine genaue Abbildung fibrosierten

Herzmuskelgewebes. Ca. 60% der Patienten mit HCM und linksventrikulärer Hypertrophie zeigen ein late-gadolinium-enhancement (LGE). [28]

Das histologische Bild der HCM ist gekennzeichnet durch eine gestörte Zellarchitektur mit unförmigen hypertrophierten Kardiomyozyten. Die Gefäßstruktur weist vermehrte intimale und mediale Kollagenanreicherungen auf, welche zu einer Verengung der Mikrogefäße im Sinne einer small vessel disease führen. Gefäßveränderungen sowie das Ungleichgewicht zwischen Herzmuskelmasse und myokardialer Durchblutungskapazität prädisponieren für das Eintreten myokardialer Ischämien und den konsekutiven narbigen Umbau des Herzmuskelgewebes.

Die gestörte Zellarchitektur, der narbengewebige Umbau des Herzmuskelgewebes und die Anreicherung des interstitiellen Kollagens führen zu elektrischer Instabilität und erhöhen das Risiko für lebensgefährliche Herzrhythmusstörungen wie ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern und den SCD.[27]

Klinisch besteht daher bei einer Häufung plötzlicher Todesfälle in der Familie, einer ungeklärten Synkope, einer abnormen Blutdruckregulation bei Belastung (RR-Anstieg $< 20\text{mmHg}$), multiplen oder langen nicht anhaltenden ventrikulären Tachykardien (nsVT) und einer Septumdicke $> 30\text{mm}$ eine Klasse IIa-Empfehlung für die primärprophylaktische Implantation eines ICD.[29] Ein ausgeprägtes LGE $>15\%$ ist ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für SCD assoziiert und unterstützt in komplexen Fällen die Entscheidungsfindung über eine ICD-Implantation.[26]

1.2.3. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die DCM ist hauptsächlich charakterisiert durch eine linksventrikuläre Dysfunktion in Form einer Kontraktilitätseinschränkung assoziiert mit gesteigerter Herzmasse und -volumen. Eine diastolische Dysfunktion kann begleitend bestehen. Eine rechtsventrikuläre Dilatation und Dysfunktion kann sich entwickeln, ist für die Diagnosestellung aber nicht zwingend erforderlich. Die DCM ist die am weitesten verbreitete Kardiomyopathie weltweit. Ihre

Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung beträgt 1:2500, die Inzidenz 7/100000.[6] Die Erkrankung kann in jedem Alter unabhängig von Geschlecht und Ethnie auftreten. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. In 30-48% der Fälle liegt der DCM eine genetische, meist autosomal-dominant vererbte Veränderung des Zytoskeletts und der Sarkomer-Proteine zugrunde. Eine Myokardschädigung und konsekutive DCM kann jedoch auch toxisch bedingt sein, z.B. durch Alkohol- und Drogenabusus, aber auch durch unerwünschte Medikamentenwirkungen (z.B. Anthrazykline).[17] Insbesondere der Alkoholabusus ist einer der häufigsten Gründe für die DCM im Erwachsenenalter. Hier liegt die 4-Jahres-Sterblichkeit bei fortgesetztem Alkoholkonsum nach Erstdiagnose bei fast 50%.[30] Virale Infektionen (z.B. Coxsackievirus, Adenovirus, Parvovirus B19 etc.) sind eine häufige Ursache der erworbenen DCM, seltener bakterielle, parasitäre und Pilzinfektionen sowie Infektionen durch Rickettsien oder Spirochäten. Systemische Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen (Lupus erythematoses etc.), Speichererkrankungen (Hämochromatose etc.), neuromuskuläre Erkrankungen (Muskeldystrophie Duchenne-Becker etc.) oder metabolische/endokrine Störungen (Diabetes mellitus etc.) können ebenfalls das Herz betreffen und eine DCM bedingen. Mikroskopisch zeigt sich eine hohe Varianz der Myozytengröße mit interstitieller und perivaskulärer Fibrose, teilweise finden sich nekrotische oder inflammatorisch infiltrierte Areale. Durch komplexe Remodelling-Vorgänge des Myokards kommt es zu einer Veränderung und Schwächung der Muskelfaserstruktur. Hieraus resultiert eine makroskopische Vergrößerung und Ausdehnung der Herzkammern, insbesondere des druckbelasteten linken Ventrikels, teils mit Entwicklung einer Mitralklappeninsuffizienz. Aufgrund des veränderten Blutflusses führt dies in manchen Fällen zur Ausbildung von Thromben in der Spitze des linken Ventrikels mit erhöhtem Risiko für Thrombembolien und Schlaganfälle. Generell besteht ein erhöhtes Risiko für Herzrhythmusstörungen wie supraventrikuläre und ventrikuläre Tachykardien, AV-Blockierungen sowie für Synkopen und den SCD. Echokardiographisch zeigt sich eine Dilatation und eine systolische Dysfunktion des linken Ventrikels. Bei dekompensierter Herzinsuffizienz stellt sich das Herz röntgenologisch

deutlich vergrößert dar, teils mit insuffizienzbedingter pulmonalvenöser Stauung und Ausbildung eines Lungenödems. Typische elektrokardiographische Veränderungen sind eine Sinustachykardie sowie ST-Strecken- und T-Wellen-Veränderungen. Ein Perikarderguss findet sich häufig bei entzündlicher Genese der DCM, z.B. im Rahmen einer Myokarditis. Die Endomyokardbiopsie ist ein wichtiges diagnostisches Mittel zur weiteren Abklärung einer DCM und hat in vielen Fällen nicht nur diagnostische, sondern auch therapeutische und prognostische Relevanz. Durch Magnetresonanztomographie kann das Herz strukturell und funktionell beurteilt werden. Symptome der Herzinsuffizienz variieren stark und reichen von Unwohlsein bis zu Symptomen der akuten Herzinsuffizienz. Im Falle einer rechtsventrikulären Beteiligung entwickeln sich klinische Zeichen und Symptome der Rechtsherzinsuffizienz wie Aszites, periphere Ödembildung und Hepatomegalie.

Die Therapie der DCM besteht hauptsächlich aus der medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienzsymptome und der Prävention eines Krankheitsprogresses sowie von Komplikationen wie Endorganschäden, Schlaganfällen und lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen. In fortgeschrittenen Stadien kommen hier LVAD und CRT sowie ICD zur Prävention des SCD zum Einsatz, in äußerst schweren Fällen werden auch Herztransplantationen durchgeführt.[17]

1.2.4. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC/D)

Die ARVC/D ist eine hereditäre Herzmuskelerkrankung, die entsprechend ihrer Bezeichnung hauptsächlich den rechten Ventrikel betrifft, eine Mitbeteiligung des linken Ventrikels jedoch nicht ausschließt. Pathophysiologisch liegen der Erkrankung unterschiedliche Genveränderungen von Adhäsionsproteinen zugrunde, welche zu einer Funktionsstörung der Desmosomen führen.[31] Das Herzmuskelgewebe ist histologisch gekennzeichnet durch Atrophie des rechtsventrikulären Myokards mit fibrösem und fettgewebigem Umbau. Betroffen sind meist der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt, die Herzspitze und die

subtrikuspidale Region der freien rechtsventrikulären Wand, das sog. „Dreieck der Dysplasie“[32]. Dies führt klinisch zu einer elektrischen Instabilität des rechten Ventrikels mit einem erhöhten Risiko für ventrikuläre Tachykardien, Kammerflimmern und SCD. Die Erkrankung wird in den meisten Fällen autosomal dominant vererbt, jedoch mit inkompletter Penetranz und variabler Expression. Daher ist die genaue Prävalenz der Erkrankung nicht bekannt. Sie wird in den USA auf 1:5000 geschätzt. Die ARVC/D tritt bei Männern ca. dreimal häufiger auf als bei Frauen. Insbesondere die Gruppe der Leistungssportler ist häufig betroffen. In mehr als 50% der Fälle kann bei Vorliegen einer ARVC/D eine familiäre Vorbelastung nachgewiesen werden.

Erste klinische Symptome wie Herzrhythmusstörungen treten meist im Jugend- und jungen Erwachsenenalter auf. In einem späten Stadium der Erkrankung kann der pathologische Gewebsumbau des rechten Ventrikels unter Mitbeteiligung des linken Ventrikels zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz führen. [33]

Eine Kombination verschiedener Haupt- (major-) und Neben-(minor-) Kriterien führt zur Diagnosestellung einer ARVC/D. Beurteilt werden globale und regionale Dysfunktion und strukturelle Veränderungen des Herzmuskels, die Gewebestruktur, elektrokardiographische Veränderungen, Arrhythmien und die Familienanamnese. Therapeutischen Optionen bestehen hauptsächlich in der Behandlung/Prävention ventrikulärer Tachykardien und des SCD mittels medikamentöser Therapie, Katheterablation und Implantation eines ICDs.[34]

1.2.5. Restriktive Kardiomyopathie (RCM)

Die RCM ist im Vergleich zur HCM oder DCM wenig verbreitet. Sie ist charakterisiert durch eine Versteifung der Herzkammern mit Vorliegen einer vorwiegend diastolischen und meist auch systolischen Funktionseinschränkung eines oder beider Ventrikel bei normaler ventrikulärer Wanddicke.[23] Aufgrund der Versteifung des Myokards kommt es bereits bei geringer Volumenbelastung zu einem starken Anstieg der intraventrikulären Füllungsdrücke, während sich die Vorhöfe sukzessive erweitern. Je nach betroffenem Ventrikel treten

Symptome der Rechts- bzw. Linksherzinsuffizienz auf.[35] Pathologische Veränderungen des Endomyokards können ebenfalls zu einer Restriktion und diastolischen Funktionseinschränkung führen. Man unterscheidet hier endomyokardiale Erkrankungen mit Hypereosinophilie (z.B. Löfflerendokarditis) und ohne Eosinophilie (z.B. Endomyokardfibrose). Die RCM tritt idiopathisch, familiär oder im Rahmen verschiedener systemischer Erkrankungen auf wie Amyloidose, Sarkoidose, Karzinoid-Herzerkrankung (bekannt als Hedinger-Syndrom), Sklerodermie, Haemochromatose, Morbus Fabry oder als Nebenwirkung von Anthrazyklin-Therapien. Zudem wird sie häufig in Endstadien von HCM und DCM diagnostiziert. Die familiäre Form wird meist autosomal dominant vererbt. Hier konnte ein Zusammenhang mit Genmutationen für Troponin-I und Desmin gezeigt werden. In selteneren Fällen wird die RCM autosomal rezessiv oder X-chromosomal vererbt.[23] Die Prognose der RCM ist schlecht. Therapieoptionen bestehen in der symptomatischen medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz, der spezifischen Therapie der ursächlichen systemischen Grunderkrankung sowie der Herztransplantation.[36]

1.2.6. Nicht-klassifizierte Kardiomyopathien

Die nicht-klassifizierten CMP umfassen seltene CMP, die sich nicht einer der anderen vier Gruppen unterordnen lassen. Hierzu zählen die Fibroelastose, die systolische Dysfunktion mit minimaler Dilatation, mitochondriale Erkrankungen, die Noncompaction-Kardiomyopathie (LVNC) sowie die Tako-Tsubo-Kardiomyopathie.[37] Die LVNC ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Trabekularisierung vornehmlich des linksventrikulären Myokards mit tiefen intertrabekulären Einkerbungen. Ein Arrest in der embryonalen Entwicklung verhindert eine schrittweise Verdichtung des Myokards zwischen der 5. und 8. Schwangerschaftswoche. Diese Entwicklungsstörung ist häufig assoziiert mit anderen kongenitalen Störungen wie einer Obstruktion des rechts- oder linksventrikulären Ausflusstrakts, einem zyanotischen Herzfehler oder Unregelmäßigkeiten der Koronargefäße, die die physiologische Verdichtung des

Myokards verhindern.[38] Tritt die Erkrankung in Abwesenheit anderer kardialer Störungen auf, spricht man von einer isolierten Noncompaction-Kardiomyopathie.[39] Die myokardiale Entwicklungsstörung führt zu Symptomen der HI, Arrhythmien und thrombembolischen Ereignissen, ist jedoch in manchen Fällen auch asymptomatisch. Die genaue Prävalenz in der Bevölkerung ist nicht bekannt.[23]

Die Takotsubo- oder „Stress“-Kardiomyopathie ist gekennzeichnet durch eine vorübergehende regionale systolische Funktionsstörung der linksventrikulären Herzspitze und/oder des mittleren linken Ventrikels in Abwesenheit einer koronaren Herzerkrankung. Klinisch präsentiert sich die Erkrankung ähnlich einem akuten Myokardinfarkt mit plötzlich eintretenden pectanginösen Beschwerden nach einer starken emotionalen oder körperlichen Belastungssituation. Mitunter findet man ST-Strecken-Hebungen über der Vorderwand im Elektrokardiogramm und einen leichten Anstieg der Herzenzyme. Echokardiographisch stellt sich das klassische Bild des „apical ballooning“ dar mit hypokontraktile Herzspitze und hyperkontraktile Herzbasis. Die linksventrikuläre Funktion normalisiert sich in den meisten Fällen innerhalb von Tagen bis Wochen, ein Rezidiv ist selten.[23, 40]

1.3. Biomarker struktureller Herzerkrankungen

1.3.1. Gremlin-1

Grem1 ist ein Antagonist knochenmorphogenetischer Proteine (BMP) und gehört zu der Familie der DAN- und Cerberus-Proteine. Es ist an chronischen inflammatorischen Erkrankungen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei fibrotischem Gewebeumbau verschiedener Organe, z.B. der Nieren und der Lunge. In Endomyokardbiopsien korreliert die Expression von Grem1 mit dem Grad der myokardialen Fibrosierung und linksventrikulärer Dysfunktion. Es ist ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechtes klinisches Outcome.[41]

1.3.2. MHC-II, CD3, CD68

MHC-II (major histocompatibility complex II) ist ein heterodimeres integrales Membran-Glykoprotein. Seine primäre Funktion besteht in der Regulation der Immunantwort über die Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen.[42] MHC-II wird von Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Bei inflammatorischen Herzerkrankungen konnte immunhistochemisch eine verstärkte Anreicherung an MHC-II-Molekülen nachgewiesen werden.[43]

CD3 ist ein multimeres membrangebundenes Glykoprotein aus der Gruppe der CD-Moleküle (Cluster of Differentiation). Es ist bis auf wenige Ausnahmen spezifisch für T-Zellen und daher als immunhistochemischer T-Zell-Marker etabliert.[44]

Das Glykoprotein CD68 gehört ebenfalls zu der Gruppe der CD-Moleküle. Es wird in hohem Maß von Makrophagen und anderen mononukleären Phagozyten exprimiert. Daher dient es als immunhistochemischer Marker von Monozyten und Makrophagen in entzündlichem und tumorösem Gewebe.[45]

MHC-II, CD3 und CD68 spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen im Herzmuskelgewebe. Im Mausmodell mit CVB3- (Coxsackievirus B3-) induzierter Myokarditis konnte eine deutliche Korrelation in der Expression der kardialen Inflammationsmarker MHC-II, CD3, CD68 und Cyclophilin A nachgewiesen werden. [46]

1.4. Macrophage migration inhibitory factor

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) wurde erstmals vor über 50 Jahren als Produkt aktivierter T-Lymphozyten beschrieben, das die ungezielte Migration von Makrophagen hemmt. Es gehört damit zu den am längsten bekannten Zytokinen. [47, 48] Seine Proteinstruktur besteht aus drei identischen Polypeptiden und hat eine Masse von 12,5 kDa. Trotz seiner zentralen Bedeutung in vielen entzündlichen Prozessen als inflammatorisches Zytokin gleicht seine dreidimensionale Struktur keiner der bekannten Zytokine.[49]

MIF spielt eine wichtige Rolle sowohl in der spezifischen, als auch in der unspezifischen Immunabwehr. [5, 50] Als chemotaktisches Zytokin interagiert es als nicht verwandter Ligand mit CXCR2, CXCR4, CXCR7 und CD74 und dient somit als Mediator in zahlreichen akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen, die zu fibrotischem Gewebeumbau führen.[5, 51-53]

MIF hat eine wichtige proinflammatorische Funktion in der Pathogenese grampositiver und gramnegativer bakterieller Infektionen und ist ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese des septischen Schocks.[54] Es fördert die Erkennung gramnegativer Bakterien über vermehrte Expression von toll-like-rezeptor-4 (TLR4) in Makrophagen.[55] Im Mausmodell steigerte die Koinjektion von hohen Dosen an rekombinantem MIF mit Lipopolysacchariden oder E.coli die Letalität der septischen Peritonitis. Umgekehrt schützten anti-MIF-Antikörper TNF α -Knockout-Mäuse vor letaler Peritonitis induziert durch CLP (Abbinden und Durchstechen des Zoekums). [56]

MIF wird u.a. von Zellen des Hypophysenvorderlappens exprimiert und spielt eine wichtige Rolle im neuroendokrinen System.[54] Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes MIF den immunsuppressiven Effekten von Glukokortikoiden entgegenwirkt und eine Regulierungsfunktion in der Immun- und Entzündungsantwort einnimmt.[57, 58]

Von zentraler Bedeutung ist das inflammatorische Zytokin MIF zudem in der Atherogenese und Entstehung und Destabilisierung von Gefäßplaques. Es induziert die Migration der Monozyten und ihre Differenzierung in Makrophagen.[5, 59, 60] Im Hasenmodell wurde MIF von Endothelzellen und Makrophagen während der Atherogenese exprimiert. Eine Hochregulierung von MIF war hier mit Adhäsion, Akkumulation und Schaumzellbildung von Makrophagen assoziiert.[61] Kong und Yu et al. zeigten 2005, dass MIF sowohl in Makrophagen also auch in VSMC (Myozyten der vaskulären glatten Muskulatur) vulnerabler atheromatöser Plaques deutlich hochreguliert ist, und eine Assoziation zwischen MIF und der Entstehung extensiver Gefäßläsionen besteht.[62] Im Mausmodell von Apolipoprotein-E-negativen Mäusen verringerte die Blockade oder genetische Deletion von MIF die Konzentration

an Makrophagen und T-Zellen in den atherosklerotischen Plaques und bremste so das Voranschreiten der Atherosklerose.[60, 63] Mueller et al. konnten zudem zeigen, dass die Bindung von MIF durch den endogenen Antagonisten Gremlin-1 die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen hemmt und die Sekretion von TNF- α durch Makrophagen verringert.[60].

Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist die MIF-Konzentration im Plasma erhöht und assoziiert mit etablierten Entzündungsmarkern wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und Interleukin-6 (IL-6). Nach perkutaner Intervention korreliert MIF mit der Freisetzung kardialer Nekrosemarker. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom aufgrund einer Plaqueruptur eine signifikant höhere Plasmakonzentration von MIF aufweisen als Patienten mit flusslimitierenden stenosierenden Läsionen.[64] Andererseits konnte in mehreren Studien eine kardioprotektive Wirkungsweise von MIF in Vorgängen der Myokardischämie und bei Reperfusionsschäden nachgewiesen werden. Dies weist auf seine komplexe Funktionsweise hinsichtlich der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen hin.[65-68]

Durch eine genetische Deletion oder die Neutralisation von MIF konnten bereits entzündliche und Autoimmunerkrankungen im Mausmodell gelindert werden.[56] [69] Daher sind Anti-MIF-Therapien von zunehmendem klinischen Interesse und Gegenstand der derzeitigen Forschung. [70-73]

1.5. Hypothese

Die NICM ist eine häufige Ursache der HI.[1, 2] Ihre Symptome sind vielseitig und reichen von asymptomatischen Fällen bis hin zu Symptomen der schweren HI und dem SCD.[3, 4] Die Identifikation von Patienten mit einem hohen Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf und/oder SCD stellt die Medizin bis heute vor eine große Herausforderung.[5, 74]

In der nicht-ischämisch bedingten HI ist daher die Etablierung neuer Biomarker notwendig, um Patienten mit einem hohen Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf zu identifizieren und diese einer intensivierten Therapie und

Überwachung zuzuführen. Dabei sind neben anderen diagnostischen Methoden neue histopathologische und immunhistochemische Verfahren von zentralem Interesse.[5]

In der Entstehung myokardialer Läsionen spielen Zytokine und Chemokine eine wichtige Rolle. Sie rekrutieren inflammatorische Zellen am Ort der myokardialen Läsion und erhalten Entzündungsprozesse aufrecht.[75] Damit eignen sie sich als potentielle Kandidaten für neue Biomarker.[5, 74]

MIF ist ein inflammatorisches Zytokin. Es ist von großer Bedeutung in zahlreichen akuten und chronischen entzündlichen Prozessen, die mit fibrotischem Gewebeumbau einhergehen[5, 53]. In der Atherosklerose kann die Bindung von MIF durch den endogenen Antagonisten Gremlin-1 ein Voranschreiten entzündlicher Gefäßveränderungen abdämpfen.[60] Die Bedeutung von MIF in der NICM wurde bisher nicht untersucht.[5]

Unsere Hypothese war, dass MIF auch bei der durch inflammatorische und nicht-inflammatorische CMP bedingten Herzinsuffizienz eine zentrale Rolle spielt und sich möglicherweise als neuer Biomarker in der NICM eignet. Daher untersuchten wir die myokardiale Expression von MIF bei inflammatorischer und nicht-inflammatorischer CMP bezüglich seiner diagnostischen und prognostischen Bedeutung an einem fortlaufenden Patientenkollektiv mit nicht-ischämisch bedingter HI.[5]

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Antikörper

Primärantikörper

Antigen	Art	Wirt	Spezifität	Hersteller
CD3	mono-klonaler Antikörper	Maus	Mensch	Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, Großbritannien
CD68	mono-klonaler Antikörper	Maus	Mensch	Dako, Glostrup, Dänemark
HLA-DR- α	mono-klonaler Antikörper	Maus	Mensch	Dako, Hamburg, Deutschland
MIF	polyklonaler Antikörper	Ziege	Mensch, Maus, Ratte	R&D-Systems, Minneapolis, USA
Isotypenkontrolle	polyklonaler Antikörper	Ziege		Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotinylierte Sekundärantikörper	polyklonaler Antikörper	Hase	Ziege	Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.2. Kits

Vectastain Elite ABC Kit

Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien

2.1.3. Reagenzien

RNA-later

Ambion Inc, Foster City, Kalifornien

2.1.4. Klinikausstattung

Transthorakale Echokardiographie	iE33, Philips Medical Systems
Magnetresonanztomographie	1,5 Tesla Magnetresonanztomograph, Siemens Medical Systems
Bioptom	Cordis Corporation, Waterloo, Belgien

2.1.5. Software

ARGUS Function	Siemens Medical Systems, Deutschland
SPSS, Version 22.0	SPSS Inc., Chicago, USA

2.2. Studiendesign, Patientenkollektiv und Erhebung der klinischen Risikofaktoren

In die prospektive Studie wurden 324 Patienten mit NICM und global oder regional eingeschränkter systolischer linksventrikulärer Funktion (LVEF \leq 55%) eingeschlossen, die im Rahmen der klinischen Routineuntersuchungen zwischen August 2007 und November 2011 in der Universitätsklinik Tübingen endomyokardbiopsiert wurden.[5] Alle Patienten wurden aufgrund einer eingeschränkten LVEF \leq 55% und/oder klinischen Symptomen der HI stationär aufgenommen. Dabei bestand entweder Belastungsdyspnoe NYHA \geq 2 und/oder ein erhöhter TnI-Wert ($>$ 0,03 μ g/l) und/oder ein erhöhter BNP-Wert ($>$ 100 ng/l) und/oder Herzrhythmusstörungen mit rezidivierenden Palpitationen mit Präsynkope oder Synkope und dokumentierten anhaltenden oder nicht anhaltenden ventrikulären Tachykardien. Die Indikation für eine Endomyokardbiopsie ergab sich entweder aus den o.g. klinischen Kriterien oder aufgrund folgender klinischer Indikation: Neuauftreten einer HI für eine Dauer von mindestens zwei Wochen mit Dilatation des linken Ventrikels und hämodynamischer Einschränkung, Neuauftreten einer HI für eine Dauer von bis zu 3 Monaten mit Dilatation des linken Ventrikels und Auftreten von malignen Herzrhythmusstörungen oder Nichtansprechen auf die übliche Therapie oder

bei V.a. eine systemische Erkrankung mit Herzbeteiligung, global oder regional eingeschränkter links- oder rechtsventrikulärer Pumpfunktion, Vergrößerung des linken oder rechten Ventrikels, Vorhandensein eines Perikardergusses, Myokardhypertrophie oder pathologischer Echostruktur in der transthorakalen Echokardiographie (TTE).[76]

Die CMP wurden nach den Kriterien des Expertengremiums der AHA[6] und der ESC[23, 76] eingeteilt.[5] Zur Gruppe der inflammatorischen CMP wurden die akute und chronische Myokarditis und die Borderline-Myokarditis gezählt. In der Gruppe der nicht-inflammatorischen CMP wurden die DCM, die HCM/HOCM, die ARVC und die kardiale Amyloidose zusammengefasst.

Bei der Erhebung der klinischen Risikofaktoren bei Studieneinschluss wurden Alter, Geschlecht, body mass index (BMI), NYHA-Klasse und die Hausmedikation berücksichtigt. Die Laborwerte TnI (Normwert < 0,03 µg/l), BNP (Normwert < 100 ng/l), Kreatinkinase (CK) (Normwert < 190 U/l) und C-reaktives Protein (CRP) (Normwert < 0,5 mg/dl) wurden bei Aufnahme bestimmt.

Echokardiographisch wurden die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD), die rechtsventrikuläre Funktion (RVEF), der rechtsventrikuläre enddiastolische Durchmesser (RVEDD) und der systolische pulmonalarterielle Druck (PAPsys) untersucht.

Die LVEF wurde echokardiographisch (iE33, Philips Medical Systems) mittels modifizierter Simpson-Methode aus apikalem Vier- und Zweikammerblick bestimmt. Die RVEF wurde schätzungsweise durch einen erfahrenen Untersucher bestimmt mittels Analyse der Exkursion des Trikuspidalklappenrings in der Systole (TAPSE). Eine TAPSE < 20mm wurde als rechtsventrikuläre Dysfunktion definiert. [77, 78]

Die Bestimmung von LVEDD und RVEDD erfolgte mittels zweidimensionaler M-Mode-Echokardiographie. Der systolische pulmonalarterielle Druck (PAPsys) wurde aus der Summe des transtrikuspidalen Druckgradienten (Bestimmung mittels CW-Doppler) und geschätztem rechtsatrialen Druck errechnet. Zur Abschätzung des rechtsatrialen Drucks untersuchten wir die atemmodulierte Größenveränderung der V. cava inferior in Inspiration. Bei komplettem Kollaps

der Vene wurde der atriale Druck auf 5mmHg geschätzt, bei teilweisem Kollaps auf 10mmHg, bei fehlender Atemmodulation auf 15 mmHg.[79]

Eine signifikante koronare Herzkrankheit (>50%ige Gefäßstenose in mindestens zwei Herzkranzgefäßen oder >50%ige Gefäßstenose des Hauptstamms der linken Kranzarterie oder des proximalen Ramus interventricularis anterior (RIVA)) wurde bei allen Patienten koronarangiographisch ausgeschlossen.[5]

Die medikamentöse Therapie der Patienten erfolgte nach den aktuellen Richtlinien der ESC und ACC/AHA abhängig von der linksventrikulären Funktion und den Herzinusffizienzsymptomen. [80]

Die Studie entspricht den Prinzipien der Deklaration von Helsinki und wurde vom lokalen Ethikkomitee der Eberhard-Karls-Universität Tübingen genehmigt. (Deutschland, Projektnummer 253/2009BO2). Es liegt von allen Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung vor.[5]

2.3. Studienpunkte und Follow-up

280 der 324 Patienten erschienen alle 6 bis 9 Monate zur Verlaufskontrolle in unserer Ambulanz. Die übrigen 44 Patienten, die nicht zur Verlaufskontrolle erschienen, wurden während des Nachverfolgungszeitraums insgesamt dreimal telefonisch kontaktiert und das Auftreten der Studienendpunkte, die aktuelle Medikation und die klinischen Symptome der Herzinsuffizienz erfragt. Alle Patienten konnten nachverfolgt werden.

Die Gesamtmortalität wurde als primärer Studienendpunkt definiert. Der kombinierte sekundäre Endpunkt setzte sich zusammen aus Tod, Herztransplantation, herzinsuffizienzbedingter Rehospitalisierung und Verschlechterung der LVEF über einen Beobachtungszeitraum von 3 Jahren (bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 27,5 Monaten).[5] Zur Bestätigung des Auftretens eines klinischen Endpunkts wurden alle klinischen Ereignisse durch ein unabhängiges Endpunktkomitee überprüft. Die für eine erneute stationäre Aufnahme verantwortlichen Ärzte waren nicht an der Studie beteiligt.

2.4. Endomyokardbiopsie

Bei allen Patienten wurden mindestens 6 Biopsien mit einem jeweiligen Durchmesser von 1-3mm aus dem Septum des rechten Ventrikels entnommen.[5] Hierfür wurde eine Biopom (Biopsy Forceps, Cordis Corporation) verwendet, das über eine venöse 9F-Schleuse eingeführt wurde.[81] Die Proben wurden unmittelbar nach Entnahme unter sterilen Bedingungen mittels 4% gepuffertem Formaldehyd fixiert für darauffolgende Hämatoxylin/Eosin (HE) -Färbung, Masson's Trichrom-Färbung, Giemsa-Färbung sowie für die weitere Immunhistochemie. Von den Biopsaten wurden 4µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und lichtmikroskopisch untersucht.[82] Weitere Proben wurden in RNAlater® (Ambion Inc., Foster City, Kalifornien) für PCR-Untersuchungen von Virus-DNA fixiert (Parvovirus B19 (PVB19), Humanes Herpes Virus Typ 6,7 und 8 (HHV 6,7,8), Herpes Simplex Virus (HSV), Enterovirus species (EV), Adenoviren, Influenza A und B, humanes Zytomegalie Virus (CMV), Coxsackie Virus B3 (CVB3) Varizella zoster Virus (VZV) und Epstein-Barr-Virus (EBV)).[76, 83]

2.5. Histopathologische Analyse und Immunhistochemie

Für die histopathologische Analyse der Endomyokardproben erfolgte eine HE-Färbung, Masson-Trichrom-Färbung und Giemsa-Färbung. Die Haematoxilin-Eosin-Färbung dient der Darstellung unterschiedlicher Gewebsstrukturen in der Mikroskopie. Dabei färbt Haematoxilin alle basophilen Strukturen blau, beispielsweise den Zellkern, währenddessen Eosin die azidophilen Strukturen wie Zytoplasma und die Extrazellulärmatrix rot färbt.[84]

Bei der Masson-Trichrom-Färbung erfolgt eine Färbung mit drei unterschiedlichen Farbstoffen. Zellkerne färben sich blauschwarz, Zytoplasma rot und Bindegewebe blaugrün. Hierdurch lassen sich Kollagenfasern gut von Muskelgewebe differenzieren.[85]

Die Giemsa-Färbemethode wird zur Untersuchung zytologischen Materials, zur

Darstellung von Chromosomen, zur Färbung von Blut- und Knochenmarksausstrichen sowie zur Diagnostik parasitärer Erkrankungen des Blutes verwendet. Sie erlaubt eine Unterscheidung verschiedener Zellreihen des Blutes. Nach Färbung mit einer Mischung aus Azur, Eosin und Methylenblau färben sich Zellkerne dunkelblau, Zytoplasma hellblau und Kollagen hellrosa. Kerne von Protozoen und Parasiten leuchten hellrot.[86]

Für die Immunhistochemie wurde nach Herstellerangaben (Vectastain Elite ABC Kit, Vecotr, Burlingame, Kalifornien) eine Avidin-Biotin-Färbemethode durchgeführt. Dabei wurden folgende monoklonale Antikörper verwendet, um monoklonale Zellinfiltrate nachzuweisen: CD3 für T-Zellen (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK), CD68 für Makrophagen (DAKO, Glostrup, Dänemark) und HLA-DR- α (DAKO, Hamburg, Deutschland) für die Expression von MHCII-Komplexen in antigenpräsentierenden Immunzellen. Die CMP wurden nach standardisierten klinischen und histologischen Kriterien eingeteilt. [5, 6, 23]

Die Avidin-Biothin-Methode ist eine etablierte indirekte Färbemethode in der Immunhistochemie zur Visualisierung von Proteinen in Zell- und Gewebestrukturen. Dabei werden in einem ersten Schritt die gesuchten Antigene durch spezifische Primärantikörper gebunden. Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung der Primärantikörper an biotinylierte Sekundärantikörper. Darauf folgt die Bindung der Sekundärantikörper mit enzymkonjugierten Avidin-Komplexen, die dann durch Addition eines Farbstoffs sichtbar gemacht werden können. Durch diese Methode kann das Farbsignal eines gebundenen Antikörpers verstärkt und damit die Sensitivität der Färbung erhöht werden.[87]

Für den Nachweis der MIF-Expression wurde Anti-MIF (R&D-Systems, Minneapolis, USA) verwendet. Zur Isotypenkontrolle wurden nach Herstellerprotokoll Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und die dazugehörigen biotinylierten sekundären Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) verwendet. Das mit MIF gefärbte Myokardgewebe wurde semiquantitativ eingeteilt in einen Score von 1 (keine bis geringe Expression) bis 4 (flächendeckende, hohe Expression). [5, 88, 89]

Diese Einteilung erfolgte am Beispiel bereits verwendeter Scores für CD68 und

MHCII. Der MIF-Färbegrad wurde in einem weiteren Schritt eingeteilt in „negativ“ (Score 1-2) und „positiv“ (Score 3-4). Die Score-Werte wurden anhand von 1-2 Gewebeschnitten pro Färbung durch zwei unabhängige Prüfer verblindet eingeteilt.[4, 90, 91] Ein Wert von 0,7 nach Berechnungen nach Fleiss'Kappa zeigte eine gute Übereinstimmung bezüglich der Score-Einteilung zwischen den beiden Prüfern.[5]

Nach einer bereits in früheren Studien etablierten Methode wurde der Grad der myokardialen Fibrosierung der Endomyokardbiopsate anhand eines Index definiert.[92] Die Bestimmung des prozentualen Fibroseanteils erfolgte durch Division der fibrotischen Gewebefläche der Gewebeschnitte durch die Gesamtfläche. Anhand dieses Fibrose-Index wurde die Myokardfibrosierung in mild, moderat und schwer eingeteilt.[5]

2.6. Molekularer Nachweis von Virus-DNA durch „nested PCR“

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA in vitro, die in den 1980er Jahren von Kary Mullis entwickelt wurde.[93] Sie findet heutzutage Anwendung in vielen verschiedenen Bereichen der Molekularbiologie.

Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch die drei aufeinanderfolgenden Schritte von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Diese Schritte werden in bis zu 50 Zyklen mehrfach durchlaufen. Im ersten Schritt der Denaturierung wird die zu amplifizierende DNA auf ca. 95°C erhitzt, sodass sich die beiden DNA-Stränge trennen. Hierauf folgt die Hybridisierung der DNA-Einzelstränge durch Oligonukleotide, sog. Primer, welche sich am 3'-Ende des DNA-Einzelstrangs anlagern und einen unvollständigen DNA-Doppelstrang bilden. Im Schritt der Elongation werden durch eine DNA-Polymerase, meist Taq-Polymerase[94], zu den DNA-Einzelsträngen komplementäre neue DNA-Stränge gebildet. Somit wird ein DNA-Doppelstrang bei Durchlaufen mehrerer Zyklen exponentiell vervielfältigt, unter idealen Bedingungen um das 2^n -fache nach n Zyklen.

Durch diese Methode gelingt die Vervielfältigung besonders kleiner Mengen an DNA. Daher wird sie in der Medizin u.a. mit hoher Sensitivität und Spezifität zum Nachweis viraler oder bakterieller Infektionen in Körperflüssigkeiten und Geweben eingesetzt.

In unserer Studie wurde eine „nested PCR“, deutsch „verschachtelte PCR“, durchgeführt. Dies ist eine Modifikation der klassischen PCR, durch welche die Anzahl unspezifischer DNA-Amplifikationen vermindert und damit die Spezifität der Methode erhöht wird. Hierbei kommen zwei unterschiedliche Primer-Sets zum Einsatz. Die Ziel DNA wird in einer ersten PCR durch den Einsatz des ersten Primer-Sets vervielfältigt. Das Produkt der ersten PCR wird als Vorlage für die zweite PCR mit dem zweiten Primer-Set verwendet. [95]

Die „nested PCR“ wurde an tiefgefrorenen RNAlater® fixierten Endomyokardbiopsaten durch das Institut für molekulare Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt. [90]

2.7. Bestimmung linksventrikulärer Risikomarker durch Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie

Mittels eines 1,5 Tesla Magnetresonanztomographen (Siemens Medical Systems, Deutschland) wurden kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographien (KM-MRT) des Herzens durchgeführt.[5] Die Gradientenstärke betrug 40 Millitesla/Meter (mT/m) bei einer Anstiegsgeschwindigkeit (Slew rate) von 200 mT/m/msec. Es wurde ein für Kardio-MRT ausgerichtetes Software-Programm verwendet. Die Aufnahmen wurden in Rückenlage während elektrokardiographisch kontrollierten Atempause-Sequenzen angefertigt.

Zur Bestimmung funktioneller Parameter wurde eine SSFP- (steady-state free-precession) Pulssequenz (Repetitionszeit/Echozeit 3,0/1,5ms; Anregungswinkel (flip angle) 60°, 25 Bilder pro Herzzyklus, matrix 256/192, FOV 300-400mm) verwendet und Videosequenzen im 2- und 4-Kammerblick, in der kurzen Achse

sowie in Ausrichtung des links- und rechtsventrikulären Ausflusstrakts erstellt. Zudem wurden Schnittbilder (Schichtdicke 5mm, gap 5mm) des gesamten linken und rechten Ventrikels von der Apex bis zur Basis im Querschnitt erstellt, die Ausrichtung der Schnittebenen erfolgte parallel zum Sulcus coronarius.

Die quantitative Analyse der funktionellen Parameter wurde mittels hierfür geeigneter Software (ARGUS, Siemens Medical Systems, Deutschland) durchgeführt. Zur Bestimmung der LVEF wurden die enddiastolischen und endsystolischen Volumina verwendet (LVEF: $EDV-ESV/EDV*100$). Der Durchmesser des linken Ventrikels im Querschnitt wurde in der Mitte der Längsausdehnung des Ventrikels bestimmt. Der LVEDD wurde im Querschnitt an der Spitze der Mitralklappensegel gemessen.

Für das Late-Gadolinium-Enhancement (LGE) wurde eine zweidimensionale T1w Inversion-Recovery-GRE-Sequenz zur Darstellung der Kontrastmittelspätanreicherung mit den folgenden Einstellungen verwendet: Repetitionszeit/Echozeit/Inversionszeit 8,0/4,9/240,0-300, 0ms, Anregungswinkel 30°, Wanddicke 8mm, Schichtebene 1,2*1,5mm. Für alle Untersuchungen wurde die optimale Inversionszeit zur Signalunterdrückung des normalen Myokardgewebes mittels einer Inversion-Recovery SSFP-Sequenz bestimmt, in der schrittweise die Inversionszeit erhöht wurde (Repetitionszeit/Echozeit 24/1,12ms, Anregungswinkel 60°, Wanddicke 8mm, Inversionszeit steigend um jeweils 20,0ms). Die Kardio-MRT-Bilder in Quer- und Längsschnittebene wurden 10-15min nach intravenöser Injektion von 0,15mmol Gadobutrol/kg Körpergewicht (Gadovist, Bayer Healthcare, Deutschland) aufgenommen. Die Gesamtuntersuchungszeit betrug 30-45min. Zwei erfahrene Untersucher überprüften unabhängig und randomisiert die Bildsequenzen jeder Untersuchung. Für die Analyse des LGE beurteilten beide Untersucher visuell Vorhanden- oder Nichtvorhandensein eines Enhancements, seine Lokalisation und das Verteilungsmuster. Muster und Ausmaß des LGE wurden im Quer- und Längsschnitt beurteilt und nur dann als positiv bewertet, wenn sie in zwei zueinander orthogonalen Ebenen nachweisbar waren. Die Beschreibung der Lokalisation des LGEs erfolgte anhand des 17-Segment-Modells der AHA. Das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein eines LGE war neben der Bestimmung

der LVF/RVF mit Ejektionsfraktion und dem Ausschluss/Nachweis eines Perikardergusses der entscheidende Parameter der Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie.[96, 97]

2.8. Statistische Analyse

Stetige Variablen wurden als Durchschnitt \pm die Standardabweichung angegeben und mittels t-Test verglichen. Kategorische Daten wurden im Verhältnis angegeben und mittels Chi-Quadrat-Test analysiert. Die Risikofaktoren NYHA-Klasse, LVEF, LVEDD, BNP, TnI, CRP und MIF wurden prospektiv erhoben.

Kontinuierliche Parameter wurden an festgesetzten cut-off-Werten dichotomisiert. Die Korrelation der MIF-Expression und LVEF, LVEDD, Myokardfibrose, Entzündungsmarkern und LGE wurde mittels Spearman Rangkorrelationskoeffizient und Pearson Korrelationskoeffizient berechnet. Als Maß der Interrater-Variabilität, also der Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Untersuchern, wurde der Fleiss Kappa Koeffizient berechnet.[5, 98]

Zur Berechnung der Korrelation zwischen Risikofaktoren und primärem und sekundärem Endpunkt führten wir multivariate Cox-Regressionsanalysen durch. Nach univariablen Analysen unterzogen wir statistisch signifikante Variablen einer multivariablen Analyse unter Einbeziehung von Alter und Geschlecht. Die Überlebenskurven der nach bestimmten Variablen eingeteilten Patientengruppen wurden mittels Kaplan-Meier-Analysen berechnet und mittels Logrank-Test verglichen. Das Risiko für das Auftreten eines Endpunkts gaben wir als Hazard Ratio (HR) mit einem 95%-Konfidenzintervall (KI) an. Zeitpunkt des Beginns der Überlebensanalysen war das Durchführungsdatum der Endomyokardbiopsie. Eine statistische Signifikanz der Vergleichswerte wurde für den Fall angenommen, dass nach zweiseitigem Test der p-Wert ≤ 0.05 betrug.

Für die Vorhersage des primären Endpunkts Gesamtmortalität wurde eine

ROC- (Receiver Operating Characteristic) Kurve für die MIF-Expression in Abhängigkeit zur Spezifität und Sensitivität erstellt. Zur Bestimmung der Diskriminierungsfähigkeit von MIF bezüglich des Endpunkts berechneten wir das Integral der Kurve (area under the curve (AUC)).[5] Die statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS, Version 22.0, (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkohorte und Baseline-Charakteristika

Baselinecharakteristika und Demographien der Patientenkohorte werden in Tabelle 1 aufgeführt. Der Gruppe der überlebenden Patienten (n=283) wird die Gruppe derjenigen Patienten gegenübergestellt, die innerhalb des Nachverfolgungszeitraums verstorben sind und damit den primären Studienendpunkt erreicht haben (n=41).

In unserer Studie wurden 324 Patienten mit NICM eingeschlossen. Davon erreichten 41 (12,7%) Patienten den primären Studienendpunkt.[5] Das mittlere Alter unseres Patientenkollektivs betrug 58,0 Jahre.[5] Mit durchschnittlich 61,6 Lebensjahren lag das Alter derjenigen Patienten, die den primären Studienendpunkt erreichten, ca. 7 Jahre höher als in der Gruppe der Überlebenden. Der Anteil der männlichen Patienten war deutlich höher (238 Patienten, 73,5%) im Vergleich zu den weiblichen Patienten, unterschied sich jedoch nicht in den beiden Vergleichsgruppen. In der Gruppe der überlebenden Patienten betrug der durchschnittliche BMI $27,0 \pm 5,7$ und lag damit höher als in der Vergleichsgruppe mit einem durchschnittlichen BMI von $24,8 \pm 4,9$ ($p=0,021$).[5] Die NYHA-Klasse betrug $2,2 \pm 0,8$ ohne relevanten Unterschied in den beiden Vergleichsgruppen. Die LVEF war mit $41,9 \pm 12,8\%$ in der gesamten Patientenkohorte eingeschränkt, 189 (58,2%) der Patienten wiesen eine LVEF $<40\%$ auf.[5] Die Serumkonzentrationen der kardialen Biomarker waren erhöht: Die BNP-Konzentration betrug durchschnittlich $1462 \pm 2939,8$ ng/l, die Tnl-

Konzentration betrug $0,8 \pm 3,0$ $\mu\text{g/l}$. Bei 123 (38,0%) Patienten lag die BNP-Konzentration >100 ng/l , Troponin I lag bei 155 (47,8%) Patienten $>0,03$ $\mu\text{g/l}$. [5] Die Serumkonzentration des inflammatorischen Biomarkers CRP wurde im Patientenkollektiv in erhöhter Konzentration gemessen: CRP $3,1 \pm 10,1$ mg/dl . Bei 151 (46,5%) Patienten lag das CRP $>0,5$ mg/dl . [5]

Der Nachweis immunhistochemischer Biomarker gelang bei 179 (55,2%) der Patienten. 179 (55,2%) waren MHCII-positiv, 177 (54,6%) CD68-positiv und 117 (36,1%) CD3-positiv. [5]

In PCR-Analysen der Endomyokardbiopsien konnte bei 99 (30,6%) Patienten Virus-Genom nachgewiesen werden. Hiervon war die Mehrzahl (52 Patienten, 16,0%) PVB19-positiv, gefolgt von HHV-6 (30 Patienten, 9,3%), EBV (26 Patienten, 8,0%). CVB3 (2 Patienten, 0,6%) und Influenza A/B (1 Patient 0,3%). Bei Studieneintritt zeigte sich kein relevanter Unterschied in den Vergleichsgruppen bezüglich der Herzinsuffizienzmedikation mit Betablocker, ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptorblocker, Diuretikum und Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist.

Tabelle 1. Baseline-Charakteristika der Patientenkohorte

Parameter	Alle Patienten n=324 (100.0%)	Überlebende n=283 (87.3%)	Nicht-Überlebende n=41 (12.7%)	P*
<i>Klinische Charakteristika</i>				
Mittleres Alter, J	58.0 \pm 15.1	54.4 \pm 15.7	61.6 \pm 14.4	0.005
Frauen	86 (26.5)	77 (27.2)	9 (22.0)	0.48
BMI (kg/m ²)	25.9 \pm 5.3	27.0 \pm 5.7	24.8 \pm 4.9	0.021
NYHA	0.2 \pm 0.8	2.2 \pm 0.8	2.1 \pm 0.8	0.35
NYHA \geq II	262 (80.9)	231 (81.6)	31 (75.6)	0.36
<i>Begleitende Herzmedikation bei Studieneintritt</i>				
Betablocker	267 (82.4)	232 (82.0)	35 (85.4)	0.59

weiter Tabelle 1. Baseline-Charakteristika der Patientenkohorte

Parameter	Alle Patienten	Überlebende	Nicht-Überlebende	P*
	n=324 (100.0%)	n=283 (87.3%)	n=41 (12.7%)	
<i>Begleitende Herzmedikation bei Studieneintritt</i>				
ACE-I	230 (71.0)	202 (71.4)	28 (68.3)	0.68
ARB	60 (18.5)	53 (18.7)	7 (17.1)	0.80
Diuretika	190 (58.6)	164 (58.0)	26 (63.4)	0.51
MRA	161 (49.7)	136 (48.1)	25 (60.1)	0.12
<i>Parameter des linken Ventrikels</i>				
LVEF (%)	41.9±12.8	41.7±13.4	42.1±12.2	0.89
LVEF <40%	189 (58.2)	159 (56.2)	30 (73.2)	0.04
LVEDD (mm)	50.8±9.3	54.0±9.6	47.5±9.0	<0.001
LVEDD> 55mm	146 (45.1)	137 (48.4)	9 (22.0)	0.001
PAPsys(mmHg)	34.9±17.5	33.6±22.2	36.2±12.7	0.53
<i>Biomarker</i>				
BNP (ng/l)	1462.0±2939.8	1685.0±3434.3	1239.0±2445.3	0.57
TnI (µg/l)	0.8±3.0	0.8±4.5	0.7±1.4	0.85
TnI>0.03	155 (47.8)	130 (45.9)	25 (61.0)	0.02
CK (U/l)	135.9±149.8	146.5±193.8	125.2±105.7	0.50
CRP (mg/dl)	3.1±10.1	1.8±3.7	4.3±16.4	0.03
CRP >0.5	151 (46.5)	126 (38.9)	25 (61.0)	0.05
<i>Virus-positive endomyokardiale Biopsien</i>				
Total	99 (30.6)	86 (30.4)	13 (31.7)	0.86
EBV	26 (8.0)	22 (6.8)	4 (9.8)	0.66
PVB19	52 (16.0)	48 (17.0)	4 (9.8)	0.24

weiter Tabelle 1. Baseline-Charakteristika der Patientenkohorte

Parameter	Alle Patienten n=324 (100.0%)	Überlebende n=283 (87.3%)	Nicht-Überlebende n=41 (12.7%)	P*
<i>Virus-positive endomyokardiale Biopsien</i>				
HHV 6	30 (9.3)	25 (8.8)	5 (12.2)	0.49
Influenza A/B	1 (0.3)	1 (0.4)	0 (0)	0.97
CVB3	2 (0.6)	2 (0.7)	0 (0)	0.59
<i>Positiver Nachweis von immunhistochemischen Markern im Myokard</i>				
MHC II	179 (55.2)	158 (55.8)	21 (51.2)	0.58
CD 68	177 (54.6)	156 (55.1)	21 (51.2)	0.64
CD 3	117 (36.1)	101(35.7)	16 (39.0)	0.68
MIF pos.	125 (38.6)	92 (32.5)	33 (80.5)	<0.001
<i>Kardiale Fibrose</i>				
Mild	87 (26.9)	85 (30.0)	2 (4.9)	<0.001
Moderat	123 (38.0)	111 (39.2)	12 (29.3)	<0.001
Schwer	114 (35.2)	87 (30.7)	27 (65.9)	<0.001
<i>Kardio-MRT</i>				
Ödem	10 (3.1)	10 (3.5)	0 (0)	0.46
LGE positiv	117 (36.1)	108 (38.2)	9 (22.0)	0.043

Angaben in n (%) oder Mittelwert ± Standardabweichung. ACE-I –Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer, ARB – Angiotensin-II-Rezeptorblocker, BMI – body mass index, BNP – b-type natriuretisches Peptid, CRP – C-reaktives Protein, CK – Kreatinkinase, CVB3 – Coxsackievirus B3, EBV – Epstein-Barr virus, HHV6 –Humanes Herpesvirus-6, LGE – late gadolinium enhancement, LVEDD – linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, MIF – Macrophage Migration Inhibitory Factor, MRA – Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist, MRT – Magnetresonanztomographie, NYHA – New York Heart Association, PAPsys – systolischer pulmonalarterieller Druck, PVB19 – Parvovirus B19, SD – Standardabweichung, TnI – Troponin I, J – Jahre. [5]

* für den Vergleich der Gruppe der Überlebenden gegenüber den Nicht-Überlebenden

3.2. MIF wird im Myokard von Patienten mit NICM exprimiert

In der Immunhistochemie erwiesen sich die Endomyokardbiopsien von 125 (38,6%) Patienten als MIF positiv.[5] Innerhalb der Gruppe der chronischen Myokarditis trat eine positive MIF-Expression signifikant häufiger auf (MIF-positiv: 65/125 Patienten, 52,0%; MIF-negativ: 79/199 Patienten, 39,7%; $p=0,04$)[5], wie in Tabelle 2 zu sehen ist. Hier werden die Klassifikationen der CMP anhand klinischer und histopathologischer Kriterien aufgeführt. Der Gruppe der MIF-Negativen wird die Gruppe der Patienten mit positiver MIF-Expression gegenübergestellt. Insgesamt waren 68/157 Patienten mit inflammatorischer CMP (akute Myokarditis, chronische Myokarditis) und 57/154 Patienten mit nicht-inflammatorischer CMP (DCM, HNCM/HOCM, ARVC/D, kardiale Amyloidose) MIF-positiv. Hieraus ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen inflammatorischer und nicht-inflammatorischer CMP bezüglich der kardialen MIF-Expression ($p=0,36$). Patienten mit unauffälligem Myokard in der histopathologischen Analyse (13 Patienten, 4,0%) zeigten keine MIF-Expression ($p=0,002$).

Tabelle 2. Klassifikation der Kardiomyopathien bezüglich klinischer und histologischer Kriterien

Nicht-ischämische Kardiomyopathie, n(%)	Gesamte Kohorte	MIF negativ	MIF positiv	P *
	n=324 (100%)	n=199 (61.4%)	n=125 (38.6%)	
Primäre Kardiomyopathie, n (%)				
DCM	99 (30.5)	63 (31.7)	36 (28.8)	0.62
HNCM/HOCM	33 (10.2)	23 (11.6)	10 (8)	0.35
ARVC/D	3 (0.9)	3 (1.5)	0 (0)	0.29
Akute Myokarditis	13 (4.0)	10 (5.0)	3 (2.4)	0.24
Chronische Myokarditis	144 (44.4)	79 (39.7)	65 (52.0)	0.04

weiter Tabelle 2. Klassifikation der Kardiomyopathien bezüglich klinischer und histologischer Kriterien

Nicht-ischämische Kardiomyopathie, n(%)	Gesamte Kohorte	MIF negativ	MIF positiv	P *
	n=324 (100%)	n=199 (61.4%)	n=125 (38.6%)	
Sekundäre Kardiomyopathie, n (%)				
Kardiale Amyloidose	19 (5.9)	8 (4.0)	11 (8.8)	0.09
Normales Myokard, n (%)				
	13 (4.0)	13 (6.5)	0 (0.0)	0.002

Angaben in n (%). ARVC/D – arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie, DCM – Dilatative Kardiomyopathie, HNCM – hypertrophe nicht-obstruktive Kardiomyopathie, HOCM – Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie[5]

Abbildung 1 zeigt exemplarisch repräsentative Myokardgewebe-Schnitte mit unterschiedlichen Graden der MIF-Expression. In Spalte 1 sind Gewebeschnitte von Myokard eines Patienten mit normaler linksventrikulärer Ejektionsfraktion ohne Zeichen der Inflammation oder Fibrose abgebildet. Das Myokard zeigt keine MIF-Expression. In Spalte 2 sind Gewebeschnitte eines Patienten mit einer DCM zu sehen. Zu erkennen ist eine geringe Infiltration mit inflammatorischen Zellen und eine milde Myokardfibrose. Die Kardiomyozyten zeigen eine MIF-Expression in geringem Maß. Spalte 3 zeigt Gewebeschnitte eines Patienten mit chronischer Myokarditis. Zu sehen ist eine ausgeprägte Infiltration inflammatorischer Zellen sowie eine schwere Myokardfibrose.[5]

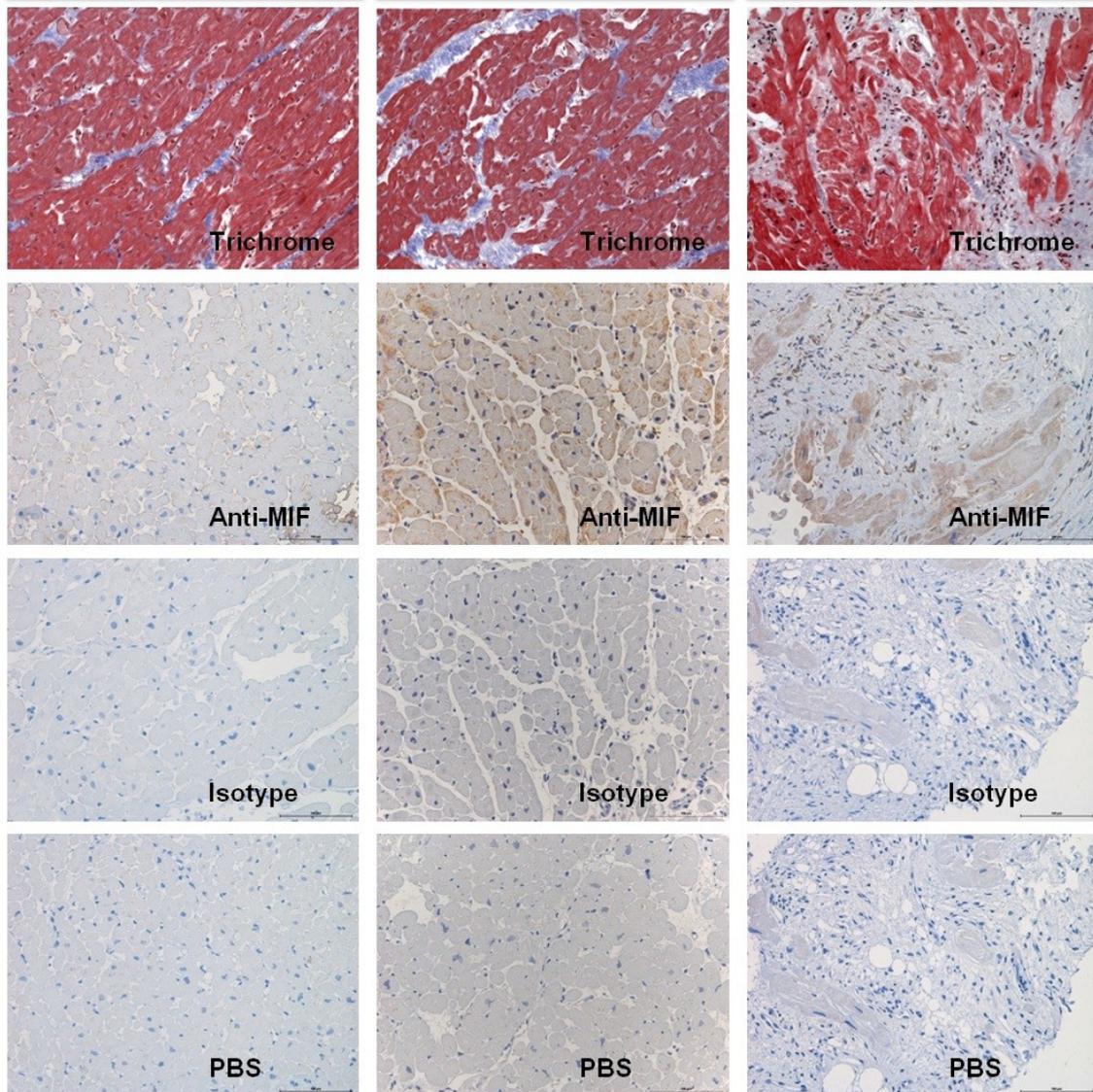


Abbildung 2: Representative Darstellung von Myokardgewebeschnitten mit unterschiedlichen Graden der myokardialen Fibrose und MIF-Expression bei Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie. Die hier dargestellten Myokardgewebeschnitte wurden gefärbt mit Masson-Trichrom-Färbung, Anti-MIF (Anti-Macrophage-migration-inhibitory-factor), Isotyp und PBS- (Phosphat-buffered-saline-) Kontrolle.

- Linke Spalte: Myokard eines Patienten mit normaler linksventrikulärer Ejektionsfraktion ohne Zeichen der Inflammation und Fibrose. Das Myokard weist keine MIF-Expression auf.
- Mittlere Spalte: Myokard eines Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mit geringer Infiltration durch inflammatorische Zellen und geringer Myokardfibrose. Es zeigt sich geringe MIF-Expression innerhalb der geschädigten Kardiomyozyten und inflammatorischen Zellen.
- Rechte Spalte: Myokard eines Patienten mit chronischer Myokarditis mit ausgeprägter Infiltration inflammatorischer Zellen und schwerer Myokardfibrose. Es findet sich eine starke MIF-Expression innerhalb geschädigter Kardiomyozyten und inflammatorischer Zellen.[5]

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine hohe MIF-Expression mit ausgeprägten kardialen Remodelling-Vorgängen bei progressiver und chronischer nicht-ischämischer CMP verbunden ist.

Der Nachweis der inflammatorischen Marker MHCII, CD68 und CD3, für welche bereits eine Expression in der akuten Myokarditis nachgewiesen werden konnte [46], gelang bei über der Hälfte unserer Patienten (MHCII positiv: n=179, 55,2%; CD68 positiv: n=177, 54,6%; CD3 positiv: n=117, 36,1%)[5], wobei der Anteil an Patienten mit akuter Myokarditis mit 4,0 % (n=13) in unserer Patientenkohorte sehr gering war. Interessanterweise korrelierte die Expression dieser Entzündungsmarker in unserer Studie nicht mit der Expression von MIF (Korrelationskoeffizient r für MHCII: r= 0,05, p=0,37; für CD68: r=0,04, p=0,54; CD3: r=0,06, p=0,25)[5], welches wie oben beschrieben in der Mehrzahl der Fälle bei Patienten mit chronischer Myokarditis nachgewiesen wurde. Ebenso ergab die statistische Analyse keine Korrelation zwischen MIF-Expression und dem Nachweis von Virus-Genom (r=0,003, p=0,96). [5]

Eine eingeschränkte LVEF <40% in der transthorakalen Echokardiographie (r=0,12, p=0,04), ein LVEDD>55mm (r=0,18, p=0,001) und erhöhtes Tnl >0,03µg/l (r=0,15, p=0,015) korrelierten signifikant mit der Mortalität in unserer Patientenkohorte. Dieser Zusammenhang konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden. [5, 8-12, 14, 15]

Die histopathologischen Analysen zeigten bei Erreichen des primären Studienendpunkts einen signifikant höheren Anteil an schwerer myokardialer Fibrosierung (27 Patienten, 65,9%) als in der Gruppe der Überlebenden (87 Patienten, 30,7%), p<0,001.

3.3. Myokardiale MIF-Expression korreliert mit dem Ausmaß myokardialer Fibrosierung

In der Studie korrelierte das Auftreten der inflammatorischen Marker MHCII, CD68 und CD3 nicht mit erhöhter MIF-Expression. Jedoch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grad der kardialen Fibrosierung, dargestellt in der Trichrome-Färbung, und erhöhter Expression von MIF ($r=0,51$, $p<0,001$). Eine positive myokardiale MIF-Expression trat bei Patienten mit schwerer Myokardfibrose signifikant häufiger auf als bei Patienten mit milder oder keiner Myokardfibrose (64% in der MIF-positiven Gruppe gegenüber 17,1% in der MIF-negativen Gruppe, $p<0,001$). Der Anteil der Patienten mit keiner oder milder myokardialer Fibrosierung betrug 87/324 (26,9%). Hierunter waren 7/87 (8,0%) MIF-positiv. 123/324 (38%) Patienten hatten eine moderate Myokardfibrose. In dieser Gruppe war der Anteil der MIF-positiven Patienten 38/123 (30,9%). Von 114/324 (35,2%) Patienten mit schwerer Myokardfibrose waren 80 (70,2%) MIF-positiv (s. Abbildung 2).[5]

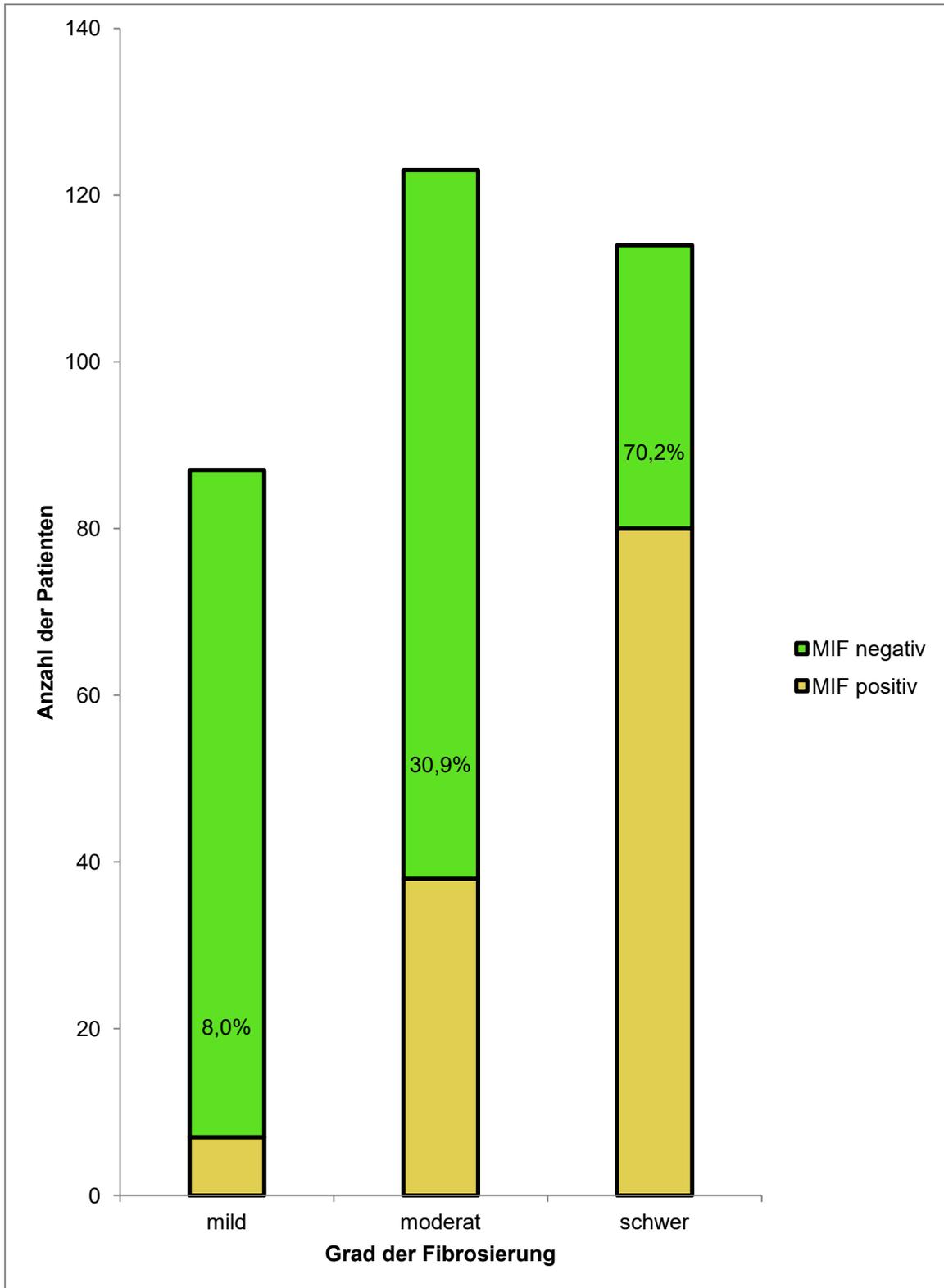


Abbildung 3: Korrelation myokardialer MIF-Expression mit Schweregrad der Fibrose in der nicht-ischämischen Kardiomyopathie. Die Abbildung stellt die Korrelation zwischen positiver myokardialer MIF-Expression und Schweregrad der Myokardfibrose dar. Die Ausprägung der Myokardfibrose ist unterteilt in keine/mild (87 Patienten, 8,0% MIF-positiv), moderat (123 Patienten, 30,9% MIF-positiv) und schwer (114 Patienten, 70,2% MIF-positiv), die MIF-Expression wird eingeteilt in positiv und negativ. [5]

3.4. Myokardiale MIF-Expression ist ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechtes klinisches Outcome bei Patienten mit NICM

Über einen durchschnittlichen Nachbeobachtungszeitraum von 27,5 Monaten erreichten 41/324 (12,7%) Patienten den primären und 124/324 (41,1%) Patienten den kombinierten sekundären Studienendpunkt.[5] 33/41 (80,5%) der Patienten, die den primären Studienendpunkt erreichten, und 65/125 (48,5%) Patienten, die den sekundären Studienendpunkt erreichten, waren MIF positiv. Wie in Tabelle 3 ersichtlich, erwiesen sich in multivariaten Cox-Regressionsanalysen unter allen untersuchten Risikofaktoren (positive MIF-Expression, die Entzündungsmarker MHCII, CD68 und CD3, myokardiale Fibrosierung, Tnl>0,03µg/l, CRP>0,5mg/dl, Alter, Geschlecht, LVEF≤40%, LVEDD>55mm, NYHA-Stadium ≥ II, ACE-Hemmer-Therapie, Betablocker-Therapie, Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist-Therapie) eine positive MIF-Expression (Hazard ratio (HR) 7.4, 95% Konfidenzintervall (CI) 2.7-20.3, p<0.001), ein erhöhtes Tnl > 0,03µg/l (HR 2.98, 95% CI 1.24-7.17, p=0.02) und das Alter (HR 1.03, 95% CI 1.0-1.1, p=0.03) als unabhängige Prädiktoren für den primären Endpunkt.[5]

Tabelle 3. Hazard ratios für die Vorhersage des primären Studienendpunkts*

Cox-Regressionsanalyse		
Variable	HR (95% CI)	P
Positive MIF-Expression	7.40 (2.70-20.33)	<0.001
MHC II positiv	0.05 (0.00-22.87)	0.33
CD 68 positiv	11.46 (0.02-5704.30)	0.44
CD 3 positiv	1.60 (0.51-5.00)	0.42
Kardiale Fibrosierung	1.78 (0.88-3.59)	0.11
Tnl> 0.03 µg/l	2.98 (1.24-7.17)	0.015

weiter Tabelle 3. Hazard ratios für die Vorhersage des primären Studienendpunkts*

Cox-Regressionsanalyse		
Variable	HR (95% CI)	P
CRP > 0.5 mg/dl	1.41 (0.65-3.06)	0.38
Alter	1.03 (1.00-1.06)	0.027
Geschlecht	2.01(0.77-5.20)	0.15
LVEF< 40%	2.55 (0.88-7.37)	0.08
LVEDD > 55mm	0.47 (0.17-1.28)	0.14
NYHA ≥ II	0.83 (0.34-2.05)	0.69
ACE-I	0.76 (0.30-1.92)	0.56
Betablocker	1.44 (0.47-4.44)	0.52
MRA	1.75 (0.73-4.24)	0.21

ACE-I – Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer, ARB – Angiotensin-II-Rezeptorblocker, CD – cluster of differentiation, CI–Konfidenzintervall, HR-hazard ratio, LGE – late gadolinium enhancement, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, MHCII – major histocompatibility complex Klasse II, MIF – macrophage migration inhibitory factor, NYHA– New York Heart Association[5]

*Gesamtmortalität

In multivariaten Cox-Regressionsanalysen für den kombinierten sekundären Studienendpunkt (s. Tabelle 4) erwies sich unter allen untersuchten Risikofaktoren eine positive MIF-Expression (HR 2.03, 95%CI 1.3-3.2, p=0.002) als unabhängiger Prädiktor für den kombinierten Studienendpunkt. Dies gilt ebenfalls für eine eingeschränkte LVEF≤40% (HR 0.41, 95%CI 0.24-0.68, p≤0.001).[5]

Tabelle 4. Hazard ratios für die Vorhersage des sekundären kombinierten Studienendpunkts*

Cox-Regressionsanalyse		
Variable	HR (95% CI)	P
Positive MIF expression	2.03 (1.29-3.19)	0.002
MHC II positiv	0.39 (0.03-5.36)	0.48
CD 68 positiv	1.19 (0.09-16.33)	0.90
CD 3 positiv	1.62 (0.86-3.02)	0.13
Kardiale Fibrosierung	0.99 (0.71-1.40)	0.97
TnI > 0.03 µg/l	1.30 (0.87-1.94)	0.21
CRP > 0.05 mg/dl	0.94 (0.63-1.41)	0.77
Alter	1.01 (1.00-1.02)	0.14
Geschlecht	1.33(0.82-2.16)	0.25
LVEF ≤ 40%	0.41 (0.24-0.68)	<0.001
LVEDD > 55mm	0.06 (0.59-1.56)	0.86
NYHA ≥ II	1.13 (0.68-1.87)	0.64
ACE-I	1.03 (0.64-1.66)	0.89
Betablocker	0.97 (0.56-1.68)	0.91
MRA	1.19 (0.77-1.84)	0.45

ACE-I – Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer, ARB – Angiotensin-II-Rezeptorblocker, CD – cluster of differentiation, CI – Konfidenzintervall, HR – hazard ratio, LGE – late gadolinium enhancement, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, MHCII – major histocompatibility complex Klasse II, MIF – macrophage migration inhibitory factor, NYHA – New York Heart Association[5]

* Kombination aus Gesamtmortalität, Herztransplantation, herzinsuffizienzbedingte Rehospitalisierung und Verschlechterung der LV-Funktion während des Nachverfolungszeitraums

In Abbildung 3 werden Kaplan-Meier-Kalkulationen für das Auftreten des primären Studienendpunkts veranschaulicht. Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen positiver MIF-Expression und der Gesamtmortalität (Logrank 40,2; $p < 0,001$).[5]

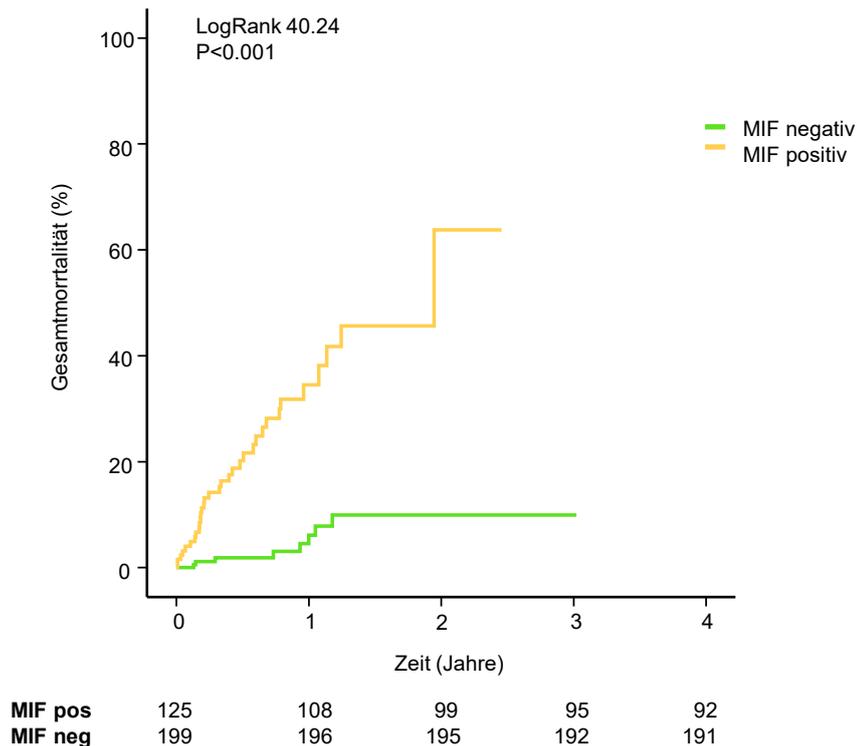


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Auftretens des primären Studienendpunkts Gesamtmortalität in Abhängigkeit zu positiver myokardialer MIF-Expression (LogRank 40.24, $p < 0,001$) im Nachverfolgungszeitraum[5]

Die Kaplan-Meier-Kalkulationen für das Auftreten des sekundären kombinierten Studienendpunkts werden in Abbildung 4 dargestellt und zeigen ebenfalls eine signifikante Relation mit positiver MIF-Expression (Logrank 19.3; $p < 0,001$)[5]

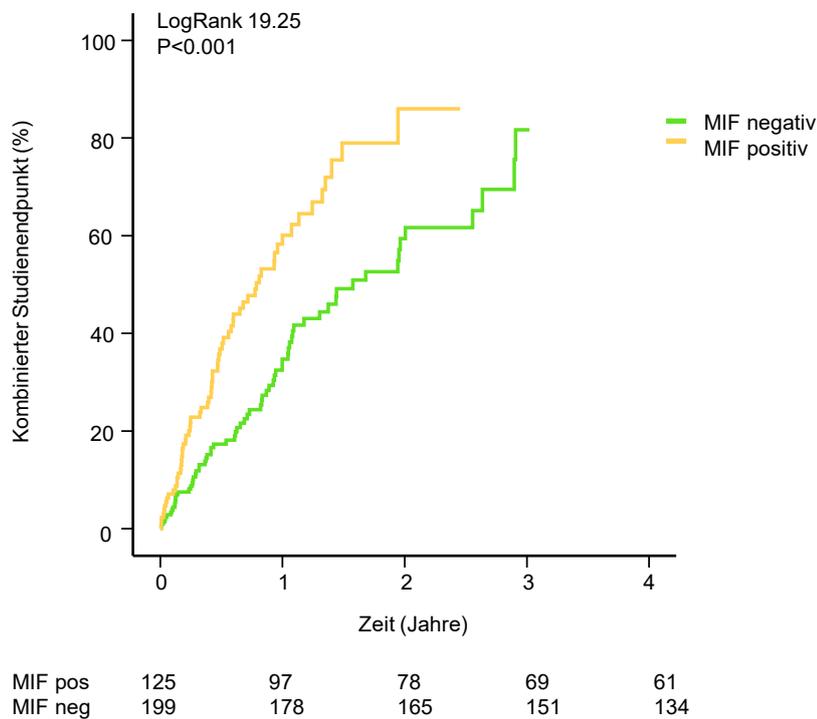


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Auftretens des kombinierten sekundären Studienendpunkts (Gesamt mortalität, Herztransplantation, herzinsuffizienzbedingte Rehospitalisierung, Verschlechterung der LV-Funktion während des Nachverfolgungszeitraums) in Abhängigkeit zu positiver bzw. negativer myokardialer MIF-Expression (LogRank 19.25, $p < 0,001$)[5]

Die Berechnung des prognostischen Werts von positiver MIF-Expression bezüglich der Gesamt mortalität ergab eine Sensitivität von 81% und eine Spezifität von 68%. Der positive prädiktive Wert lag bei 26%, der negative prädiktive Wert bei 96%. Um die prognostische und diagnostische Aussagekraft positiver MIF-Expression zu bewerten wurde eine ROC-Kurve berechnet (s. Abbildung 5). Eine AUC (area under the curve) von 0.74 (95%CI 0.66-0.82) spricht dafür, dass eine MIF-Analyse des Myokards als nützliche Methode mit akzeptabler Sensitivität und Spezifität in der klinischen Routine dienen könnte.[5]

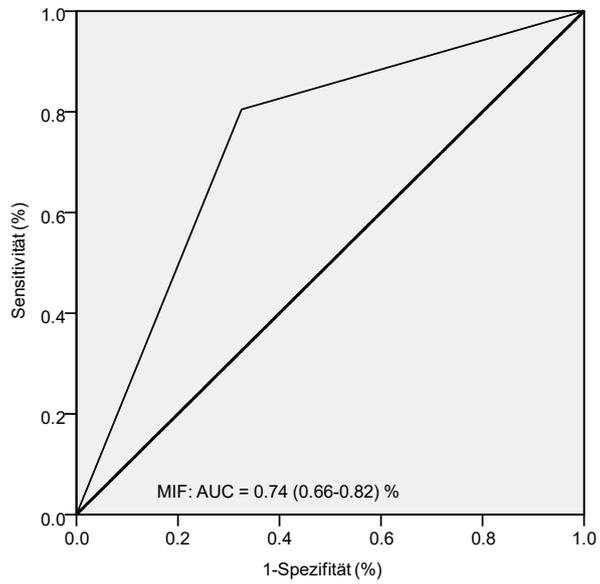


Abbildung 6: Vorhersage der kardiovaskulären Sterblichkeit durch positive MIF-Expression im Myokard . Die ROC- (Receiver-Operator-Characteristic-) Kurve veranschaulicht den prognostischen Wert positiver MIF-Expression für die Mortalität von Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie; AUC – area under the curve[5, 74]

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die diagnostische und prognostische Bedeutung von MIF bei 324 Patienten mit einer Herzinsuffizienz auf dem Boden einer NICM untersucht. Hierzu wurden bei allen Patienten Endomyokardbiopsien durchgeführt. Die histopathologische und immunhistochemische Analyse der Gewebeproben und Nachverfolgung des Patientenkollektivs über 3 Jahre brachte folgende Ergebnisse:

- I. MIF wird im Myokard von Patienten mit NICM exprimiert.
- II. Myokardiale MIF-Expression korreliert mit dem Ausmaß myokardialer Fibrosierung.
- III. Myokardiale MIF-Expression ist ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechtes klinisches Outcome bei Patienten mit NICM.[5]

In der wissenschaftlichen Literatur werden verschiedene Funktionen von MIF beschrieben, u.a. seine mediatorische und immunoregulatorische Funktion als inflammatorisches Zytokin in zahlreichen akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen und seine zentrale Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunabwehr. [50, 52] Neuere Studien beschreiben zudem wesentliche Funktionen von MIF in der Pathogenese der Atherosklerose und der ischämischen Kardiomyopathie.[53, 64, 99] Unseres Wissens ist diese Studie die bisher einzige, welche die diagnostische und prognostische Bedeutung von MIF in der NICM beschreibt.[5]

Die wesentlichen Ergebnisse der Studie zeigen, dass kardial exprimiertes MIF als Biomarker für Patientin mit NICM geeignet ist.[5] In unserem Patientenkollektiv weist mehr als ein Drittel der Patienten mit NICM eine erhöhte MIF-Expression auf. MIF erlaubt sowohl die Vorhersage des primären Studienendpunkts (Gesamtmortalität) als auch des sekundären Studienendpunkts (Gesamtmortalität, Herztransplantation, Herzinsuffizienz-

bedingte Rehospitalisierung und Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion während des Krankheitsverlaufs). Erhöhte MIF-Expression eignet sich, ein schlechtes klinisches Outcome von Patienten mit NICM vorherzusagen und ist somit für diese Patientengruppe prognostisch relevant. Die Sensitivität von MIF für die Vorhersage eines klinischen Ereignisses ist in unserer Studie mit 81% hoch – MIF konnte also in 4 von 5 Fällen mit schlechtem klinischen Outcome dieses vorhersagen. Der negative prädiktive Wert von MIF für die Vorhersage der Gesamtmortalität ist mit 96% sehr hoch – die allermeisten Patienten, deren Myokardbiopsien keine erhöhte MIF-Expression aufwiesen, hatten im Beobachtungszeitraum auch kein klinisches Ereignis. Spezifität und positiver prädiktiver Wert der MIF-Expression sind in unserer Studie niedrig. Aufgrund des sehr hohen negativen prädiktiven Werts lässt sich schlussfolgern, dass die Analyse der myokardialen MIF-Expression in unserer Patientenkohorte insbesondere dazu hilfreich sein könnte, Patienten mit einem geringen Risiko für ein schlechtes klinisches Outcome zu identifizieren. Somit kann eine routinemäßige MIF-Analyse des Myokards für die Risikobewertung von Patienten mit NICM insbesondere in der präventiven Patientenversorgung hilfreich sein.[5]

MIF tritt vermehrt bei kardialen Remodelling-Vorgängen auf. In unserer Studie wurde MIF signifikant häufiger bei Patienten mit schwerer Myokardfibrose exprimiert, insbesondere bei Vorliegen einer chronischen Myokarditis. In der Gruppe der akut entzündlichen Myokarditiden wurde keine vermehrte MIF-Expression festgestellt. Dieses Ergebnis unterstreicht analog zu vorangehenden Studien die Bedeutung von MIF als inflammatorisches Zytokin in chronisch entzündlichen Erkrankungen, die zu fibrotischem Gewebeumbau führen.[100] Es deutet daraufhin, dass MIF in der chronisch entzündlichen Herzerkrankung eine zentrale Rolle spielt.[5]

Dabei korrelierte MIF in unserer Studie interessanterweise weder mit den übrigen inflammatorischen Markern MHCII, CD3 und CD68, noch mit dem positiven Nachweis von Virus-Genom im Myokard. Dennoch konnten wir eine

signifikante Korrelation zwischen MIF-Expression und dem Grad der myokardialen Fibrose aufzeigen. Dies lässt vermuten, dass myokardiales Remodelling und die Entwicklung einer Myokardfibrose bei chronischen Krankheitsverläufen zu positiver MIF-Expression und schlechtem klinischem Outcome führt. In unserer Studie trat eine hohe MIF-Expression insbesondere bei dem Krankheitsbild der chronischen Myokarditis auf, was nahelegt, dass MIF eine zentrale Rolle bei der Ausbildung einer chronischen HI spielt. MIF reguliert als Zytokin die Migration inflammatorischer Zellen, insbesondere von Makrophagen, zum Ort der Gewebeschädigung.[51] Zunehmende Evidenz zeigt, dass myokardiale Inflammation zu fibrotischem Gewebeumbau führt und diese Prozesse von zentraler Bedeutung bei der Entwicklung der HI sind.[101-103] Diese Evidenz wird von unserer Arbeit zusätzlich unterstützt. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass die myokardiale MIF-Expression in direktem Zusammenhang mit der Ausprägung der Myokardfibrose und der Ausbildung einer progressiven chronischen HI steht.[5]

Wie bereits in vorausgehenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, steht myokardiale Fibrose in engem Zusammenhang mit dem Auftreten lebensbedrohlicher kardiovaskulärer Ereignisse wie der akuten HI, hämodynamisch relevanten VTs und SCD. In der Studie von Gulati et al. 2013 erwies sich intramyokardiale Fibrose (eng. midwall fibrosis) von Patienten mit DCM als unabhängiger Prädiktor für die Gesamtmortalität.[97] Dieser Zusammenhang bestätigte sich auch in unserer Studie, wenngleich für die kardiale Fibrose bezüglich des primären und sekundären Studienendpunkts keine unabhängige Korrelation gezeigt werden konnte. Die MIF-Expression korrelierte nicht mit der eingeschränkten LVEF oder einem vergrößerten LVEDD.[5]

Dennoch erwiesen sich neben MIF die eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion (LVEF < 40%) und erhöhtes TnI (TnI > 0,03µg/l) als unabhängige Prädiktoren für ein schlechtes klinisches Outcome.[5]

MHC II, CD3 und CD68 korrelierten weder mit dem primären noch mit dem

sekundären Studienendpunkt. Entgegen den Ergebnissen einer vorherigen Studie [104], die klinische und immunhistochemische Faktoren auf ihren prädiktiven Nutzen in der Myokarditis untersuchte, zeigte sich in unserer Studie kein prädiktiver Nutzen für MHCII, CD3 und CD68 bezüglich eines schlechten klinischen Outcomes. Ursächlich hierfür sind möglicherweise unterschiedliche Einschlusskriterien und die damit verbundenen Unterschiede der Patientenkollektive. Während bei Kindermann et al. ausschließlich Patienten mit V.a. Myokarditis eingeschlossen wurden, wurden in unserer Studie Patienten mit NICM sowohl inflammatorischer als auch nicht-inflammatorischer Genese eingeschlossen. Wie bereits bei Kindermann et al. erwies sich in unserer Studie der positive Nachweis von Virus-Genom nicht als nützlich für die Vorhersage eines schlechten klinischen Outcomes. Die diagnostische und prognostische Bedeutung des Nachweises von Virus-Genom im Myokard bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung. [83, 104, 105]

Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich schlussfolgern, dass MIF eine zentrale Rolle insbesondere in der chronischen inflammatorischen CMP spielt und als Indikator für myokardiale Fibrosierung und schlechtes klinisches Outcome geeignet ist. Daher könnten insbesondere Patienten mit voranschreitender HI auf dem Boden einer chronischen NICM von einer frühzeitigen Analyse der myokardialen MIF-Expression als diagnostischer und prognostischer Biomarker profitieren.[5]

Die Untersuchung der bereits etablierten Risikofaktoren der HI LVEF[8-10], NYHA-Stadium [11, 12], BNP[13, 14] und TnI[14, 15], könnten durch eine zusätzliche Untersuchung der myokardialen MIF-Expression in einem frühen Stadium der Erkrankung erweitert werden. Hierdurch ließe sich die Identifikation von Patienten mit einem hohen Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf und den plötzlichen Herztod optimieren und diese Patienten frühzeitig einer intensivierten Überwachung und Herzinsuffizienztherapie zugeführt werden.

Die Analyse myokardialer MIF-Expression könnte helfen, diejenigen Patienten mit NICM zu identifizieren, welche einem erhöhten Risiko für SCD ausgesetzt sind und daher von einer ICD-Implantation profitieren. Somit stellt positive MIF-

Expression möglicherweise ein weiteres Entscheidungskriterium für die primärprophylaktische Implantation eines ICD dar. Da positive MIF-Expression mit Myokardfibrose und einer schlechten Prognose verbunden ist, könnte die MIF-Immunhistochemie das Patientenmanagement verbessern und eine wichtige Rolle in der Entwicklung individueller Therapiestrategien spielen.[5]

Bezüglich der Fragestellung dieser Studienarbeit haben die Ergebnisse einen eher beobachtenden und hypothesengenerierenden Charakter und es sind weitere umfangreiche Studien notwendig, um Wirkmechanismen und Signalwege von MIF in der NICM genauer zu verstehen.[5]

Als proinflammatorisches Zytokin ist MIF von wachsendem Interesse als therapeutisches Ziel in verschiedenen Erkrankungen.[71] Eine über diese Arbeit hinausgehende wichtige Fragestellung ist daher, ob sich MIF möglicherweise auch als Angriffspunkt i.S. einer Blockade MIF-abhängiger Mechanismen in der NICM eignet, um das Outcome in dieser Patientengruppe zu verbessern.

Die Studie hat zudem gewisse Limitationen, die berücksichtigt werden müssen. Während des Nachbeobachtungszeitraums von 3 Jahren war die Gesamtmortalität in unserer relativ großen Patientenkohorte von 324 Patienten gering. Es sind größer angelegte prospektive Studien notwendig, um zu untersuchen, ob sich MIF hier weiterhin als unabhängiger Prädiktor für die Gesamtmortalität und den kombinierten Studienendpunkt während des Krankheitsverlaufs der NICM erweist. Zudem sollte untersucht werden, ob sich neben der MIF-Analyse von Myokardbiopsien auch die MIF-Konzentration im Blutplasma als Biomarker in der NICM eignet, und ob diese einen prognostischen Wert besitzt. Eine MIF-Analyse im Blutplasma wäre weniger invasiv und risikobehaftet und mutmaßlich einfacher und schneller durchzuführen als die Durchführung einer Myokardbiopsie.

Ein weiterer Kritikpunkt liegt in der verwendeten Methode zur Evaluation der MIF-Expression. Diese wurde, wie bereits im Abschnitt Materialien und Methoden genauer beschrieben, durch zwei unabhängige Prüfer verblindet durchgeführt.[4-6, 90, 91] Fleiss-Kappa-Berechnungen ergaben ein Kappa von 0,7 für MIF, was auf eine gute Übereinstimmung zwischen den Untersuchern

hindeutet. Obwohl diese Methode bereits für andere Biomarker empfohlen wurde[41, 89] wäre eine genauere Methode zur Evaluation der MIF-Expression wünschenswert.

5. Zusammenfassung

MIF ist ein inflammatorisches Zytokin mit zahlreichen Funktionen sowohl in akuten als auch in chronischen entzündlichen Erkrankungen. Die Bedeutung von MIF in der NICM wurde bisher nicht untersucht.[5]

In dieser Studie untersuchten wir an einem Patientenkollektiv von 324 Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie die Bedeutung von myokardialer MIF-Expression hinsichtlich seiner diagnostischen und prognostischen Bedeutung.[5] Alle 324 Patienten des Patientenkollektivs wurden endomyokardbiopsiert. Die Endomyokardbiopsien wurden histopathologisch untersucht und immunhistochemisch analysiert. Neben MIF wurde das Myokardgewebe auf die Expression der weiteren inflammatorischen Marker MHC II, CD3 und CD68 untersucht. Desweiteren wurden etablierte Risikofaktoren wie die LVEF, NYHA-Stadium, BNP und TnI erfasst. Der primäre Studienendpunkt wurde bei Tod jedweder Ursache erreicht. Der sekundäre Studienendpunkt wurde erreicht bei Eintreten eines der folgenden Ereignisse innerhalb des Nachverfolgungszeitraums von 3 Jahren: Tod jedweder Ursache, Herztransplantation, herzinsuffizienzbedingte Rehospitalisierung oder Verschlechterung der LVEF.[5]

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass MIF im Myokard von Patienten mit NICM exprimiert wird und myokardiale MIF-Expression mit einem schlechten klinischen Outcome assoziiert ist. MIF ist somit geeignet, ein schlechtes klinisches Outcome von Patienten mit NICM vorherzusagen.[5]

Außerdem korreliert die myokardiale MIF-Expression mit dem Grad myokardialer Fibrosierung. MIF scheint an den pathophysiologischen Mechanismen des kardialen Remodelings beteiligt zu sein.[5]

Die myokardiale MIF-Expression ist somit von hoher diagnostischer und

prognostischer Relevanz für Patienten mit NICM. Eine routinemäßige MIF-Analyse des Myokards ergänzend zu der Untersuchung bereits etablierter Risikofaktoren von Patienten mit NICM könnte insbesondere in der präventiven Patientenversorgung hilfreich sein, Risikopatienten für kardiale Ereignisse zu identifizieren und diese einer intensivierten Überwachung und Therapie zuzuführen.[5]

6. Literaturverzeichnis

1. Cowie, M.R., et al., *Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study*. Eur Heart J, 1999. **20**(6): p. 421-8.
2. Ziaeeian, B. and G.C. Fonarow, *Epidemiology and aetiology of heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(6): p. 368-78.
3. D'Ambrosio, A., et al., *The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review*. Heart, 2001. **85**(5): p. 499-504.
4. Kawai, C., *From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future*. Circulation, 1999. **99**(8): p. 1091-100.
5. Mueller, K.A., et al., *Prognostic impact of macrophage migration inhibitory factor in patients with non-ischemic heart failure undergoing endomyocardial biopsy*. Int J Cardiol, 2016. **203**: p. 656-9.
6. Maron, B.J., et al., *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, 2006. **113**(14): p. 1807-16.
7. Maron, B.J., et al., *Recommendations for physical activity and recreational sports participation for young patients with genetic cardiovascular diseases*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2807-16.
8. Unverferth, D.V., et al., *Factors influencing the one-year mortality of dilated cardiomyopathy*. Am J Cardiol, 1984. **54**(1): p. 147-52.
9. Schwarz, F., et al., *Determinants of survival in patients with congestive cardiomyopathy: quantitative morphologic findings and left ventricular hemodynamics*. Circulation, 1984. **70**(6): p. 923-8.
10. Polak, J.F., et al., *Right ventricular ejection fraction: an indicator of increased mortality in patients with congestive heart failure associated with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 1983. **2**(2): p. 217-24.
11. Wilson, J.R., et al., *Prognosis in severe heart failure: relation to hemodynamic measurements and ventricular ectopic activity*. J Am Coll Cardiol, 1983. **2**(3): p. 403-10.
12. Massie, B.M. and M. Conway, *Survival of patients with congestive heart failure: past, present, and future prospects*. Circulation, 1987. **75**(5 Pt 2): p. IV11-9.
13. Cheng, S. and R.S. Vasan, *Advances in the epidemiology of heart failure and left ventricular remodeling*. Circulation, 2011. **124**(20): p. e516-9.
14. Miller, W.L., et al., *Troponin, B-type natriuretic peptides and outcomes in severe heart failure: differences between ischemic and dilated cardiomyopathies*. Clin Cardiol, 2007. **30**(5): p. 245-50.
15. Nagarajan, V., A.V. Hernandez, and W.H. Tang, *Prognostic value of cardiac troponin in chronic stable heart failure: a systematic review*. Heart, 2012. **98**(24): p. 1778-86.
16. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
17. Jefferies, J.L. and J.A. Towbin, *Dilated cardiomyopathy*. Lancet, 2010.

- 375**(9716): p. 752-62.
18. Mozaffarian, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2015. **131**(4): p. e29-322.
 19. Kober, L., et al., *Defibrillator Implantation in Patients with Nonischemic Systolic Heart Failure*. N Engl J Med, 2016. **375**(13): p. 1221-30.
 20. Goodwin, J.F., et al., *Clinical aspects of cardiomyopathy*. Br Med J, 1961. **1**(5219): p. 69-79.
 21. Hickie, J.B. and G.V. Hall, *The cardiomyopathies: a report of fifty cases*. Australas Ann Med, 1960. **9**: p. 258-70.
 22. Brigden, W., *Uncommon myocardial diseases: the non-coronary cardiomyopathies*. Lancet, 1957. **273**(7008): p. 1243-9.
 23. Elliott, P., et al., *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. Eur Heart J, 2008. **29**(2): p. 270-6.
 24. Arbustini, E., et al., *The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians*. J Am Coll Cardiol, 2014. **64**(3): p. 304-18.
 25. Rapezzi, C., et al., *Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. Eur Heart J, 2013. **34**(19): p. 1448-58.
 26. Maron, B.J., et al., *Hypertrophic cardiomyopathy: present and future, with translation into contemporary cardiovascular medicine*. J Am Coll Cardiol, 2014. **64**(1): p. 83-99.
 27. Maron, B.J., *Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review*. JAMA, 2002. **287**(10): p. 1308-20.
 28. Noureldin, R.A., et al., *The diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy by cardiovascular magnetic resonance*. J Cardiovasc Magn Reson, 2012. **14**: p. 17.
 29. Jung, W., et al., *[Guidelines for the implantation of defibrillators]*. Clin Res Cardiol, 2006. **95**(12): p. 696-708.
 30. Laonigro, I., et al., *Alcohol abuse and heart failure*. Eur J Heart Fail, 2009. **11**(5): p. 453-62.
 31. Jain, A., et al., *Role of cardiovascular magnetic resonance imaging in arrhythmogenic right ventricular dysplasia*. J Cardiovasc Magn Reson, 2008. **10**: p. 32.
 32. Marcus, F.I., et al., *Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases*. Circulation, 1982. **65**(2): p. 384-98.
 33. Corrado, D. and G. Thiene, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1634-7.
 34. Wichter, T., et al., *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Antiarrhythmic drugs, catheter ablation, or ICD?* Herz, 2005. **30**(2): p. 91-101.
 35. Kushwaha, S.S., J.T. Fallon, and V. Fuster, *Restrictive cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1997. **336**(4): p. 267-76.
 36. Mogensen, J. and E. Arbustini, *Restrictive cardiomyopathy*. Curr Opin Cardiol, 2009. **24**(3): p. 214-20.
 37. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. Circulation, 1996. **93**(5): p. 841-2.
 38. Weiford, B.C., V.D. Subbarao, and K.M. Mulhern, *Noncompaction of the ventricular myocardium*. Circulation, 2004. **109**(24): p. 2965-71.

39. Chin, T.K., et al., *Isolated noncompaction of left ventricular myocardium. A study of eight cases.* Circulation, 1990. **82**(2): p. 507-13.
40. Gianni, M., et al., *Apical ballooning syndrome or takotsubo cardiomyopathy: a systematic review.* Eur Heart J, 2006. **27**(13): p. 1523-9.
41. Mueller, K.A., et al., *Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy.* J Card Fail, 2013. **19**(10): p. 678-84.
42. Cresswell, P., *Assembly, transport, and function of MHC class II molecules.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 259-93.
43. Hengstenberg, C., et al., *De novo expression of MHC class I and class II antigens on endomyocardial biopsies from patients with inflammatory heart disease and rejection following heart transplantation.* Eur Heart J, 1993. **14**(6): p. 758-63.
44. Chetty, R. and K. Gatter, *CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice.* J Pathol, 1994. **173**(4): p. 303-7.
45. Chistiakov, D.A., et al., *CD68/macrosialin: not just a histochemical marker.* Lab Invest, 2017. **97**(1): p. 4-13.
46. Seizer, P., et al., *Cyclophilin A affects inflammation, virus elimination and myocardial fibrosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis.* J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(1): p. 6-14.
47. Bloom, B.R. and B. Bennett, *Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity.* Science, 1966. **153**(3731): p. 80-2.
48. David, J.R., *Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **56**(1): p. 72-7.
49. Baugh, J.A. and R. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor.* Crit Care Med, 2002. **30**(1 Suppl): p. S27-35.
50. Thiele, M. and J. Bernhagen, *Link between macrophage migration inhibitory factor and cellular redox regulation.* Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(9-10): p. 1234-48.
51. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment.* Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
52. Lue, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease.* Microbes Infect, 2002. **4**(4): p. 449-60.
53. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 791-800.
54. Bernhagen, J., et al., *MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia.* Nature, 1993. **365**(6448): p. 756-9.
55. Roger, T., et al., *MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4.* Nature, 2001. **414**(6866): p. 920-4.
56. Calandra, T., et al., *Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor.* Nat Med, 2000. **6**(2): p. 164-70.
57. Baugh, J.A. and S.C. Donnelly, *Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation.* J Endocrinol, 2003. **179**(1): p. 15-23.
58. Donn, R.P. and D.W. Ray, *Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule.* J Endocrinol, 2004. **182**(1): p. 1-9.
59. Weber, C., et al., *Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16278-83.
60. Muller, I., et al., *Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory*

- factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice.* J Biol Chem, 2013. **288**(44): p. 31635-45.
61. Lin, S.G., et al., *De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits.* Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1202-8.
 62. Kong, Y.Z., et al., *Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implications for destabilization of human atherosclerotic plaques.* Atherosclerosis, 2005. **178**(1): p. 207-15.
 63. Schober, A., et al., *Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice.* Circulation, 2004. **109**(3): p. 380-5.
 64. Muller, II, et al., *Macrophage migration inhibitory factor is enhanced in acute coronary syndromes and is associated with the inflammatory response.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38376.
 65. Koga, K., et al., *Macrophage migration inhibitory factor provides cardioprotection during ischemia/reperfusion by reducing oxidative stress.* Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(7): p. 1191-202.
 66. Miller, E.J., et al., *Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart.* Nature, 2008. **451**(7178): p. 578-82.
 67. Ma, H., et al., *Impaired macrophage migration inhibitory factor-AMP-activated protein kinase activation and ischemic recovery in the senescent heart.* Circulation, 2010. **122**(3): p. 282-92.
 68. Qi, D., et al., *Cardiac macrophage migration inhibitory factor inhibits JNK pathway activation and injury during ischemia/reperfusion.* J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3807-16.
 69. Tanino, Y., et al., *Role of macrophage migration inhibitory factor in bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(1): p. L156-62.
 70. Schulte, W., J. Bernhagen, and R. Bucala, *Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets-an updated view.* Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 165974.
 71. Kerschbaumer, R.J., et al., *Neutralization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) by fully human antibodies correlates with their specificity for the beta-sheet structure of MIF.* J Biol Chem, 2012. **287**(10): p. 7446-55.
 72. Hare, A.A., et al., *Optimization of N-benzyl-benzoxazol-2-ones as receptor antagonists of macrophage migration inhibitory factor (MIF).* Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(19): p. 5811-4.
 73. Kraemer, S., et al., *MIF-chemokine receptor interactions in atherogenesis are dependent on an N-loop-based 2-site binding mechanism.* FASEB J, 2011. **25**(3): p. 894-906.
 74. Mueller, K.A., et al., *Comparison of Ventricular Inducibility with Late Gadolinium Enhancement and Myocardial Inflammation in Endomyocardial Biopsy in Patients with Dilated Cardiomyopathy.* PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0167616.
 75. Escher, F., et al., *Fractalkine in human inflammatory cardiomyopathy.* Heart, 2011. **97**(9): p. 733-9.
 76. Cooper, L.T., et al., *The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology.* Circulation, 2007. **116**(19): p. 2216-33.
 77. Jiang, L., R.A. Levine, and A.E. Weyman, *Echocardiographic Assessment of Right Ventricular Volume and Function.* Echocardiography, 1997. **14**(2): p. 189-206.
 78. Tamborini, G., et al., *Is right ventricular systolic function reduced after cardiac*

- surgery? A two- and three-dimensional echocardiographic study. *Eur J Echocardiogr*, 2009. **10**(5): p. 630-4.
79. Fisher, M.R., et al., *Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **179**(7): p. 615-21.
 80. Dickstein, K., et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)*. *Eur J Heart Fail*, 2008. **10**(10): p. 933-89.
 81. Seizer, P., et al., *Electrophysiological characterization of scars detected by contrast enhanced magnetic resonance imaging in patients with non-ischemic cardiomyopathy*. *Int J Cardiol*, 2013. **167**(3): p. 1070-2.
 82. Mahrholdt, H., et al., *Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis*. *Circulation*, 2006. **114**(15): p. 1581-90.
 83. Klingel, K., et al., *Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets*. *J Virol*, 1996. **70**(12): p. 8888-95.
 84. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. *CSH Protoc*, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
 85. Goldner, J., *A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes*. *Am J Pathol*, 1938. **14**(2): p. 237-43.
 86. Barcia, J.J., *The Giemsa stain: its history and applications*. *Int J Surg Pathol*, 2007. **15**(3): p. 292-6.
 87. Guesdon, J.L., T. Ternynck, and S. Avrameas, *The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques*. *J Histochem Cytochem*, 1979. **27**(8): p. 1131-9.
 88. Seizer, P., et al., *EMMPRIN and its ligand Cyclophilin A as novel diagnostic markers in inflammatory cardiomyopathy*. *Int J Cardiol*, 2013. **163**(3): p. 299-304.
 89. Zuern, C.S., et al., *Cyclophilin A predicts clinical outcome in patients with congestive heart failure undergoing endomyocardial biopsy*. *Eur J Heart Fail*, 2013. **15**(2): p. 176-84.
 90. Frustaci, A., M. Pieroni, and C. Chimenti, *The role of endomyocardial biopsy in the diagnosis of cardiomyopathies*. *Ital Heart J*, 2002. **3**(6): p. 348-53.
 91. Rutschow, S., et al., *Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(3): p. 646-56.
 92. Tanaka, M., et al., *Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy*. *Br Heart J*, 1986. **55**(6): p. 575-81.
 93. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
 94. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
 95. Smit, V.T., et al., *KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(16): p. 7773-82.
 96. Kallianos, K., G.L. Moraes, and K.G. Ordovas, *Prognostic role of MR imaging in nonischemic myocardial disease*. *Magn Reson Imaging Clin N Am*, 2015. **23**(1): p. 89-94.
 97. Gulati, A., et al., *Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy*. *JAMA*, 2013. **309**(9): p. 896-908.

98. Marasini, D., P. Quatto, and E. Ripamonti, *Assessing the inter-rater agreement for ordinal data through weighted indexes*. Stat Methods Med Res, 2016. **25**(6): p. 2611-2633.
99. Burger-Kentischer, A., et al., *Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(13): p. 1561-6.
100. Bargagli, E., et al., *Analysis of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Respir Physiol Neurobiol, 2009. **167**(3): p. 261-7.
101. Chu, P.Y., et al., *Bone marrow-derived cells contribute to fibrosis in the chronically failing heart*. Am J Pathol, 2010. **176**(4): p. 1735-42.
102. Van Linthout, S., K. Miteva, and C. Tschope, *Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(2): p. 258-69.
103. Westermann, D., et al., *Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(1): p. 44-52.
104. Kindermann, I., et al., *Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis*. Circulation, 2008. **118**(6): p. 639-48.
105. Dominguez, F., et al., *Update on Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy: Reemergence of Endomyocardial Biopsy*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2016. **69**(2): p. 178-87.

7. Eigenanteil

Diese Dissertation enthält Teile des Forschungsartikels “Prognostic impact of macrophage migration inhibitory factor in patients with non-ischemic heart failure undergoing endomyocardial biopsy”, veröffentlicht im International Journal of Cardiology. (Autoren: Karin A.L. Mueller, Johannes Schwille, Saskia Vollmer, Erik Ehinger, Reinhard Kandolf, Karin Klingel, Ulrich Kramer, Meinrad Gawaz, Tobias Geisler, Iris I. Mueller)

Die Konzeption der wissenschaftlichen Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Prof. Dr. med Tobias Geisler, Dr. med. Karin Müller und Dr. med. Iris Mueller.

Erhebung der klinischen Parameter sowie Durchführung der Echokardiographien, Koronarangiographien und Endomyokardbiopsien erfolgten durch die Abteilung Innere Medizin III, Kardiologie und Kreislaufkrankungen, der Universitätsklinik Tübingen.

Die Nested-PCR sowie die histopathologische Analyse der Myokardbiopsien erfolgte durch Reinhard Kandolf und Karin Klingel vom Institut für Molekulare Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Die immunhistochemische Färbung der Myokardbiopsien wurde durchgeführt von Saskia Vollmer.

Die Kardio-Magnetresonanztomographien erfolgten in der Abteilung für Radiologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Mein Beitrag zu der wissenschaftlichen Arbeit lag in der immunhistochemischen Auswertung einschließlich der semiquantitativen Einteilung der mit MIF gefärbten Myokardgewebeschnitte in die unterschiedlichen Färbegrade. Zudem war ich beteiligt an der Erhebung der klinischen Parameter. Ich habe die Nachverfolgung aller 324 Patienten des Patientenkollektivs selbstständig

durchgeführt und die für die Studie relevanten klinischen Parameter in einer Excel-Tabelle selbstständig zusammengetragen. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch Prof. Dr. med. Tobias Geisler, Dr. med. Karin Müller und mich.

Ich habe die Literaturrecherche zu dieser Dissertation selbstständig durchgeführt und die Dissertation selbstständig verfasst. Das englischsprachige Manuskript wurde von Dr. med. Karin Müller und mir selbst verfasst.

Dr. med. Karin Müller war verantwortlich für das Korrekturlesen und die Validierung der Inhalte der Dissertation

8. Veröffentlichungen

Teile der Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Karin A.L. Mueller, Johannes Schwille, Saskia Vollmer, Erik Ehinger, Reinhard Kandolf, Karin Klingel, Ulrich Kramer, Meinrad Gawaz, Tobias Geisler, Iris I. Mueller, *Prognostic impact of macrophage migration inhibitory factor in patients with non-ischemic heart failure undergoing endomyocardial biopsy*, International Journal of Cardiology, 2016, Band 203, Seite 656-659