UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem universitären Herzzentrum Hamburg (UHZ)
Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg

Einfluss von Levosimendan auf die leukozytäre und endotheliale Funktion bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz - eine klinisch- experimentelle Studie -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Henning Hermann Alexander Knors
aus Freiburg i. Br.

Hamburg 2014

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.05.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Baldus

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. D. Böhm

Meinen Eltern

Inhalt

1 Arbeitshypothese und Fragestellung 6

2 Einleitung 7

2.1 Herzinsuffizienz 7

2.1.1 Definition der Herzinsuffizienz 7

2.1.2 Ätiologie der Herzinsuffizienz 7

2.1.3 Epidemiologie der Herzinsuffizienz 9

2.1.4 Einteilung der Herzinsuffizienz nach den Richtlinien der New York Heart Association und der American Heart Association (AHA) 11

2.1.5 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz 12

2.2 Myeloperoxidase 14

2.2.1 Grundlagen 14

2.2.2 MPO bei chronischer Herzinsuffizienz 19

2.2.1 Elastase 20

2.2.2 Endotheliale Funktion 20

2.3 Levosimendan 22

2.3.1 Struktur 22

2.3.2 Inotropie 22

2.3.3 Vasodilatation 23

2.3.4 Pleiotrope Effekte 23

2.3.5 Kardioprotektion 23

2.3.6 Anti-inflammatorische Prozesse/ Effekte von Levosimendan 24

2.3.7 Klinische Studiendaten bei Patienten mit Herzinsuffizienz 24

2.3.8 Pharmakokinetik 25

3 Studiendesign 27

3.1 Einschlusskriterien 27

3.2 Ausschlusskriterien 27

3.3 Abbruchkriterien 28

4 Materialien 29

4.1 Materialien 29

5 Methoden 30

5.1 Methoden in vivo 30

5.1.1 Verarbeitung des Patienten-Blutes 31

5.2 Methoden in vitro 33

5.2.1 In vitro Analyse von Vollblut 33

5.2.2 MPO ELISA 34
5.2.1 PMN Elastase ELISA 34
5.2.2 Nitrat-Nitrit Bestimmung 34
6 Statistik 35
7 Ergebnisse 36
7.1 Das Patientenkollektiv 36
7.2 Ergebnisse Vitalparameter 41
7.2.1 Ergebnisse Herzfrequenz: 41
7.2.2 Blutdruck (RR) 42
7.3 Ergebnisse Gewicht 44
7.4 Ergebnisse Kreatinin 45
7.5 Ergebnisse Hämoglobin 46
7.6 Ergebnisse Entzündungsparameter 47
7.6.1 Leukozyten 47
7.6.2 Ergebnisse Granulozyten 48
7.6.3 Ergebnisse CRP 49
7.6.4 Ergebnisse IL-6 50
7.7 Ergebnisse NT-proBNP 51
7.8 Ergebnisse MPO 52
7.9 Ergebnisse Elastase 54
7.10 Ergebnisse Nitrit 55
7.11 In vitro Ergebnisse von MPO und Elastase unter Stimulation 56
7.12 Zusammenfassung 63
8 Diskussion 66
8.1 Limitationen 78
9 Zusammenfassung 80
10 Abkürzungsverzeichnis 81
11 Patienteninformation 83
12 Patienteneinwilligung 86
13 Literaturnachweis 87
14 Danksagung 97
15 Lebenslauf 98
16 Eidesstattliche Erklärung 99

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Myeloperoxidase (MPO) wird nach Aktivierung von neutrophilen Granulozyten freigesetzt und beeinflusst den Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel. Es vermag an Endothelzellen zu binden und die Oxidation von NO zu beschleunigen. Durch die damit verbundene Abnahme der Bioverfügbarkeit von NO kommt es zur Ausprägung einer endothelialen Dysfunktion. Erhöhte Plasmaspiegel von MPO treten bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie dem akuten Koronarsyndrom, KHK oder Vorhofflimmern auf und sind darüber hinaus mit der Herzinsuffizienz assoziiert.

Für Levosimendan, einen inotropen und vasodilatatorischen Kalzium-Sensitizer mit pleiotroper Wirkung, wurden positive Effekte bei der Behandlung der Dekompensation einer chronischen Herzinsuffizienz beschrieben (Pathak, Lebrin et al. 2013).

Der Effekt von Levosimendan auf die endotheliale und leukozytäre Funktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist bisher nicht ausreichend untersucht worden.

Experimentelle Untersuchungen legen nahe, dass die erhöhte Nachlast bei herzinsuffizienten Patienten zumindest teilweise auf einer vermehrten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und daraus resultierender erhöhter erhöhter endothelial gebundener Bioverfügbarkeit von MPO beruht. Der Nachweis von reduzierten Plasmaspiegeln von MPO nach einer positiv inotropen und nachlastsenkenden Therapie mit Levosimendan könnte weitere Hinweise auf diesen Zusammenhang erkennen lassen.

In dieser monozentrischen, prospektiven Studie soll bei Patienten, die aus klinischer Indikation mit Levosimendan behandelt wurden, anhand sequentieller Bestimmung der MPO-Plasmaspiegel die Hypothese getestet werden, ob eine Behandlung mit Levosimendan mit einer Abnahme der MPO-Plasmakonzentration einhergeht und somit die endotheliale und leukozytäre Funktion günstig beeinflusst.

2 Einleitung

2.1 Herzinsuffizienz

2.1.1 Definition der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz (HI) ist ein Syndrom, welches anhand typischer Symptome und klinischer Zeichen bei bestehender kardialer Struktur- oder Funktionsstörung definiert wird (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008). Die typischen Symptome und klinischen Zeichen umfassen Atemnot, Müdigkeit und Schwäche, Knöchelödeme, Jugularvenenstauung, pulmonale Rasselgeräusche und eine Verlagerung des Herzspitzenstoß (John J.V. McMurray 2012). Entsprechend dieser modernen Definition wird der Tatsache Rechnung getragen, dass ungefähr die Hälfte der Patienten auch trotz erhaltener systolischer Pumpfunktion an Herzinsuffizienz leidet. Herzinsuffizienz mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion ist jedoch das länger bekannte und besser charakterisierte Krankheitsbild, worauf sich, entsprechend der Einschlusskriterien dieser Studie, die weiteren Ausführungen ausschließlich beziehen.

2.1.2 Ätiologie der Herzinsuffizienz

Die koronare Herzkrankheit ist zu ca. 2/3 aller Fälle ursächlich für eine Herzinsuffizienz, gefolgt von Bluthochdruck. Weitere ursächliche Faktoren sind nicht-ischämische Herzerkrankungen. Zu diesen zählen die Dilatative Kardiomyopathie (DCM), die durch Alkohol, Diabetes und Medikamente (u.a. Chemotherapie) induzierte Kardiomyopathie (KM), sowie die peripartale KM. Ebenso werden die virale, hypertensive, metabolische und valvuläre Kardiomyopathie dazugezählt. Auch genetische Faktoren werden als Auslöser diskutiert (Ackerman, Priori et al. 2011). Im Folgenden sind auslösende Faktoren in einer Übersicht dargestellt. Erweiterte Informationen lassen sich den ESC Guidelines zur Herzinsuffizienz von 2012 entnehmen (John J.V. McMurray 2012).

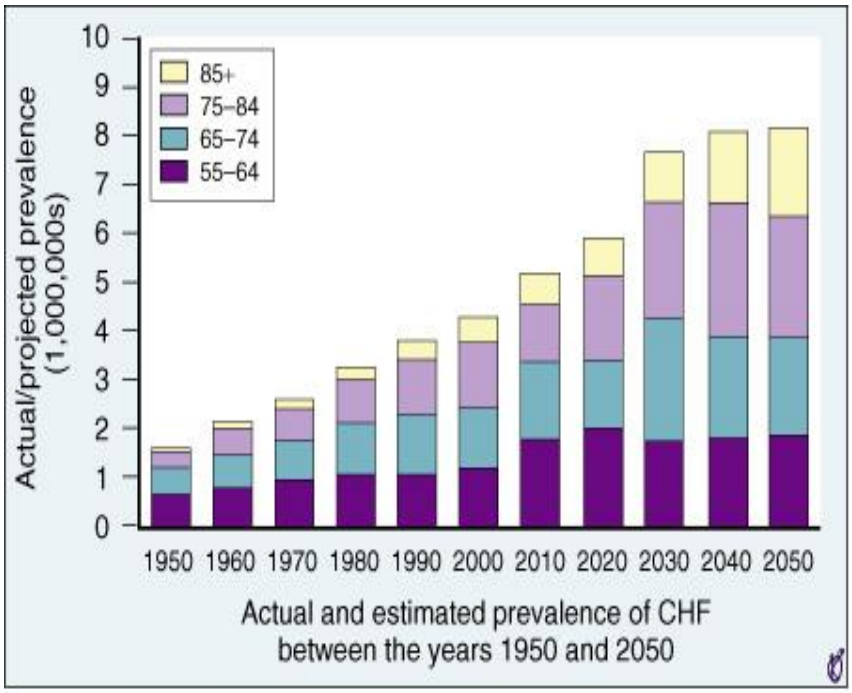
Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die allgemeinen Ursachen der Entstehung einer Herzinsuffizienz.

1. Koronare Herzerkrankung	vielfältige Manifestationen (z. B. Myokardinfarkt, ischämische Kardiomyopathie)
2. Arterielle Hypertonie	oft assoziiert mit LV-Hypertrophie und erhaltener systolischer Pumpfunktion
3. Kardiomyopathien	dilatativ, hypertroph, restriktiv, arrhythmogen, rechtsventrikulär, unklassifiziert
3.1. Medikamentös	Überdosierung von Betablockern, Calciumantagonisten, Antiarrhythmika, Chemotherapeutika
3.2. Toxine	Alkohol, Kokain, Spurenelemente (Kobalt, Arsen)
3.3. endokrinologisch	Diabetes mellitus, Hypo-/Hyperthyreose, Cushing-Syndrom, Nebenniereninsuffizienz, Akromegalie, Phäochromozytom
3.4. Alimentär/metabolisch	Thiaminmangel, Selenmangel, Carnitinmangel, Adipositas, Kachexie
3.5. Infiltrativ	Sarkoidose, Amyloidose, Hämochromatose, Bindegewebserkrankungen
4. Andere	HIV-Infektion, peripartale Kardiomyopathie, terminale Niereninsuffizienz, Chagas-Krankheit

Tabelle 1: Ursachen einer HI aus Pocket Leitlinien der DGK 2009 (Hoppe 2009)

2.1.3 Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Laut Aussage der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) liegt die Prävalenz in der Normalbevölkerung für eine Herzinsuffizienz bei 2-3% (Mosterd and Hoes 2007; Hoppe 2009). Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Lebensalter bei den 70- bis 80- Jährigen auf über 10%. Die Mortalität ist hoch. Laut Statistischem Bundesamt steht die Herzinsuffizienz in der aktuellen Todesursachenstatistik mit 46410 Sterbefällen (entspricht 5,3%) an dritter Stelle (DESTATIS 2012). Dabei verstirbt die Hälfte aller Patienten innerhalb von 4 Jahren, abhängig u.a. von Ätiologie, Alter, Komorbiditäten und der individuellen Progression der Krankheit. 40% der Patienten, die mit der Diagnose Herzinsuffizienz in ein Krankenhaus aufgenommen werden, versterben innerhalb eines Jahres oder werden in dieser Zeit erneut stationär aufgenommen (Hoppe 2009). Vor allem Personen, die älter als 80 Jahre und weiblichen Geschlechts sind, haben ein deutlich gesteigertes Risiko an einer Herzinsuffizienz zu versterben. Herz-Kreislauf- Erkrankungen verursachten im Jahr 2008 mit 3228 Euro die höchsten pro Kopf Krankheitskosten in Deutschland. Dies entsprach insgesamt einem Betrag von 254,3 Milliarden Euro (DESTATIS 2014). Die höchsten Kosten entstanden dabei durch Herzkreislaufleiden mit 37 Milliarden Euro (DESTATIS 2010). Weiter steigende Kosten für das Gesundheitswesen sind zu erwarten und werden eine wichtige ökonomische Rolle im Gesundheitssystem spielen (Zugck, Muller et al. 2010). Weltweit kann ein signifikanter Anstieg der Herzinsuffizienz, vor allem in den Industrienationen, beobachtet werden (Lam, Donal et al. 2011).



Copyright © 2005 by Elsevier Inc.

Abbildung 1: Prävalenz der Herzinsuffizienz (aus Braunwald Heart Disease 7th Edition)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Herzinsuffizienz ein häufig auftretendes Krankheitsbild verbunden mit einer hohen Mortalität ist. Die Herzinsuffizienz hat somit eine große medizinische und ökonomische Relevanz für das Gesundheitswesen (Stewart, MacIntyre et al. 2003; Neumann 2009).

2.1.4 Einteilung der Herzinsuffizienz nach den Richtlinien der New York Heart Association und der American Heart Association (AHA)

Um eine einheitliche Beschreibung der Herzinsuffizienz zu ermöglichen, wurden weltweit gültige Klassifikationssysteme erstellt.
Die Einteilung der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association orientiert sich an den körperlichen Symptomen und dem gezeigten Beschwerdebild.

NYHA-Stadium	**Subjektive Beschwerden**
NYHA I (asymptomatisch)	Beschwerdefreiheit, normale körperliche Belastbarkeit
NYHA II (leicht)	Beschwerden bei stärkerer körperlicher Belastung
NYHA III (mittelschwer)	Beschwerden schon bei leichter körperlicher Belastung
NYHA IV (schwer)	Beschwerden in Ruhe

Tabelle 2: nach NYHA

Eine weitere Klassifikation der Herzinsuffizienz wurde 2001 vom American College of Cardiology (ACC) und der American Heart Association (AHA) vorgestellt. Diese Klassifikation unterscheidet sich gegenüber der Einteilung nach NYHA im Wesentlichen darin, dass die Stadieneinteilung nicht die momentane Symptomatik, sondern stattdessen die Progression der Erkrankung abbildet.

A	hohes Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, z. B. Patienten mit arterieller Hypertonie, Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Adipositas, metabolischem Syndrom, keine strukturelle Herzerkrankung, keine Symptome einer Herzinsuffizienz
B	strukturelle Herzerkrankung, z. B. Patienten nach Myokardinfarkt, keine Zeichen oder Symptome einer Herzinsuffizienz
C	strukturelle Herzerkrankung, z. B. Patienten mit bekannter Herzerkrankung und Dyspnoe und Müdigkeit frühere oder aktuelle Symptome einer Herzinsuffizienz
D	refraktäre Herzinsuffizienz, die ein besonderes Eingreifen erfordert, z. B. Patienten mit Symptomen in Ruhe, trotz umfangreicher medizinischer Therapie

Tabelle 3: Einteilung der Herzinsuffizienz nach AHA, ACC

2.1.5 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Wie bereits erläutert, ist die Herzinsuffizienz keine eigenständige Krankheit, sondern eine multiorganische Funktionsstörung. Betroffen von einer Funktionsstörung sind hierbei vor allem das Herz, die Skelettmuskulatur und die Nierenfunktion.

Die initiale und ursächliche Myokardschädigung des linken Ventrikels führt zu einer verminderten Herzauswurfleistung. Dies führt zu einer Aktivierung mehrerer neurohumeraler Kompensationsmechanismen mit dem Ziel die Herzfunktion zu erhalten, beziehungsweise zu verbessern. Neben dem sympathischen System wird unter anderem auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert, die Konzentration von natriuretischen Peptiden und Vasopressin ist erhöht. Dies führt durch die Erhöhung der Spiegel von Renin, Angiotensin II und Aldosteron im Plasma zu einer Erhöhung des arteriellen und venösen Gefäßtonus. Eine höhere Vor- und Nachlast des Herzens durch erhöhte Noradrenalinspiegel sind die Folge. Die

ständige Kompensation durch sympathische Aktivierung ist mit Apoptose, Hypertrophie und fokalen Nekrosen der Herzmuskelzellen assoziiert (Jackson 2000). Langfristig entsteht durch die chronisch-sympathische Aktivierung ein Circulus vitiosus der strukturelle Umbauprozesse im Myokard in Gang setzt, die letzendlich zu einem myokardialen Elastitzitätsverlust und somit zu einer weiteren Beeinträchtigung der Herzfunktion und dem Fortschreiten der Herzinsuffizienz führen (Modena, Aveta et al. 2001; Lymperopoulos, Rengo et al. 2007).

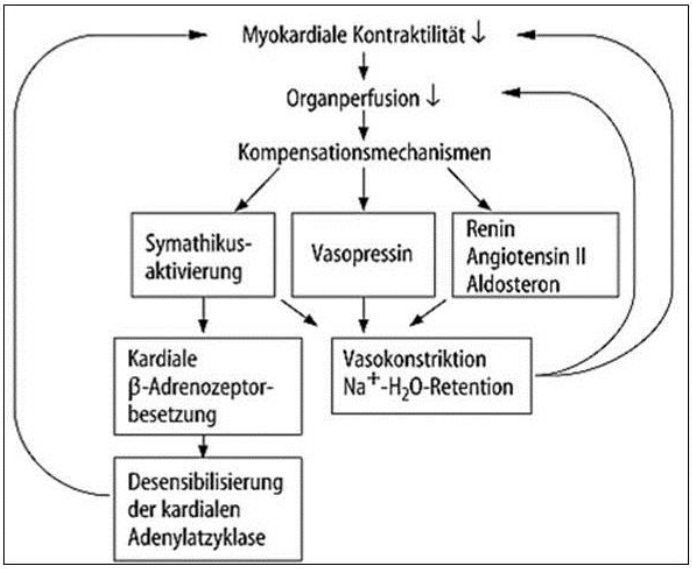


Abbildung 2: Neurohumerale Aktivierung und deren Folgen bei der Herzinsuffizienz des Menschen aus (Hoppe 2011)

Über im Herzen gelegene atriale und ventrikuläre Barorezeptoren (A- und B-Rezeptoren) werden, durch das RAAS hervorgerufene, Druck- und Volumenveränderungen im Kreislauf detektiert und mit der Sezernierung von atrialem natriuretischen Peptid (ANP) im Vorhof und der Sezernierung des natriuretischen Peptids Typ B (BNP) im Ventrikel reagiert. Die Sekretion der natriuretischen Peptide, die als physiologische Antagonisten des RAAS angesehen werden können, haben eine Natriurese, Diurese und Vasodilatation zur Folge (Saito, Nakao et al. 1989; Mukoyama, Nakao et al. 1991). In milderen Stadien der Herzinsuffizienz funktionieren diese Kompensationsmechanismen und es können nur ein gering erhöhter peripherer Widerstand und Blutvolumen gemessen werden (Schrier and Abraham 1999). ANP und BNP wirken als Antagonisten den Effekten von Angiotensin II auf die Gefäßspannung, der Sekretion von Aldosteron und der renal-

tubulären Reabsorbtion von Natrium entgegen. Als weiteres natriuretisches Peptid ist das vom Endothel und zentral-nervösen System ausgeschüttete C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) bekannt. Es hat ebenfalls einen Effekt auf die Vasodilatation und die Natriurese (Jackson 2000; Kalra, Clague et al. 2003; Del Ry, Passino et al. 2006; Del Ry 2013). Vor allem BNP hat eine wichtige Bedeutung als Marker bei Herzinsuffizienz (de Lemos, Morrow et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung der Herzinsuffizienz mit der Höhe der BNP-Werte korreliert (Remme and Swedberg 2001). Dadurch, dass die natriuretischen Peptide als wichtige Mediatoren im Kreislauf fungieren und ihr Anstieg im Plasma bei Patienten mit Herzinsuffizienz früh gemessen werden kann, kommt ihnen eine wichtige prognostische und diagnostische Bedeutung zu (Kohno, Horio et al. 1995; Chen and Burnett 2000; Jackson 2000; Abassi, Karram et al. 2004). ANP und vor allem BNP können somit als unabhängige Faktoren der Mortalität und Morbidität bei Herzinsuffizienz gesehen werden (Maeda, Tsutamoto et al. 2000; Roig, Perez-Villa et al. 2000).

2.2 Myeloperoxidase

2.2.1 Grundlagen

Die als leukozytäre Peroxidase bekannte Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, welches eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr hat, zugleich aber auch bei kardiovaskulär-inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle spielt. Hauptsächlich ist die Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und gewissen Subtypen von Gewebsmakrophagen, wie z. B. Kupffer´sche Sternzellen der Leber zu finden. Insgesamt kann MPO bis zu 5% des Gesamtproteingehalts von Granulozyten ausmachen (Lau and Baldus 2006) (Nicholls and Hazen 2005). MPO hat eine ungefähre molekulare Masse von 150 kD und besteht aus schweren α-Untereinheiten und leichten β- Untereinheiten. Durch Disulfid-Brücken werden die schweren α–Untereinheiten miteinander verbunden, die schweren β-Untereinheiten sind durch mannosereiche Kohlenhydrate und zwei Häm-Moleküle kovalent aneinander gebunden (Klebanoff 2005).

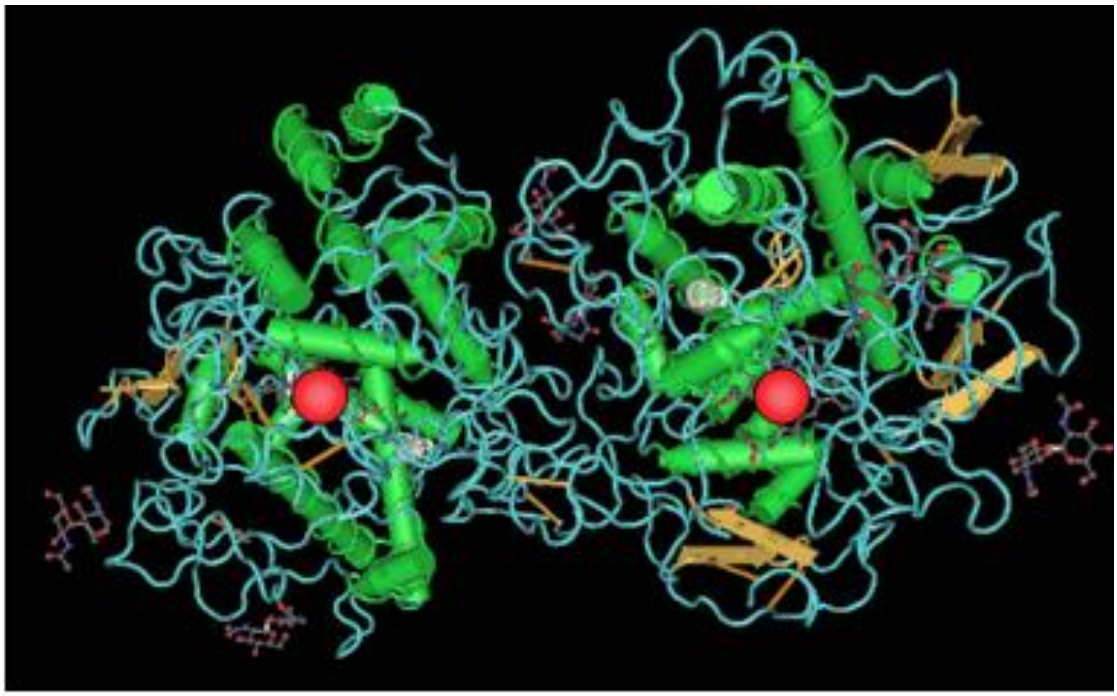


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der homodimeren Myeloperoxidase mithervorgehobenen Häm-Molekülen (rot), Alpha-Helices (grün) und Beta-Faltblatt-Strukturen (gelb). Aus Lau et al., Pharm Ther 2006.

Bereits in den sechziger Jahren konnte Klebanoff feststellen, dass zwischen MPO und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Cosubstrat eine katalytische Aktivität besteht und beschrieb dies als ein in neutrophilen Granulozyten vorkommendes starkes antimikrobielles System (Klebanoff 2005).

2.2.1.1 Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr/ Reaktionen

MPO ist ein basisches Protein und bindet deshalb schnell an negativ geladene Oberflächen. In neutrophile Granulozyten aufgenommen, kann es Mikroorganismen umhüllen oder bindet an biologische Membranen, wenn es aus der Zelle herausgeschleust wurde. Eine Inaktivierung von MPO im nicht-gebundenen-Zustand ist möglich durch Makrophagen, die sich z. B. in der extrazellulären Flüssigkeit befinden. Diese Makrophagen können das Enzym durch Bindung an den Mannoserezeptor phagozytieren (Klebanoff 2005).

Wie bereits oben erwähnt, wird MPO mittels seines Cosubstrats H_2O_2 oxidiert. Dabei wird eine 2-Elektronen Reaktion durchlaufen, bei der MPO in Compound I, seine reaktive Form, versetzt wird.

Die Ausgangsform erreicht MPO wieder, wenn es unter anderem mit Halogenen, vor allem aber dem physiologisch am häufigsten vorkommenden, Chlorid, reagiert. Neben anderen Halogenen kann diese Reaktion auch mit Nitrit (NO_2^-) ablaufen (Nicholls and Hazen 2005).

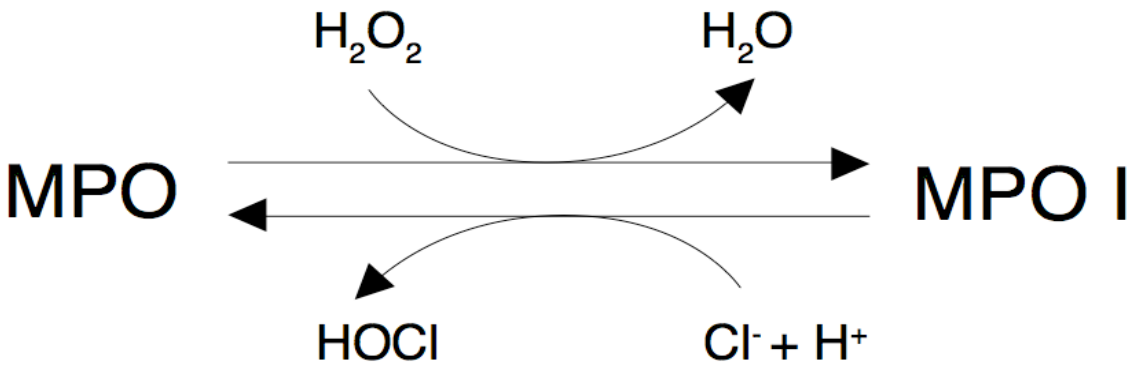


Abbildung 4: Die durch die katalytische Aktivität des MPO ablaufende 2-Elektronen-Reaktion von MPO zu MPO I (= Compound I) und beispielhaft die Rückreaktion mit Chlorid (Coym 2011)

Findet eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten statt, wird sowohl in den Extrazellulärraum als auch in die Phagosomen neben Hydrogenperoxid und Superoxid auch MPO ausgeschüttet. Hierbei findet, wie in der oben gezeigten Abbildung, die Reaktion der Myeloperoxidase zusammen mit seinem Cosubstrat H_2O_2 statt, bei der schließlich hypochlore Säure (HOCl) entsteht. HOCl wiederum wirkt bakterizid und antiviral (Eiserich, Baldus et al. 2002; Baldus, Heitzer et al. 2004; Nicholls and Hazen 2005).

Es konnte in in-vitro Versuchen gezeigt werden, dass die Myeloperoxidase eine immunkompetente Wirkung besitzt (Eiserich, Baldus et al. 2002). MPO scheint dabei eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Vorgängen zu spielen. Um erfolgreiche Strategien zur Behandlung der akuten und chronischen Inflammation zu entwickeln sind weitere Forschungen jedoch abzuwarten (Nussbaum, Klinke et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit, dass Compound I wieder in seine Ausgangs- und Ursprungsform zurückkehrt, besteht darin, dass zwei aufeinander folgende Ein-Elektronen-Reduktionen stattfinden, bei denen durch Oxidation niedermolekulare Reduktionsmittel, wie zum Beispiel Tyrosin, zu Radikalen werden (hier: Tyrosyl-Radikale), die direkt mit NO reagieren können.

Bei dieser Reaktion entsteht Nitrit ($NO2^-$) und NO wird abgebaut. Als Endprodukt ist das sogenannte Compound II entstanden.

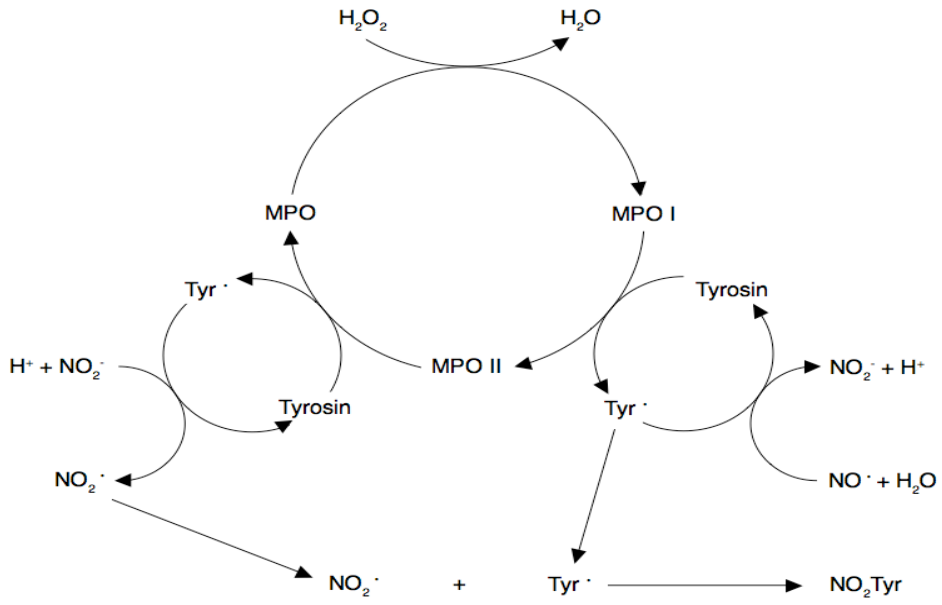


Abbildung 5: Der große Reaktionenkreislauf der durch MPO katalysierten Reaktionen: Zwei 1-Elektron Reaktionen über MPO II (= Compound II) zur Ausgangsform. Beispielhaft wird die NO Konsumption anhand der Reaktion mit Tyrosin verdeutlicht. H2O2: Wasserstoffperoxid, NO2-: Nitrit, NO2: Stickstoffdioxid, NO2Tyr: Nitrotyrosin (Klinke 2009)

Im Nagermodell konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), das in den azurophilen Granula gespeicherte MPO freisetzt. In weiteren Studien konnte bestätigt werden, dass eine erhöhte Granulozytenaktivierung eine erhöhte lokale Ausschüttung von MPO zur Folge hat. Durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Heparin-Glykosaminoglykanen bindet das soeben freigesetzte MPO an Endothelzellen und gelangt durch Transzytose in den subendothelialen Raum. Durch die gemeinsame Reaktion mit seinem Cosubstrat H_2O_2 greift das noch aktive MPO in die NO abhängige Signalkaskade ein und baut

das vom Endothel stammende NO katalytisch ab (Baldus, Heeschen et al. 2003; Brennan and Hazen 2003; Mollnau, Schulz et al. 2003). Durch die Oxidation entsteht aus NO Nitrit, welches weiterreagiert und schließlich zum Stickstoffdioxid wird (Baldus 2001; Klebanoff 2005).

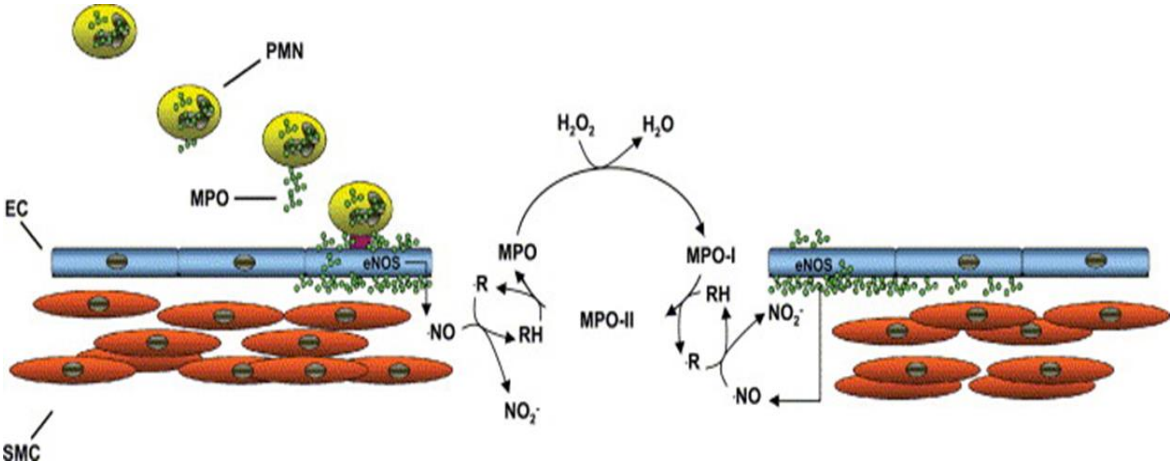


Abbildung 6: Oxidation von NO durch die Myeloperoxidase (Baldus, Rudolph et al. 2006)

Weitere Forschungen im Nagermodell zeigten, dass MPO-defiziente Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine Verschlechterung der Endothelfunktion nach Lipopolysaccharid-Infusion aufwiesen. Somit konnte im Tiermodell bewiesen werden, dass das Vorhandensein von MPO einen direkten Einfluss auf die Gefäßfunktion hat und diese verschlechtert (Eiserich, Baldus et al. 2002). Weiterhin kommt es durch die MPO-katalysierten Reaktionen zu aggravierter endothelialer Dysfunktion. Durch die verminderte Bioverfügbarkeit von NO und durch weitere Reaktionsprodukte von MPO wie Stickstoffdioxid und HOCl wird die Entstehung von Nitrotyrosin erhöht und so eine strukturelle Veränderungen der Gefäße begünstigt (Lau and Baldus 2006).

Dieses ist auch von klinischer Relevanz. Bei KHK Patienten konnte gezeigt werden, dass die NO abhängige Zunahme des Unterarmblutflusses invers mit dem MPO Plasmaspiegel korreliert (Baldus, Heitzer et al. 2004). Untersuchungen in vivo zeigten, dass bei Patienten mit erhöhten MPO Konzentrationen im Plasma und in Leukozyten das Vorkommen einer KHK deutlich erhöht war (Zhang, Brennan et al. 2001). Auch waren initial gemessene hohe MPO Werte bei Patienten mit Angina

Pectoris Beschwerden ein guter unabhängig prädiktiver Wert zur Vorherbestimmung des Risikos für myokardiale Ischämien (Brennan, Penn et al. 2003).

Diese Ergebnisse stützend, konnte in Follow-Up Studien gezeigt werden, dass bei augenscheinlich gesunden Patienten/Probanden, deren MPO-Werte im Plasma erhöht waren, eine positive Korrelation des Risikos für das Auftreten einer KHK bestand (Meuwese, Stroes et al. 2007).

2.2.2 MPO bei chronischer Herzinsuffizienz

MPO kann als relevanter prognostischer Faktor für eine Herzinsuffizienz angesehen werden (Rudolph, Rudolph et al. 2007). Tang et al. konnte zeigen, dass die Plasma-MPO-Spiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz, im Gegensatz zu denen der gesunden Kontrollgruppe, signifikant erhöht waren. Die Höhe der MPO-Plasmaspiegel korrelierte dabei mit den im Plasma gemessenen BNP-Werten. Außerdem stieg der MPO-Spiegel parallel mit der Erhöhung der Stufe in der NYHA-Klassifikation (Tang, Brennan et al. 2006). Verschiedene weitere Studien zeigten ebensolche Ergebnisse. Immer konnte ein Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der MPO-Plasmaspiegel und einer Herzinsuffizienz hergestellt werden (Tang, Brennan et al. 2006).

In weiteren Studien wurden Hinweise gefunden, dass MPO bei akuter chronischer Ischämie das myokardiale Remodeling verschlechtert (Askari, Brennan et al. 2003; Vasilyev, Williams et al. 2005) und die Perfusion des Myokards durch seine Eigenschaften als NO-oxidierendes Molekül beeinträchtig. Dieser Vorgang führt schlussendlich zu einer Beeinträchtigung/ Verminderung der Kammerfunktion (Bauersachs and Schafer 2004; Baldus, Koster et al. 2005; Baldus, Mullerleile et al. 2006).

2.2.1 Elastase

Ein weiterer unabhängiger Marker für eine Aktivierung von PMNs ist das Enzym Elastase. Es wird wie MPO ebenfalls von neutrophilen Granulozyten gespeichert und bei Aktivierung in das Plasma ausgeschüttet (Shapiro, Campbell et al. 1991). Elastase kann als Verlaufsparameter bei der Progression der chronischen Herzinsuffzienz herangezogen werden. So wurden in einer Studie mit weiblichen Patienten mit KHK und angiographisch gesicherten Koronarstenosen, signifikant erhöhte Elastasekonzentrationen beobachtet (Amaro, Gude et al. 1995). Bestätigt wurde dies durch Studien bei Patienten, die an einer hochgradig eingeschränkten LV–Funktion litten und nach Implantation eines linksventrikulären Herzunterstützungssystems (LVAD) einen deutlichen Abfall ihrer Elastasespiegel im Serum zeigten (Clark, Loebe et al. 2001). Mehta et al. konnte dies bereits Ende der Achtziger Jahre in Studien bei der ischämischen Herzerkrankung nachweisen (Mehta, Dinerman et al. 1989).

Elastase spielt ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenabwehr in Synergie mit MPO. Bakterien, Pilze und Parasiten können durch Elastase bekämpft werden (Urban, Reichard et al. 2006; Guimaraes-Costa, Nascimento et al. 2009; Ramos-Kichik, Mondragon-Flores et al. 2009). Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht verstanden (Papayannopoulos, Metzler et al. 2010).

Elastase wurde in der vorliegenden Studie als zusätzlicher Parameter bestimmt, um eine vermehrte Degranulation von Leukozyten für die möglichen Veränderungen der MPO-Plasmaspiegel zu detektieren.

2.2.2 Endotheliale Funktion

Das Endothel reagiert auf Veränderungen der Stromstärke des Blutes im Kreislauf mit einer Änderung seiner Gefäßweite und somit einer Erweiterung oder Verengung seines Lumens. Der ausschlaggebende Reiz hierfür ist die Scherkraft des Blutes, auch als „shear stress“ bezeichnet. Die Änderungen des Gefäßlumens werden durch vasoaktive Substanzen wie Stickstoffmonoxid, Prostazyklin, Angiotensin II, Endothelin sowie PGE2 gesteuert (Ludmer, Selwyn et al. 1986). Furchgott et al. beschrieb, dass nur bei intaktem Endothel eine Relaxation der glatten Muskelzellen

und so eine Dilatation des Gefäßes durch Acetylcholin stattfindet. Fehlte das Endothel, so kam es stattdessen zu einer Konstriktion der glatten Gefäßmuskulatur. Sie schlossen daraus, dass das Endothel eine Substanz produziert die für die Freisetzung von Acetylcholin verantwortlich ist und bezeichneten sie als EDRF (Endothel derived relaxing factor) (Furchgott and Zawadzki 1980).

Ignarro et al. konnte Ende der Achtziger Jahre Stickstoffmonoxid als das für die EDRF-Aktivität verantwortliche Gas identifizieren (Ignarro, Buga et al. 1987). Abbildung 7 zeigt den Vorgang der Endothelfunktion.

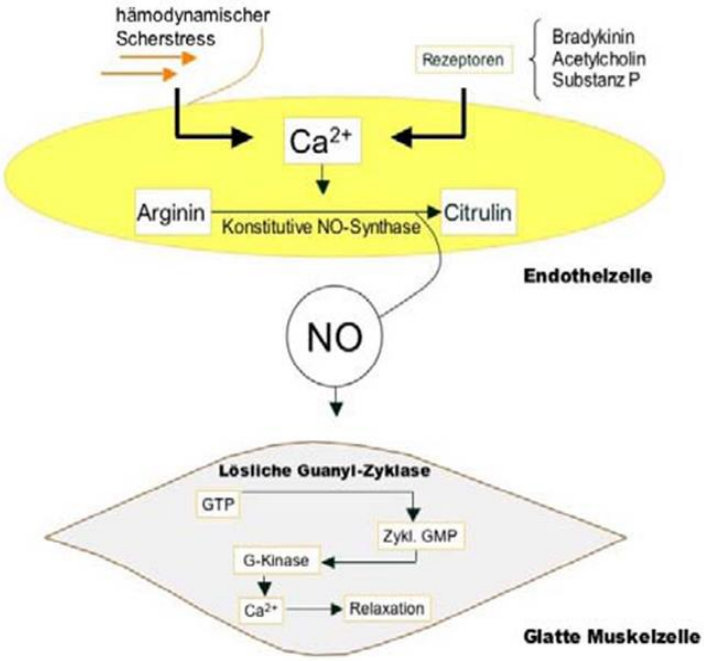


Abbildung 7: Das endotheliale L-Arginin/NO-System. Durch Blutflussänderungen ausgelöste Schubspannung oder Rezeptor-Agonisten (Bradykinin, Acetylcholin, Substanz P u. a.) stimulieren die endotheliale NO-Synthase, die aus L-Arginin NO bildet und freisetzt. NO diffundiert zum glatten Gefäßmuskel und aktiviert dort die lösliche Guanylcyclase, die durch cGMP-Bildung und darauf folgender Erniedrigung der Calciumkonzentration zur Relaxation führt (aus Drexler, 2000).

2.3 Levosimendan

2.3.1 Struktur

Levosimendan ist ein intravenöser Wirkstoff aus der Substanzgruppe der Kalzium-Sensitizer und wird zur Behandlung der akut dekompensierten Herzinsuffizienz eingesetzt. Es besitzt die Strukturformel $C_{14}H_{12}N_6O$ (Abb.8) mit dem chemischen Namen ("R")-2-[[4-[4-Methyl-6-oxo-4,5-dihydro-1*H*-pyridazin-3-yl] phenyl] hydrazinyliden] propandinitril (IUPAC).

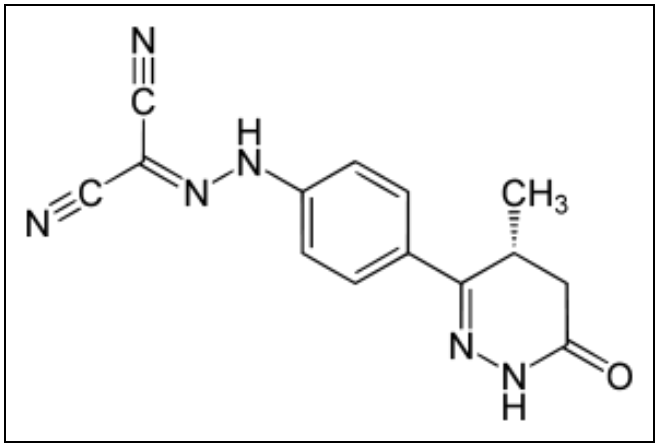


Abbildung 8: Chemische Struktur von Levosimendan

2.3.2 Inotropie

Levosimendan wirkt durch eine Stabilisierung der Bindung des kardialen Troponin C mit Kalzium positiv inotrop (sog. Kalzium-Sensitivierung). Troponin C ist eine der 3 Troponin-Untereinheiten und wirkt als ein von der Kalzium-Konzentration abhängiger molekularer Regulator der myokardialen Kontraktion. Durch Levosimendan kommt es zu einer verlängerten Interaktion zwischen Troponin C und Troponin I, und somit zu einer erhöhten Kontraktionskraft (Papp, Edes et al.). Bemerkenswerterweise enfaltet Levosimendan seine Wirkung ohne das intrazelluläre Kalzium und somit ohne den myokardialen Sauerstoffverbrauch zu erhöhen, wie es für andere Wirkstoffe, die über die β-Rezeptor-cAMP–Proteinkinase A–Signalkaskade wirken, typisch ist (Lunghetti, Palmerini et al. ; Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008)

2.3.3 Vasodilatation

Durch Öffnung von ATP-sensitiven Kalium-Kanälen und der dadurch bedingten Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur besitzt Levosimendan vasodilatatorische Effekte. Diese Wirkung konnte im pulmonal-arteriellen Strombett (Kivikko and Lehtonen 2005), in den Koronargefäßen, den Arterien der Mamma (Michaels, McKeown et al. 2005; Akar, Manavbasi et al. 2007) sowie im arteriellen und venösen peripheren Gefäßsystem (Antila, Sundberg et al. 2007) nachgewiesen werden.

2.3.4 Pleiotrope Effekte

Neben den Effekten von Levosimendan auf die Kontraktilität des Myokards und auf das endotheliale Gefäßsystem werden weitere pleiotrope Effekte von Levosimendan beschrieben. Diesen pleiotropen Effekten wird eine wichtige Rolle für die klinischen und prognostischen Folgen bei der akuten Herzinsuffizienz zugeschrieben (Parissis, Andreadou et al. 2008).

2.3.5 Kardioprotektion

Während einer akuten Exazerbation der Herzinsuffizienz findet aufgrund der Ischämie, der erhöhten mechanischen Beanspruchung, Inflammation, oxidativem Stress und der Erhöhung der Produktion neurohumeraler Hormone, resultierend in einem fortschreitenden Herzversagen, ein erhöhter zellulärer Verlust an Herzmuskelzellen statt. In Studien wurde vermutet, dass Levosimendan kardioprotektive Effekte besitzt, indem es durch die Aktivierung von ATP-abhängigen Kalium-Kanälen (K_{ATP}) die mitochondriale Apoptose hemmt (Maytin and Colucci 2005). Nieminen et al. konnte in Studien zeigen, dass Levosimendan nicht zu einer Erhöhung von Troponin T führt (Nieminen, Akkila et al. 2000). In weiteren Studien wurden Hinweise darauf gefunden, dass Levosimendan neben seinen hämdodynamischen Effekten, K_{ATP}-Kanäle sowohl in der Plasmamembran als auch in der mitochondrialen Matrix der Herzmuskelzellen aktiviert (Kopustinskiene, Pollesello et al. 2001; Maytin and Colucci 2005). In weiteren Studien wurde durch

O´Rourke bestätigt, dass die Aktivierung mitochondrialer K_{ATP}-Kanäle der Herzmuskelzellen eine wichtige Rolle im Mechanismus der kardioprotektiven Effekte einnimmt (O'Rourke 2004).

2.3.6 Anti-inflammatorische Prozesse/ Effekte von Levosimendan

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Herzinsuffizienz gleichzeitig mit erhöhten Plasmaspiegeln von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF-alpha, IL-6 und IL-beta1 einhergehen und den oxidativen Stress erhöhen, welcher wiederum für die erhöhte Apoptoserate der Herzmuskel- sowie der Endothelzellen verantwortlich ist (Seta, Shan et al. 1996; Sasayama, Matsumori et al. 1999). Auch konnte in verschiedenen Arbeiten ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Plasmaspiegel von TNF-Alpha und IL-6 mit Beschleunigung des Krankheitsverlaufes und der Erhöhung der Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz festgestellt werden (Torre-Amione, Kapadia et al. 1996; Tsutamoto, Hisanaga et al. 1998; Plenz, Song et al. 2001).

Gleichzeitig weisen spätere Studien daraufhin, dass Levosimendan durch Verringerung der Zirkulation von pro-inflammatorischen Zytokinen und löslichen Induktoren von Apoptose anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften besitzt (Parissis, Adamopoulos et al. 2004; Avgeropoulou, Andreadou et al. 2005; Kyrzopoulos, Adamopoulos et al. 2005).

2.3.7 Klinische Studiendaten bei Patienten mit Herzinsuffizienz

Verschiedene Studien wie REVIVE I und II, SURVIVE, LIDO und RUSSLAN konnten letztlich eine Überlegenheit bei der Behandlung mit Levosimendan bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (AHF) gegenüber der Behandlung mit klassischen Medikamenten, zum Beispiel Dobutamin, aufzeigen.

In der LIDO-Studie (Follath, Cleland et al. 2002) zeigte Levosimendan einen dosisabhängigen Anstieg der Auswurfleistung, des Schlagvolumens, eine dosisabhängige Verminderung des pulmonal-kapillären Verschlussdruckes, des

mittleren arteriellen Drucks und des gesamten peripheren Widerstandes. Nur 15% der Patienten, die mit Dobutamin behandelt wurden erreichten diese Werte. Nach einer Behandlung mit Levosimendan zeigten 68% der Patienten mit Dyspnoe eine Verbesserung ihrer Symptomatik auf dem Dyspnoe-Score. Im Vergleich konnte dies nur bei 59% der Patienten nach einer Dobutamin-Behandlung beobachtet werden.

Auf Grund von Variationen in der Applikationsform (mit Bolusgabe vs. keine Bolusgabe) kam es jedoch, besonders in der REVIVE-Studie (Packer, Colucci et al. 2003; Teerlink, Massie et al. 2006), zunächst zu einer höheren Mortalitätsrate bei den mit Levosimendan behandelten Patienten. Diese konnte in der LIDO- und RUSSLAN-Studie (Moiseyev, Poder et al. 2002) nicht mehr nachgewiesen werden. Im Zeitraum bis zu 6 Monaten konnte in diesen Studien kein negativer Effekt auf die Überlebensrate beobachtet werden (Follath, Cleland et al. 2002; Moiseyev, Poder et al. 2002), jedoch wurde Levosimendan aufgrund der Studienlage zunächst nicht in Deutschland zugelassen.

Insgesamt konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Behandlung der akut dekompensierten Herzinsuffizienz mit Levosimendan Vorteile gegenüber der klassischen Behandlung mit Dobutamin hat und die Mortalität sogar gesenkt wird (Landoni 2010). Patienten, die nicht auf eine Therapie mit Diuretika und Vasodilatatoren ansprachen, hatten Vorteile in der Symptomregression durch die Behandlung mit Levosimendan (Earl and Fitzpatrick 2005).

2.3.8 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von Levosimendan wurde an gesunden Probanden und Patienten mit einer milden Herzinsuffizienz untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Levosimendan einer Halbwertszeit von nur ungefähr 1 Stunde unterliegt und zu 97-98% an Proteine im Plasma gebunden vorkommt (Sandell, Hayha et al. 1995). Es unterliegt einem ausgeprägten Stoffwechsel, dem sich die Exkretion seiner Metabolite durch Urin und Faeces anschließt (Lehtonen 2001). Den Haupteliminationsweg stellt die Konjugation mt Glutathion dar. Über einen anderen Eliminationsweg entstehen durch Reduktion von anaeroben Bakterien zwei Metabolite, das OR-1855 und das OR-1896 (Antila, Jarvinen et al. 1997).

Interessanterweise beträgt, wie oben bereits genannt, die Halbwertszeit von Levosimendan nur etwa 1Stunde (Sandell, Hayha et al. 1995). Der therapeutische Wirkspiegel konnte nach 3-4 Stunden unter konstanter Infusionsrate erreicht werden (Kivikko, Lehtonen et al. 2003). Die Halbwertszeit seiner beiden aktiven Metabolite OR-1855 und OR-1896 beträgt 75-78 Stunden (Karlsson, Korkolainen et al. 1997; Kivikko, Antila et al. 2002). In einer weiteren Studie wurde die Halbwertszeit für die Metabolite, je nach Höhe der Dosierung, mit 81± 37 Stunden bzw. 81± 28 Stunden angegeben (Antila, Kivikko et al. 2004).

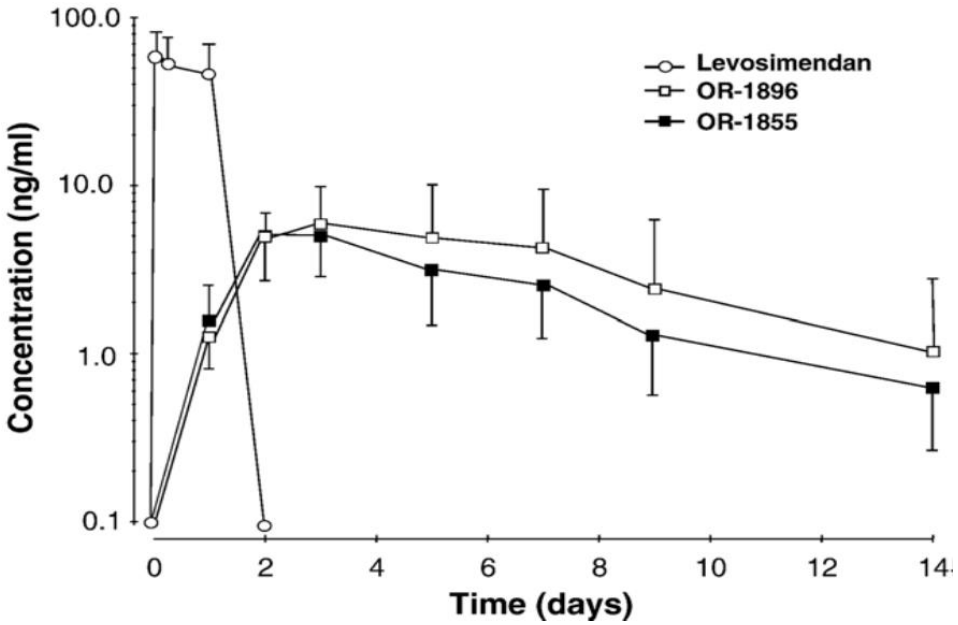


Abbildung 9: Durchschnittswerte von Levosimendan und seinen Metaboliten nach einer 24 Stunden Infusion bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Aus (Lilleberg, Laine et al. 2007)

Aus diesen Erkenntnissen wurde geschlossen, dass die langandauernden Effekte von Levosimendan nicht nur auf die Muttersubstanz, sondern auch auf ihre beiden aktiven Metabolite zurückzuführen sind, deren Konzentration 24 Stunden nach Beendigung der Levosimendangabe anstieg (Kivikko, Lehtonen et al. 2003).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bis zu 1 Woche anhaltenden Effekte einer Levosimendangabe als 24 Stunden-Infusion, höchstwahrscheinlich auf die Bildung der beiden aktiven Metabolite OR-1855 und vor allem OR-1896 des Levosimendans zurückzuführen sind (Lilleberg, Laine et al. 2007).

3 Studiendesign

3.1 Einschlusskriterien

Die Studie rekrutierte ausschließlich Patienten mit der Diagnose einer terminalen chronischen Herzinsuffizienz, die folgende Kriterien erfüllten:

- Terminale Herzinsuffizienz (NYHA Klasse III-IV, Stadium D nach ACC/AHA 2005)
- Klinische Zeichen der Dekompensation mit Indikation zu einer Therapie mit der positiv inotropen Substanz Levosimendan
- Linksventrikuläre Ejektions-Fraktion von < 30% in TTE oder MR innerhalb von 14 Tagen vor Einschluss in die Studie
- Mindestalter: 18 Jahre

3.2 Ausschlusskriterien

Entsprechend der bekannten Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung von Levosimendan und zum Ausschluss von Störfaktoren für die Validität der MPO-Messung wurden Patienten mit folgenden Kriterien von der Studie ausgeschlossen:

- Eine bekannte chronische, schwere Niereninsuffizienz mit einer Kreatinin-Clearance < 30ml/min (mittels der MDRD Formel errechnet)
- Eine schwere Leberfunktionsstörung mit einem Bilirubinwert > 2.0 mg/dl
- Eine schwere akute oder chronische Lebererkrankung
- Das systemische Entzündungssyndrom (SIRS) oder eine stattgehabte Sepsis innerhalb der letzten 2 Wochen vor Studieneinschluss
- Die Einnahme von entzündungshemmenden Substanzen
- Eine andere oder zusätzliche Therapie mit Katecholaminen oder Phosphodiesterasehemmstoffen während des Studienzeitraumes

- Patienten, die das 18. Lebensjahr noch nicht vollendet haben, die nicht zustimmungs- oder einwilligungsfähig oder Teilnehmer an einer anderen Studie sind

3.3 Abbruchkriterien

Folgende individuelle und klinische Abbruchkriterien wurden berücksichtigt:

Individuelle Kriterien:

- Widerruf der Zustimmung zum Einschluss in die Studie durch den Patienten
- Die Verweigerung von Maßnahmen, die in Zusammenhang mit der Studie standen, wie zum Beispiel die notwendigen Blutentnahmen.

Klinische Kriterien:

- Weitere, akute Verschlechterung des Patientenzustandes und die damit einhergehende Indikation zum Ausbau der Therapie mit inotroper Unterstützung durch Katecholamine oder Phosphodiesterasehemmstoffe
- Reanimation und/ oder Bewusstlosigkeit des Patienten
- Transfusion oder Infusion von Plasmabestandteilen

4 Materialien

4.1 Materialien

Dextran	Dextran from Leuconostoc mesenteroides/ Sigma®
EDTA	Sigma®
Elastase ELISA	PMN-Elastase ELISA IBL International
Falcon	Cellstar, Tubes/ greiner bio one
Filter 0,22µm	Millex GS Filter Unit/ MF Millipore Membrane
Glucose 5% 500ml	B.Braun®, Germany
Griess Regent R1+ R2	Cayman Chemical Company
H_2O	Ampuwa®/ Fresenius Kabi
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution, GIBCO®
Histopaque®-	Sigma Aldrich
Mini- Spike	B.Braun®
MPO ELISA	CardioMPO/ ClevelandHeartLab
Natriumchlorid-Lösung, 0,9%	B.Braun® (Melsungen)
Nitrat/Nitrit	Cayman´s Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit. (Cayman Chemical Company)
OD Messung	MRX/ Dynex Technologies
Perfusor- Spritze	B.Braun®
Pipetten	Gilson
PMN- Elastase ELISA	ELISA IBL International
Saugpipette	Hirschmann Laborgeräte
Simdax®	Hersteller: Orion Corporation, Orionintie 1A, Finland
Spritzen	B.Braun®
Zentrifuge	Eppendorf®

Tabelle 4: Materialien

5 Methoden

5.1 Methoden in vivo

Nach der Feststellung der Indikation für eine Behandlung mit Levosimendan und Einschluss des Patienten in die Studie, wurde den Probanden ein zentralvenöser Katheter (ZVK) gelegt. Punktiert wurden hier, lege artis, die V. jugularis interna oder V. subclavia.

Nach erfolgter Punktion wurde standardmäßig eine Röntgen-Thoraxaufnahme angefertigt und direkt vor der Gabe von Levosimendan Blut für die sogenannte Baseline Bestimmung abgenommen. Es erfolgte bei jeder Blutentnahme (BE) die Abnahme von 3 EDTA-Röhrchen á 2,7ml, eines 7,5ml Serum-Röhrchens und eines NH4+-Heparinröhrchens á 5,5ml. Ebenfalls wurde zu jeder BE eine Blutgasanalyse (BGA) durchgeführt.

Die Levosimendan-Gabe erfolgte kontinuierlich als Dauerinfusion mittels eines Infusiomaten (B.Braun, Germany). Levosimendan (12,5mg Simdax, Orion Oyi, Finnland) wurde in 500ml 5%iger Glucoselösung (B.Braun, Germany) verabreicht. Die Standardlaufrate der Infusion mit einer Konzentration von 0,025mg/ml betrug 21ml/h. Bei unerwünschten Arzneimittelreaktionen wie Hypotonie, Schwindel, Kopfschmerz etc., konnte die Laufrate gesenkt oder temporär gestoppt werden (maximal 1 Stunde). Die Dosierung erfolgte daraufhin individualisiert auf Anweisung des diensthabenden Arztes.

In allen Fällen erfolgte bei den im UHZ des Universitätsklinikum Hamburg bekannten Patienten eine Kardioechographie.

Bei Studieneinschluss wurden weiterhin demographische und anamnestische Daten wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und koronare Risikofaktoren, bzw. koronare Vorerkrankungen, erhoben. Ebenfalls wurde die aktuelle Belastbarkeit nach NYHA bestimmt. Die Aufnahme in das Studienprotokoll wurde von jeweils einem der insgesamt 2 zugelassenen Studienärzte in standardisierter und reproduzierbarer Art und Weise durchgeführt.

5.1.1 Verarbeitung des Patienten-Blutes

Gemäß dem Studienaufbau wurde den Patienten vor der Gabe der Levosimendan-Infusion Blut für die Baseline Untersuchung abgenommen. Die 2. Blutentnahme (BE) erfolgte 1 Stunde nach Start der Infusion, die 3. BE nach 6 Stunden, die 4. BE nach 24 Stunden. 24 Stunden nach Ende der Levosimendan-Infusion erfolgte die 5. BE. Dieser Zeitpunkt konnte, je nachdem wie gut die Infusion individuell vertragen wurde, variieren. Die letzte, im Studienprotokoll festgelegte Blutentnahme fand 7 Tage (=168 Stunden) nach Beginn der Infusion statt und beendete gleichzeitig die Teilnahme der Patienten an der Studie.

Skizze Studienablauf:

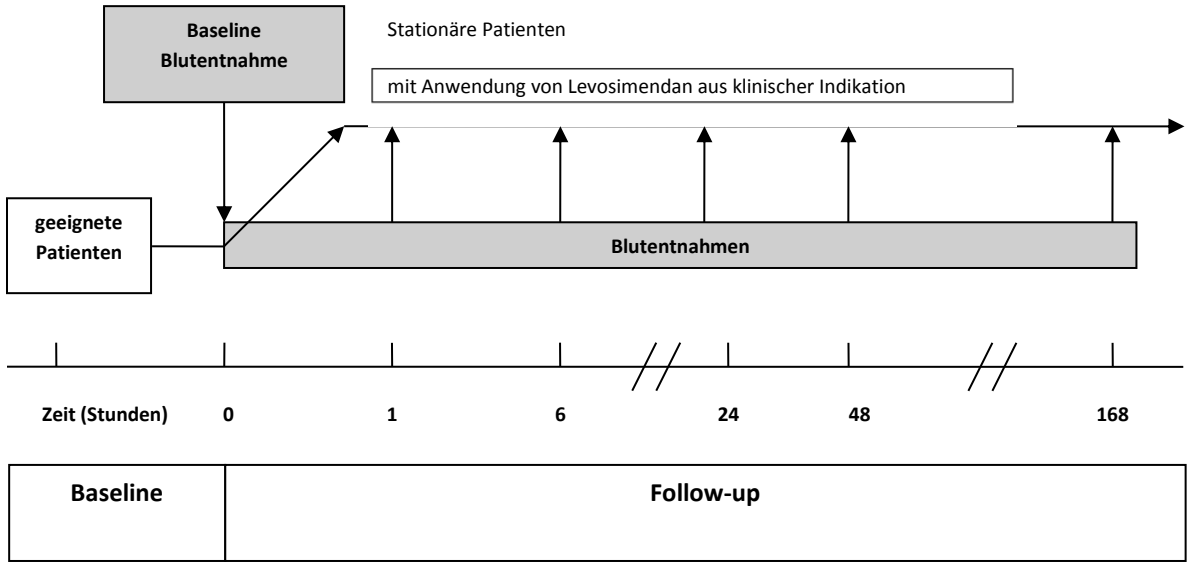


Abbildung 10: Skizze des Studienablaufes

Folgende Werte wurden durch ein zertifiziertes Zentrallabor bestimmt:

- Differential-Blutbild
- hsCRP
- NT-proBNP
- Interleukin-6

Parameter	**Assay/ Bestimmung**
Differential-Blutbild	Durchflusszytometrie, Siemens Advia
Hb	Photometrisch
Interleukin-6	Antibody-ECLIA, Roche
NT-proBNP	LOCI-Test (Fa. Siemens)
CRP, hsCRP	Nephelometrischer Immuno-assay, Siemens
Granulozyten	Photometrisch

Tabelle 5: Bestimmung der Blutproben und zugehörige Messmethode

Gleichzeitig wurde ein Standard Routine-Labor, Transaminasen (AST, ALT, GGT), Bilirubin und Kreatinin beinhaltend, im Zentrallabor der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bestimmt.

Jeweils 2 EDTA–Röhrchen wurden zügig im eigenen Forschungs-Labor verarbeitet. EDTA wurde vor allem aus dem Grund verwendet, da Heparin MPO aus seiner Bindung mit endothelialen Glykosaminen herauszulösen vermag, und damit die gemessenen MPO-Plasma-Spiegel artifiziell erhöht worden wären (Baldus, Rudolph et al. 2006).

Das Blut wurde mit 1000rpm 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und mit Stickstoff schnell herabgekühlt. Bei -80°C wurden die Proben weggefroren und gelagert.

Im Zuge der Blutentnahme wurde immer eine venöse BGA angefertigt (Radiometer ABL 90 SERIE).

5.2 Methoden in vitro

5.2.1 In vitro Analyse von Vollblut

EDTA-Blut wurde für die in vitro Versuche von gesunden Probanden gewonnen und für 6 Stunden mit Levosimendan (500ng/ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Aus der Levosimendan-Orginallösung (Simdax®) mit 2,5 mg/ml wurde zunächst eine Zielkonzentration von 2,5ng/µl in einer 1:1000 Verdünnung (5µl Levosimendan: 4995µl HBSS+ 0,25% BSA) hergestellt.
In jedes Well der ELISA-Platte, welches zur Levosimendan-Gruppe gehört, mit einem Volumen von 800µl, wurden 200 µl einer 1: 1000 Verdünnung (mit HBSS + 0,25% BSA) pipettiert.
Im Anschluss an die sechsstündige Inkubation mit Levosimendan erfolgte die Stimulation mit 20µl HBSS + 0.25% BSA (Kontrolle) oder mit 20µl 100nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), 1µM fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) und 10µM AT II (Angiotensin 2). Die stimulierten Proben wurden 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 600rcf. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand in Eppendorf Gefäße pipettiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C weggefroren.

Abbildung 11 zeigt die Skizze des Versuchsablaufes der in vitro Versuche

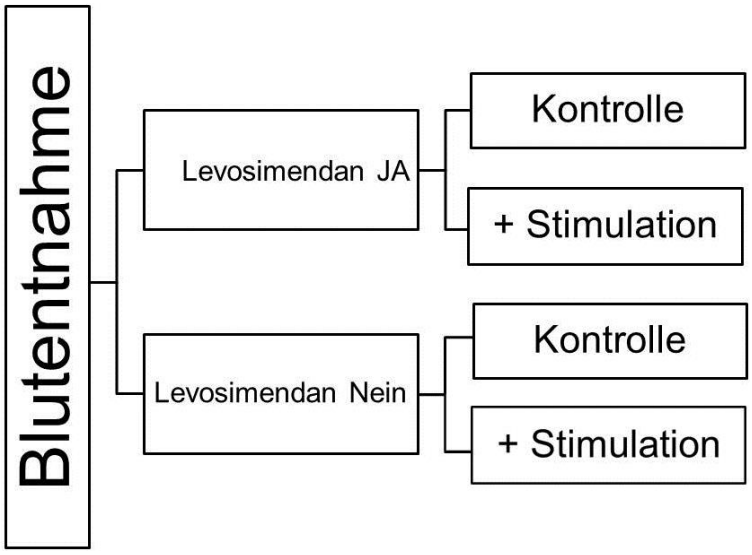


Abbildung 11: Standardisierter Ablauf aller in vitro Versuche mit jeweils verschiedenen Versuchsvariablen

5.2.2 MPO ELISA

Zur Bestimmung der Plasma MPO-Werte wurde laut den Herstellerangaben der Firma CardioMPO/Cleveland Heart Lab vorgegangen. Die in vitro Proben wurden 1:100 verdünnt. Die optische Dichte wurde bei 450nm mittels des ELISA-Reader (DYNEX REVELATION 4.22) bestimmt.

5.2.1 PMN Elastase ELISA

Zur Bestimmung des Elastase-Wertes wurde ein ELISA-Test laut den Herstellerangaben (PMN-Elastase ELISA IBL International) durchgeführt. Die Proben wurden in das Verhältnis 1:100 versetzt. Es wurden 5µl Proben mit 495µl der Sample Diluent Lösung verwendet. Die optische Dichte wurde bei 450nm im ELISA-Reader (DYNEX REVELATION 4.22) abgelesen. Die Hintergrundkorrektur fand bei 620nm statt.

5.2.2 Nitrat-Nitrit Bestimmung

Zur Bestimmung der Nitrat/ Nitrit-Werte wurde laut den Herstellerangaben der Firma Cayman Chemical Company vorgegangen. Die optische Dichte wurde bei 450nm mittels des ELISA- Reader (DYNEX REVELATION 4.22) bestimmt. Die Hintergrundkorrektur fand bei 620nm statt.

6 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science, Chicago) und GraphPad Prism 6.01. Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft, bei angenommener Normalverteilung wurde der ungepaarte Studtents T-Test durchgeführt, ansonsten der Mann-Whitney-U-Test. Vergleiche zwischen mehr als 2 Gruppen wurden mit der einfaktoriellen Anova-Analyse berechnet. Die Vergleiche eines Parameters zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Levosimendan-Gabe wurde mit Hilfe einer linearen mixed model–Analyse durchgeführt, bei der Intersubjekt-Effekte eingeschlossen wurden und der Zeitpunkt als wiederholte Messung (abhängiger Parameter) berechnet wurde. Als post-hoc Test wurde der Fisher LSD-Test durchgeführt.

Normalverteilte Daten werden als arithmetischer Mittelwerte ±Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt, nicht normalverteilte Daten als Median und Interquartilsabstand. Die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Art wurde mit $\alpha = 0,05$ angenommen, das Signifikanzniveau wurde dementsprechend mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = < 0,05$ festgelegt. Die Korrelation wurden mit Hilfe der Pearson Produkt-Moment-Korrelation ausgerechnet, wenn die Variablen sich intervallskaliert und normal verteilt zeigten, ansonsten wurde der Spearmans rho – Koeffizient berechnet.

7 Ergebnisse

7.1 Das Patientenkollektiv

Die an der Studie teilnehmenden Patienten können folgendermaßen kategorisiert werden:

Insgesamt nahmen 25 Patienten an der Studie teil. Hiervon waren 22 Patienten männlichen Geschlechts und 3 Patienten weiblichen Geschlechts. Das mediane Alter im Gesamtkollektiv betrug 59 Jahre. Soweit dokumentiert, konnte eine Erkrankungsdauer von durchschnittlich 8,25 Jahren (SD ± 1,395) festgestellt werden.

Als Krankheitsursache wurde bei 7 Patienten eine ischämische Kardiomyopathie und bei 12 Patienten eine dilatative Kardiomyopathie angegeben. Die restlichen Diagnosen werden mit Sonstige bezeichnet.

Das Gewicht bei stationärer Aufnahme und vor Beginn der Levosimendan-Therapie betrug im Durchschnitt 90 kg. Die männlichen Patienten wogen im Schnitt 93 kg während das Durchschnittsgewicht bei den weiblichen Patienten bei 69 kg lag.

	Anzahl	%
Männlich	22	88
Weiblich	3	12
Ischämische Kardiomyopathie	7	28
Dilatative Kardiomyopathie	12	48
Sonstige Erkrankung	6	24

Tabelle 6: Patientendaten (n= 25)

	Durchschnitt	Männlich	Weiblich
Alter (Jahre)	59 (49-69)	59 (48-69)	57 (54-68)
Gewicht (kg)	90,2 ± 6,9	92,9	69,1

Tabelle 7: Allgemeine Patienten-Daten (n=25)

In der Aufnahmeuntersuchung wurde mittels Echokardiographie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) des Herzens bestimmt, die Belastbarkeit gemessen und auf körperliche Zeichen wie periphere Ödeme untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden auf die Einteilungskriterien nach NYHA übertragen und so den Patienten der jeweilige Schweregrad der Herzinsuffizienz zugeteilt.

	Anzahl (n=25)	Männlich (n=22)	Weiblich (n=3)
Ödeme	13 (52%)	11	2
NYHA III	11 (44%)	9	2
NYHA IV	14 (56%)	13	1

Tabelle 8: Aufnahmeuntersuchung und Klassifikation der Schwere der Herzinsuffizienz, (Prozentangaben ≙ Anzahl der Patienten im Patientenkollektiv mit n=25)

Die EF der Patienten wurde vor Einschluss in die Studie mittels Kardioechokardiographie bestimmt und musste, wie in den Einschlußkriterien gefordert Werte kleiner 30% betragen.

Eine bestehende Vormedikation konnte bei allen Patienten bei stationärer Aufnahme dokumentiert werden.

Die absoluten Medikamenteneinahmen zeigt die folgende Tabelle:

Medikament	Anzahl	%
ACE-Hemmer/Sartane	18	72
Allopurinol	3	12
Amiodarom	12	48
Antidepressiva	2	8
ASS 100mg	4	16
Beta-Blocker	19	76
Clopidogrel	3	12
Digitalis	2	8
Diuretika	20	80
Fe^{2+}	2	8
Heparin	13	52
Insulin	2	8
Kalium	7	28
L-Thyroxin	4	16
Marcumar	11	44
Mg^{2+}	8	32
Nitrate	2	8
Protonenpumpenhemmer	11	44
Statine	9	36
Thyreostatika	2	8

Tabelle 9: Begleitmedikation des Gesamtkollektivs (n= 25), zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen zur stationären Aufnahme wurden die Daten von Herzfrequenz in Ruhe sowie des systolischen und diastolischen Blutdruckes (RR) in Ruhe erhoben:

Ruhe-Herzfrequenz (Schläge/min)	76 ± 6
Ruhe-RR systolisch (mmHg)	103 ± 7,9
Ruhe-RR diastolisch (mmHg)	68 ± 4,85

Tabelle 10: Vitalparameter bei der Aufnahme (n=24)

Im Zuge der stationären Klinikaufnahme wurde bei einigen Patienten (n=12) eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt. Es wurden in standartisierter Art und Weise die klinischen Parameter/ Herzdrücke gemessen:

- rechtsatrialer systolisch und diastolischer Druck (RA_{mean})
- Rechtsventrikulär systolisch und diastolischer Druck
- Mittlerer pulmonalarterieller Druck (PA_{mean})
- Wedge-Druck (PCWP = Pulmonary Capillary Wedge Pressure, Verschlussdruck)

Herzkatheteruntersuchung:

Anzahl	Männlich	Weiblich
12 (48%)	11 (92%)	1 (8%)

Tabelle 11: Durchgeführte Herzkatheteruntersuchungen (Prozentangaben bezogen auf das Gesamtkollektiv, n=25)

Die ermittelten Druckwerte in der Rechtsherzkatheteruntersuchung sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

	Druckwerte in mmHg
RA-mean in mmHg	9,4 ±3,5
RV-systolisch	46 ± 9,6
RV-diastolisch	8,3 ± 2,9
PA-systolisch	45,8 ± 9,6
PA-diastolisch	21,5 ± 4
PA-mean	30,75 ± 5,7
PCWP mean	20,3 ± 3,9

Tabelle 12: ermittelte Werte der Rechtsherzkatheteruntersuchung (n=12)

Die Studie wurde mit insgesamt 25 Patienten begonnen. Im Verlauf des Studienzeitraumes reduzierte sich die Anzahl der noch teilnehmenden Patienten. Zum Follow up Zeitpunkt (=168 Stunden nach Beginn der Levosimendangabe) und gleichzeitigen Ende der Studie, konnten noch 18 Patienten (=72%) untersucht werden. Die Gründe für ein Ausscheiden aus der Studie waren durch die Ausschlusskriterien vorgegeben (eskalierende Therapie mit Katecholaminen; n= 2). Weitere Gründe waren eine Verlegung des Patienten in ein anderes Krankenhaus zur Weiterbehandlung (n= 3) oder die Entlassung aus der stationären Behandlung (n=2). Die Ergebnisse zum Zeitpunkt 168 Stunden werden jeweils mit n=18 angegeben.

Zeitpunkt in Stunden (x)	Anzahl der Studienteilnehmer
0	25
1	25
6	25
24	25
48	19
168	18

Tabelle 13: Studienteilnehmer zum Zeitpunkt X

7.2 Ergebnisse Vitalparameter

7.2.1 Ergebnisse Herzfrequenz:

Die Herzfrequenz zeigte über den Studienzeitraum von einer Woche keine signifikanten Änderungen. Kurzfristige Senkungen konnten, allerdings ohne signifikante Veränderungen, bei einigen Patienten beobachtet werden.

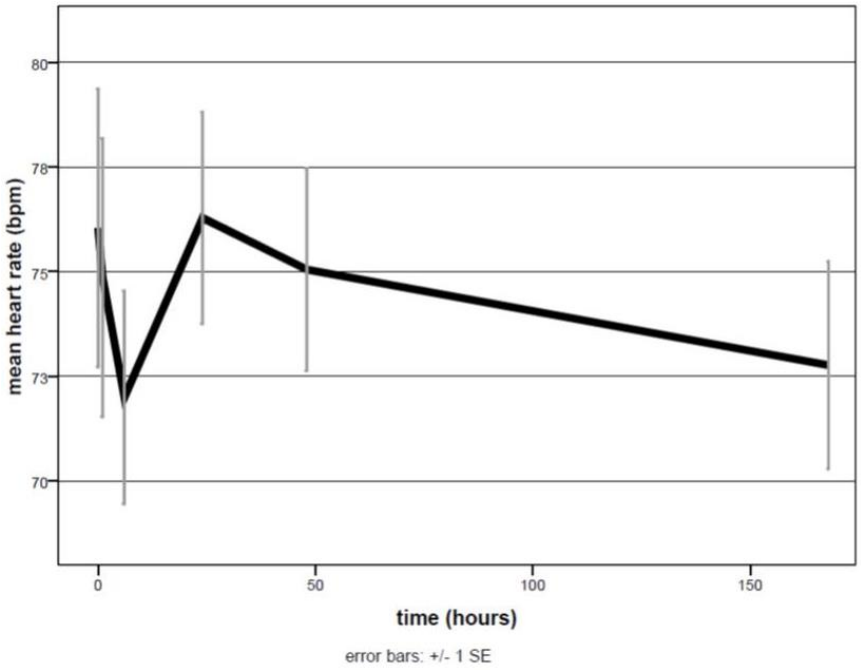


*Abbildung 12: Mittelwerte Herzfrequenz zum Zeitpunkt X, n=25 ; * p<0,05; **p<0,01*

Messung:	Herzfrequenz		
Zeitpunkt	Mittelwerte in bpm	Standardfehler	Signifikanz
0	76	3,3	----
1	75	3,3	0,828
6	72	2,5	0,278
24	76	2,5	0,960
48	75	2,4	0,798
168	72	2,5	0,318

*Tabelle 14: MW und SEM für Herzfrequenz. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden); n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.2.2 Blutdruck (RR)

Systolischer Blutdruck:

Bei den Messungen des systolischen Blutdruckes zeigte sich zum Zeitpunkt 48 Stunden ein signifikanter Abfall. Zum Studienende wurden Werte nahe dem MW des Ausgangswertes gemessen.

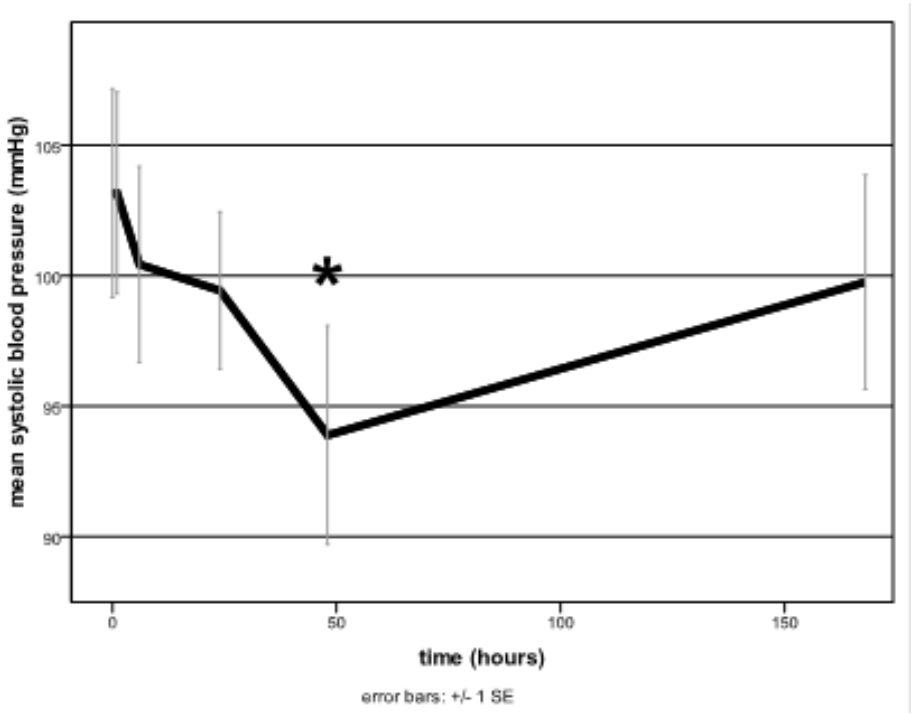


*Abbildung 13: Mittelwerte systolischer Blutdruck zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; ** p<0,01*

Messung:	Systolischer RR		
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in mmHg	Standardfehler	Signifikanz
0	103,2	4,0	----
1	103,2	3,8	0,990
6	100,4	3,7	0,563
24	99,4	3,0	0,304
48*	93,9	4,2	0,041
168	99,7	4,1	0,291

*Tabelle 15: MW und SEM für systolischer Blutdruck. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (= Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden); n=25; * p<0,05; **p<0,01*

Diastolischer Blutdruck:

Die Messungen des diastolischen Blutdruckes zeigten zum Messpunkt 6 Stunden einen signifikanten Abfall. Während des gesamten folgenden Studienzeitraumes wurden signifikant niedrige diastolische Blutdruckwerte gemessen.

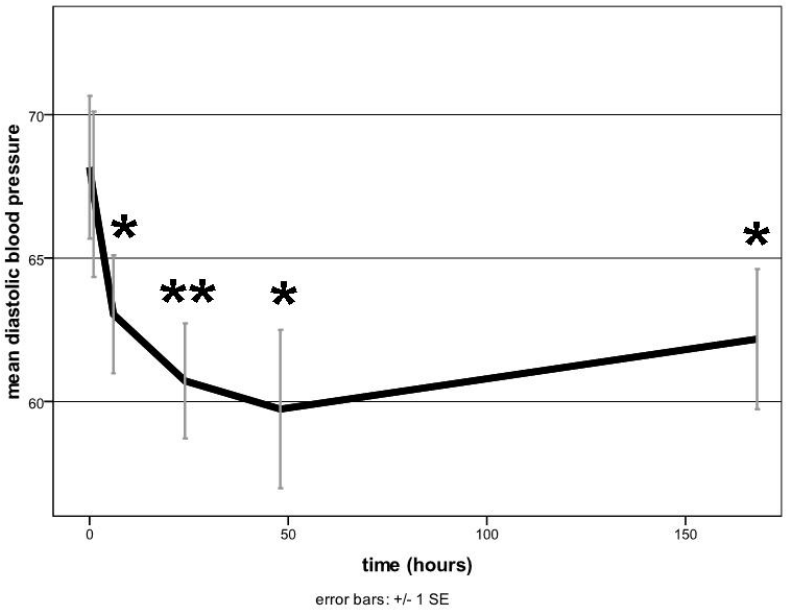


*Abbildung 14: Mittelwerte diastolischer Blutdruck zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; **p<0,001*

Messung: RR diastolisch			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in mmHg	Standardfehler	Signifikanz
0	68,1	2,5	----
1	67,2	2,8	0,714
6*	63,1	2,1	0,031
24**	60,7	2,0	0,002
48*	59,7	2,7	0,013
168*	62,2	2,4	0,027

*Tabelle 16: MW und SEM für diastolischer Blutdruck. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.3 Ergebnisse Gewicht

48 Stunden nach Beginn der Gabe von Levosimendan konnte eine deutliche Abnahme des Gewichts beobachtet werden. Das Gewicht zeigte zum Studienende weiterhin Werte einer stark signifikanten Abnahme.

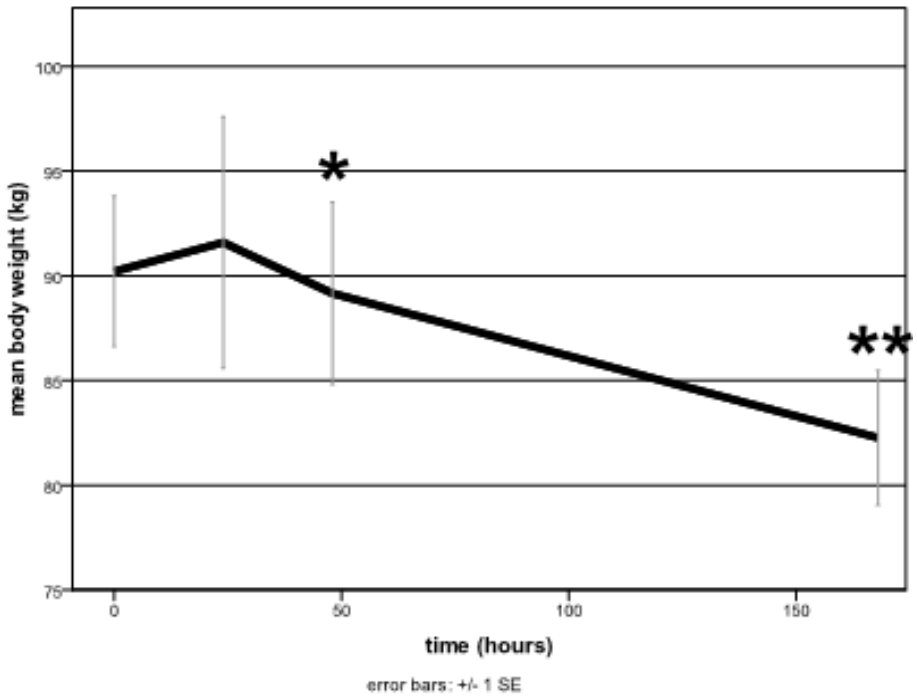


*Abbildung 15: Mittelwerte Gewicht zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; **p<0,001*

Messung	Gewicht		
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in kg	Standardfehler	Signifikanz
0	90,2	3,59	----
24	91,6	6,01	0,420
48*	89,2	4,35	0,041
168**	82,3	3,22	0,003

*Tabelle 17: MW und SEM für Gewicht. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 24- 168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.4 Ergebnisse Kreatinin

Kreatinin zeigte nach 24 Stunden einen signifikanten Abfall, der auch noch nach 48 Stunden zu messen war. Am Ende des Studienzeitraumes wurden Werte nahe dem Ausgangsniveau gemessen.

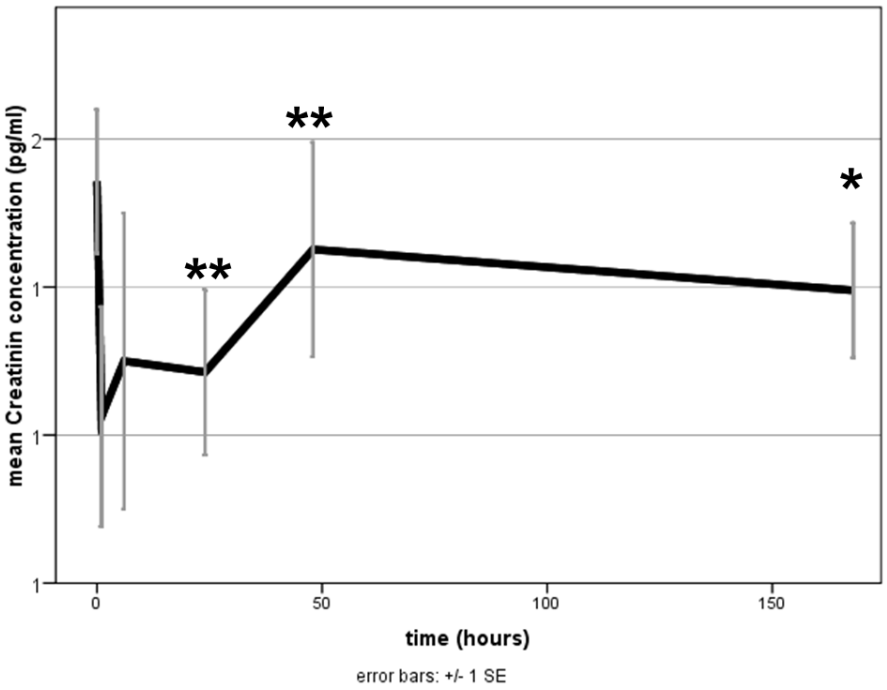


*Abbildung 16: Mittelwerte Kreatinin zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; ** p<0,01*

Messung: Kreatinin			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in pg/ml	Standardfehler	Signifikanz
0	1,544	0,1	----
1	1,23	0,15	0,133
6	1,3	0,2	0,256
24**	1,29	0,12	0,009
48**	1,45	0,14	0,007
168*	1,44	0,05	0,041

*Tabelle 18: MW und SEM für Kreatinin. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.5 Ergebnisse Hämoglobin

Bei den Messungen von Hämoglobin konnten in den ersten 6 Stunden der Studie signifikante Werte ermittelt werden. Zunächst sanken die Werte für Hämoglobin signifikant, nach 24 Stunden war wiederum ein leichter Anstieg zu erkennen mit immer noch signifikanten Werten der bis zum Zeitpunkt 48 Stunden anhielt. Zum Ende der Studie konnten Werte nahe dem Ausgangsniveau ermittelt werden.

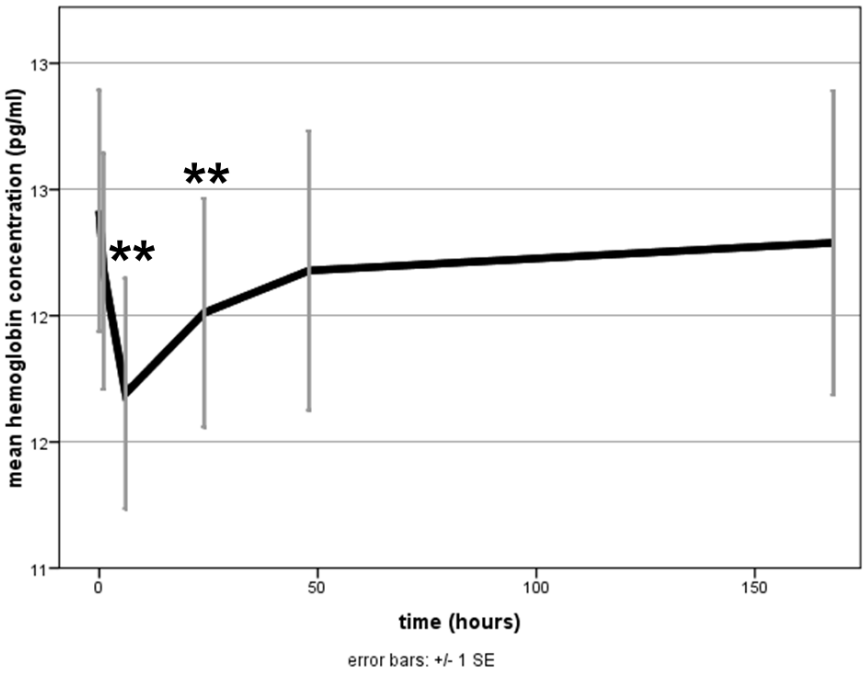


*Abbildung 17: Mittelwerte Hämoglobin zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; ** p<0,01*

Messung: Hämoglobin			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in pg/ml	Standardfehler	Signifikanz
0	12,4	0,48	----
1	12,2	0,47	0,095
6**	11,7	0,46	0,0001
24**	12,0	0,45	0,005
48	12,2	0,55	0,061
168	12,3	0, 62	0,864

*Tabelle 19: MW und SEM für Hämoglobin. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.6 Ergebnisse Entzündungsparameter

7.6.1 Leukozyten

Die Leukozytenzahlen blieben während des gesamten Studienzeitraumes gleich und zeigten keine signifikanten Veränderungen.

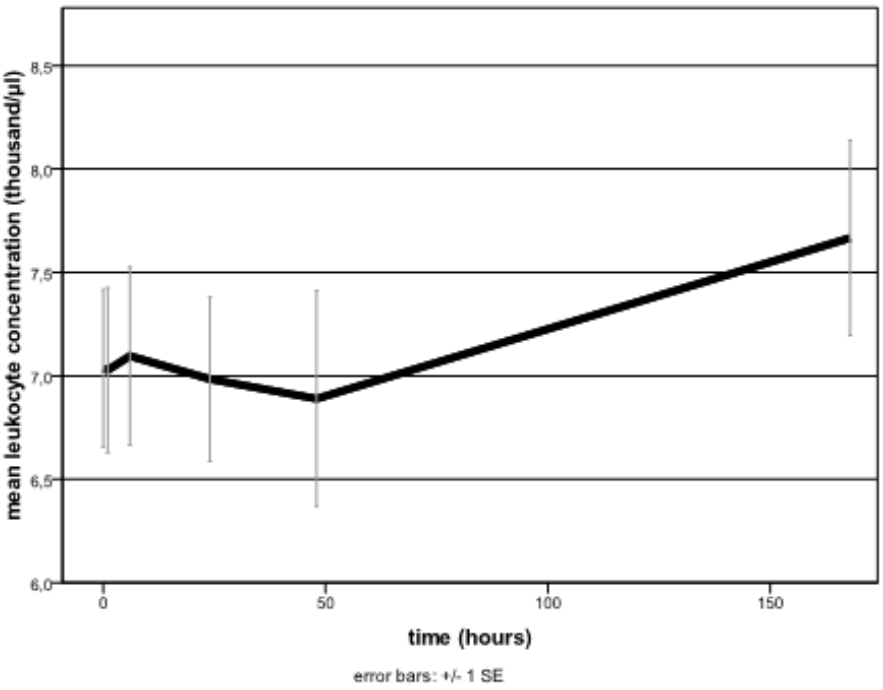


*Abbildung 18: Mittelwerte Leukozyten zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; ** p<0,001*

Messung: Leukozyten			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in tsd/µl	Standardfehler	Signifikanz
0	7,04	0,38	----
1	7,03	0,399	0,966
6	7,1	0,431	0,609
24	6,98	0,397	0,796
48	6,89	0,522	0,641
168	7,67	0,472	0,208

*Tabelle 20: MW und SEM Leukozyten. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) mit n=25; * p<0,05;** p<0,01*

7.6.2 Ergebnisse Granulozyten

Bei den Granulozyten konnte 6 Stunden nach Beginn der Levosimendan- Infusion ein signifikanter Abfall beobachtet werden.

Im weiteren Verlauf erreichten die Granulozyten wieder ihr Ausgangsniveau und zeigten über den gesamten Studienzeitraum keine Veränderungen mehr.

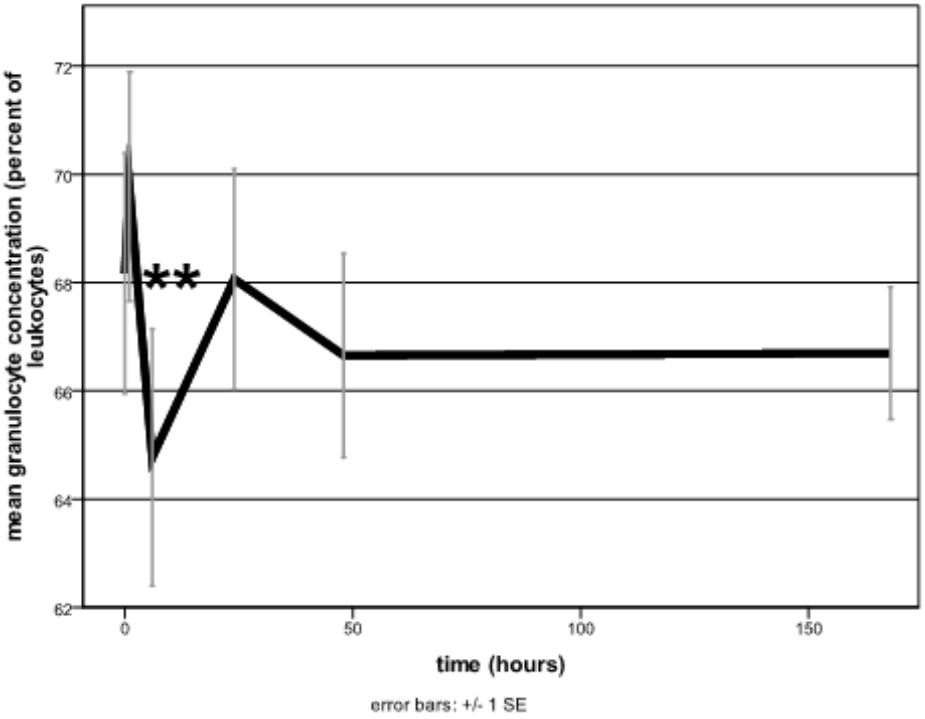


*Abbildung 19: Mittelwerte Granulozyten zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05;** p<0,01*

Messung: Granulozyten			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in Prozent Anteil an Leukozyten	Standardfehler	Signifikanz
0	68,17	2,22	----
1	69,77	2,12	0,206
6**	64,78	2,37	0,010
24	68,06	2,04	0,922
48	67,98	1,88	0,933
168	65,96	1,22	0,206

*Tabelle 21: MW und SEM Granulozyten. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.6.3 Ergebnisse CRP

Die Werte für CRP fielen leicht ab, zum Zeitpunkt 24 Stunden konnte ein signifikanter Wert gemessen werden. Nach einer Woche (168 Stunden) zeigte sich ein Anstieg der CRP-Werte, der jedoch aufgrund einer großen Heterogenität nicht signifikant unterschiedlich in Bezug auf andere Zeitpunkte war.

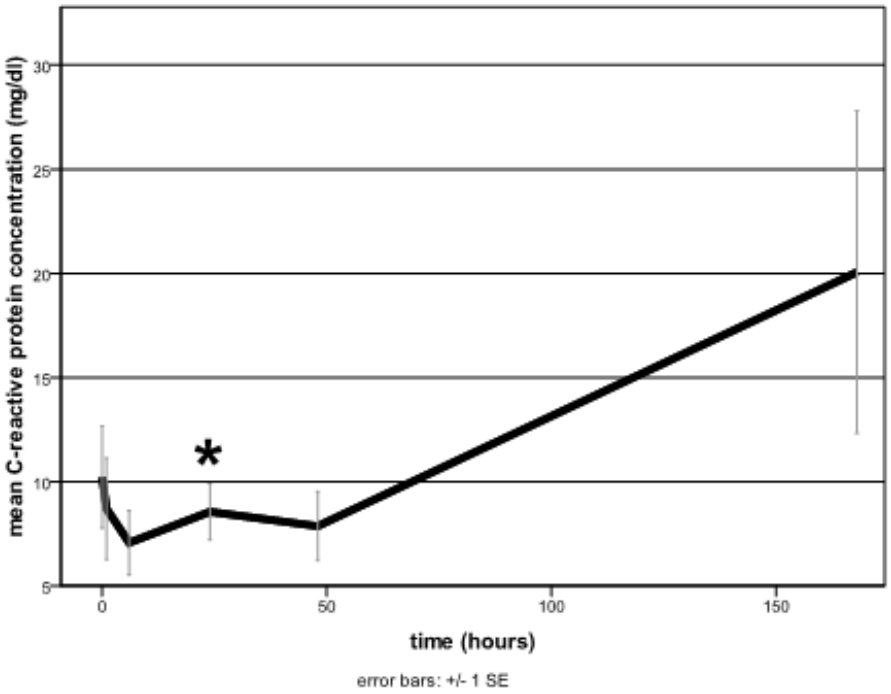


*Abbildung 20: Mittelwerte CRP zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; ** p<0,01*

Messung: CRP			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in mg/dl	Standardfehler	Signifikanz
0	10,22	2,44	----
1	8,69	2,44	0,865
6	7,07	1,54	0,330
24*	8,55	1,35	0,011
48	7,86	1,65	0,147
168	20,05	7,74	1,000

*Tabelle 22: MW und SEM für CRP. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.6.4 Ergebnisse IL-6

Bei der Messung von IL-6 konnte zunächst ein signifikanter Anstieg gemessen werden. Zum Zeitpunkt der letzten Messung konnten Werte nahe dem Ausgangsniveau ermittelt werden. Im Zeitraum 6 Stunden bis zu einer Woche konnte ein signifikanter Abfall der Il-6 Konzentrationen gemessen werden.

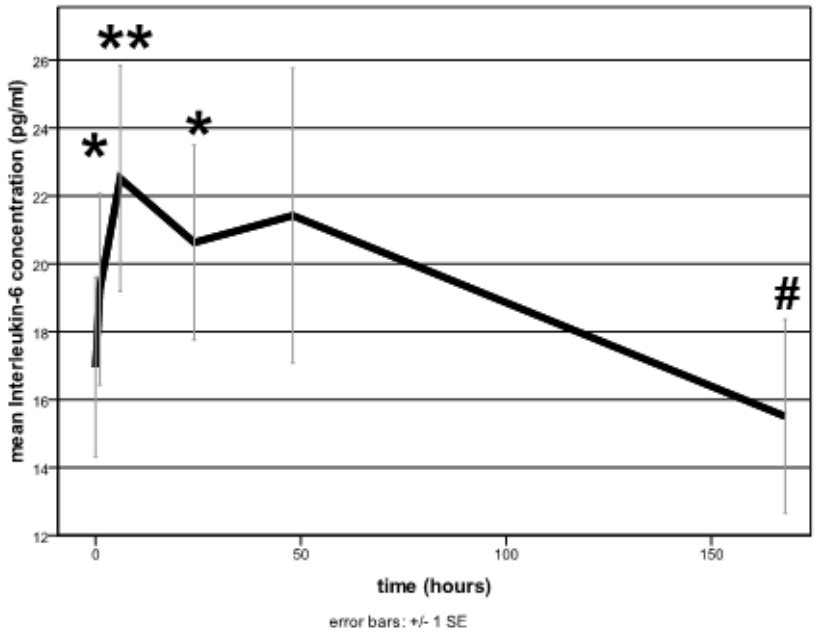


*Abbildung 21: Mittelwerte IL-6 zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; ** p<0,01 versus 0 Stunden; #< p0,05 vs. Zeitpunkt 6 Stunden*

Messung: IL-6			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in pg/ml	Standardfehler	Signifikanz
0	16,956	2,643	----
1*	19,252	2,818	0,021
6**	22,512	3,325	0,000
24*	20,632	2,875	0,027
48	21,422	4,339	0,362
168#	15,512	2,858	0,448

*Tabelle 23: MW und SEM für IL-6. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; p**<0,01; #< p0,05 vs. Zeitpunkt 6 Stunden*

7.7 Ergebnisse NT-proBNP

In unserer Studie wurde das N-terminale-proBNP als Marker der Herzbelastung gemessen. Die Plasmaspiegel des NT-proBNP zeigten zunächst keine Veränderungen. 24 Stunden nach Start der Infusion war ein signifikanter Abfall zu messen, der bis zum Studienende zu beobachten war.

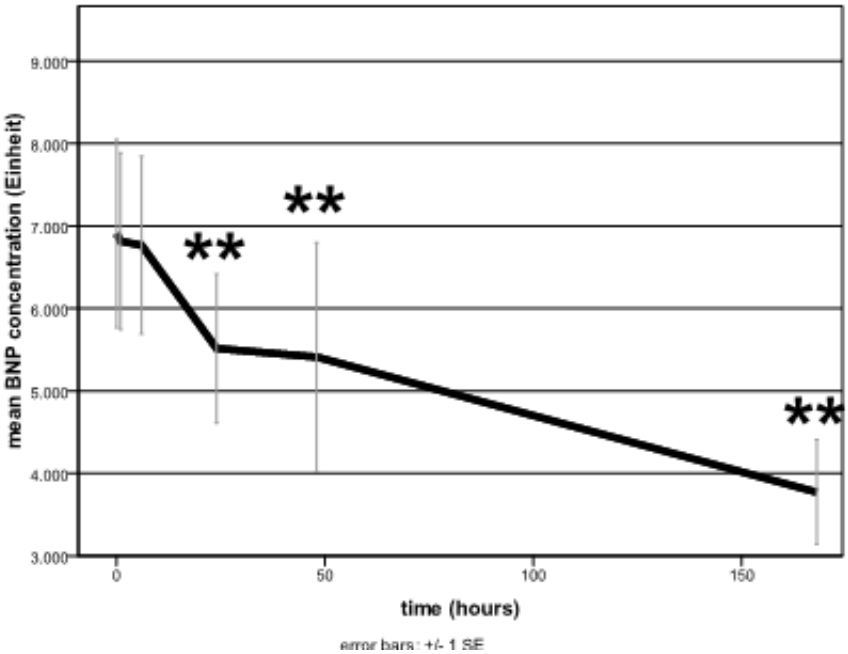


*Abbildung 22: Mittelwerte NT-proBNP zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

Messung:	NT-proBNP		
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in pg/ml	Standardfehler	Signifikanz
0	6907,9	1142	----
1	6816,9	1071	0,763
6	6768,2	1077	0,636
24**	5515,2	902,9	0,001
48**	4905,9	1390	0,011
168**	3954,8	634,4	0,000

*Tabelle 24: MW und SD NT-proBNP. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.8 Ergebnisse MPO

In der folgenden Grafik sind die Mittelwerte der MPO-Spiegel aufgezeigt. Es konnte beobachtet werden, dass MPO in der frühen Phase (=1 Stunde nach Start der Infusion) eine diskrete Erhöhung seiner Werte zeigt. Nach 6 Stunden ist ein signifikanter Abfall zu sehen. Im Verlauf der Studie stiegen die MPO-Werte wieder an, um nach einer Woche signifikant hohe Werte gegenüber dem Ausgangswert zu erreichen.

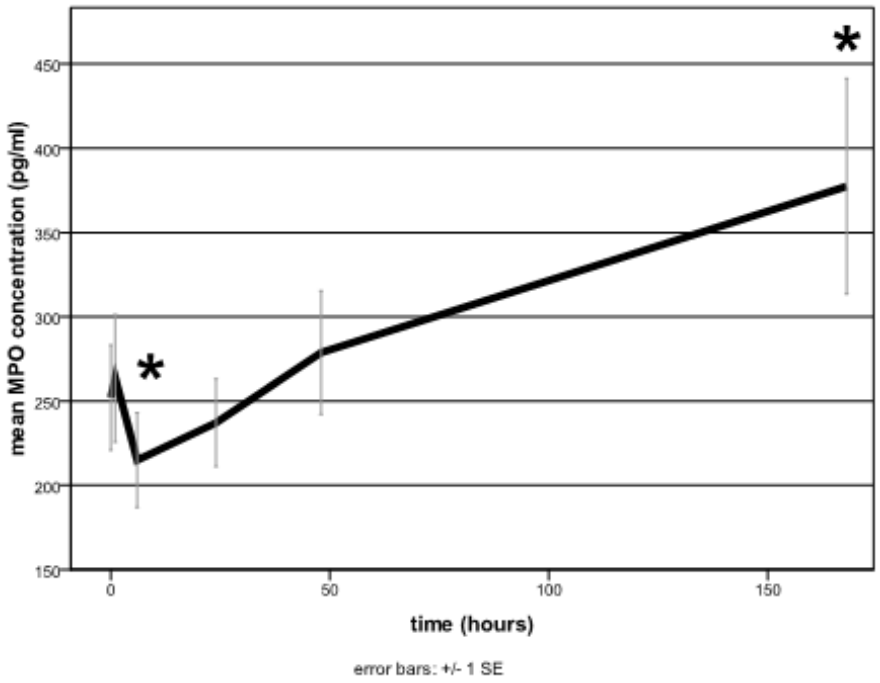


*Abbildung 23: Mittelwerte MPO zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

Messung:	Myeloperoxidase		
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in pg/ml	Standardfehler	Signifikanz
0	252,09	31,10	----
1	263,55	37,83	0,670
6*	215,02	27,96	0,043
24	237,14	26,01	0,223
48	278,82	36,67	0,877
168*	377,38	15,4	0,026

*Tabelle 25: MW und SEM für MPO- Spiegel des Gesamtkollektives im Studienzeitraum. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (= Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden); n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.9 Ergebnisse Elastase

Die Elastasewerte fielen in den ersten 24 Stunden signifikant ab. Im Verlauf des Studienzeitraumes konnte ein diskreter, nicht signifikanter Wiederanstieg verzeichnet werden.

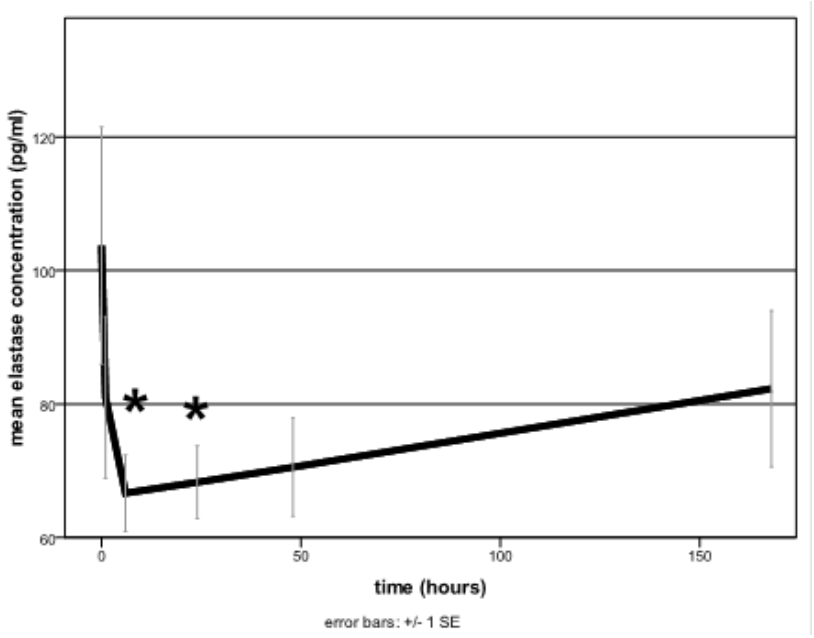


*Abbildung 32: Mittelwerte Elastase des Gesamtkollektivs während des Studienzeitraumes in pg/ml zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

Messung: Elastase			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in pg/ml	Standardfehler	Signifikanz
0	103,71	17,7	
1	80,98	12,1	0,253
6*	66,67	5,7	0,047
24*	68,29	5,4	0,049
48	70,5	7,3	0,075
168	82,3	11,6	0,320

*Tabelle 26: MW und SEM für Elastase. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) ; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.10 Ergebnisse Nitrit

Bei der Bestimmung der Nitritwerte als Indikator für die Bioverfügbarkeit von NO, konnten zu Anfang stabile Werte gemessen werden, ohne dass eine signifikante Veränderung zu beobachten war. Im letzten Teil des Studienzeitraumes stiegen diese Werte hochsignifikant an.

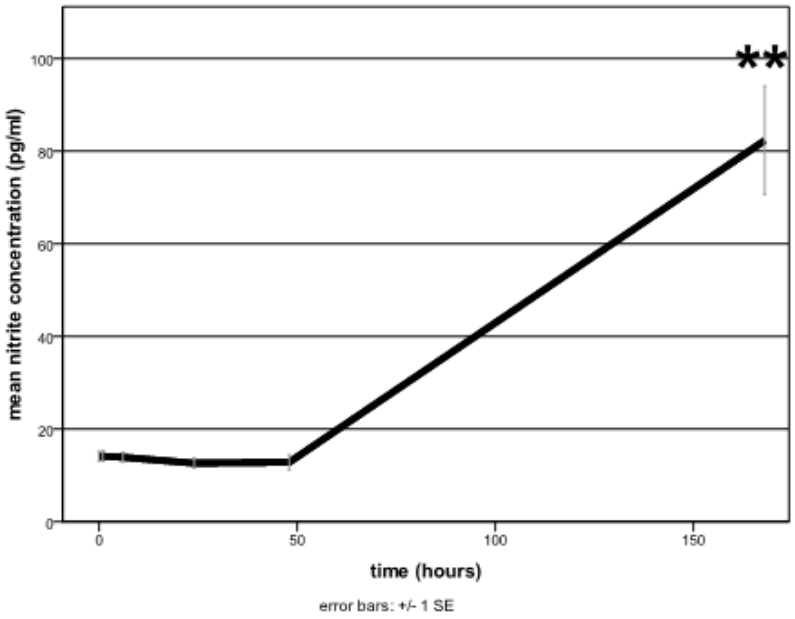


*Abbildung 38: Mittelwerte Nitrit zum Zeitpunkt X; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

Messung: Nitrit			
Zeitpunkt in Stunden	Mittelwerte in µM	Standardfehler	Signifikanz
0	14,16	1,1	----
1	14,17	1,1	0,989
6	13,94	1,1	0,720
24	12,66	1,1	0,073
48	12,87	1,6	0,212
168**	82,29	11,7	0,001

Tabelle 27: Mittelwerte und SEM für Nitrit. Die Signifikanz ergibt sich durch den paarweisen Vergleich von Messung 1 vs. Messung 2-5 (=Zeitpunkt 0h vs. 1-168 Stunden) *; n=25; * p<0,05; **p<0,01*

7.11 In vitro Ergebnisse von MPO und Elastase unter Stimulation

In dieser Versuchsreihe wurden die MPO- und Elastase- Ausschüttung aus stimuliertem im Vergleich zu unstimuliertem Vollblut bestimmt, um die direkten Effekte von Levosimendan auf die PMN-Aktivierung zu messen. Hierzu wurde Vollblut jeweils mit einem Stimulus für polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) inkubiert und die jeweilige MPO- oder Elastase-Ausschüttung als Marker der PMN-Aktivierung gemessen. Als Stimulantien wurden PMN (500 nl), fMLP(5µl)/PMA (5µl), TNF-alpha (5µl) und Angiotensin II (10µl) verwendet. Der Stimulationszeitraum betrug 45 Minuten. Gemessen wurde die Vergleichsgruppe ohne Zugabe von Levosimendan und die Gruppe mit dem Zusatz von Levosimendan. Levosimendan wurde immer in einer Konzentration von 500ng/ml im jeweiligen Versuch zugegeben. Der Zeitpunkt des Vergleichs fand nach 6 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur statt.

<u>Vergleich von unstimuliertem und stimuliertem Vollblut</u>

Zunächst wurde die MPO-Ausschüttung bei unstimulierten PMN gemessen.

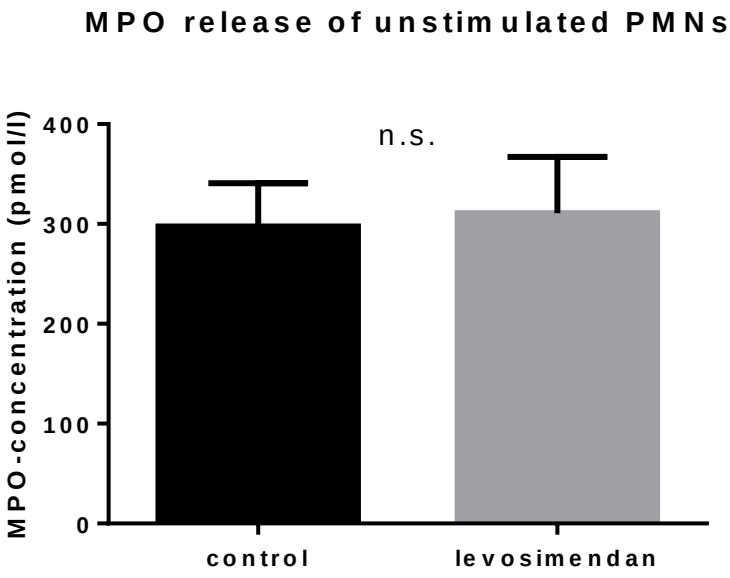


Abbildung 39: Messung der MPO- Ausschüttung bei nicht stimulierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten aus Vollblut; Kontrolle n=9; Levosimendan n=10

Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der MPO-Ausschüttung gemessen werden.

Um eine mögliche Korrelation von MPO- und Elastase-Ausschüttung zu erkennen wurden die Proben ebenfalls in einem Elastase- ELISA durchgemessen. Die Ergebnisse der Elastase-Ausschüttung sind in den jeweiligen Grafiken dargestellt.

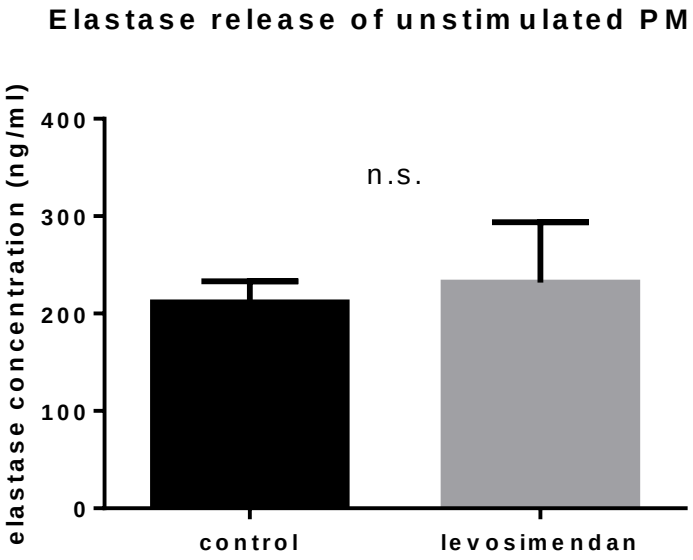


Abbildung 25: Messung der Elastase-Ausschüttung bei nicht stimulierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, n=12 pro Gruppe

<u>Ausschüttung von MPO und Elastase aus stimulierten Granulozyten</u>

In dieser Versuchsreihe wurden die Granulozyten mit verschiedenen Stimulantien aktiviert und die jeweilige MPO- oder Elastase- Ausschüttung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Levosimendan-Zugabe gemessen.

Messung der MPO-Ausschüttung bei Aktivierung der Granulozyten mit fMLP/PMA:

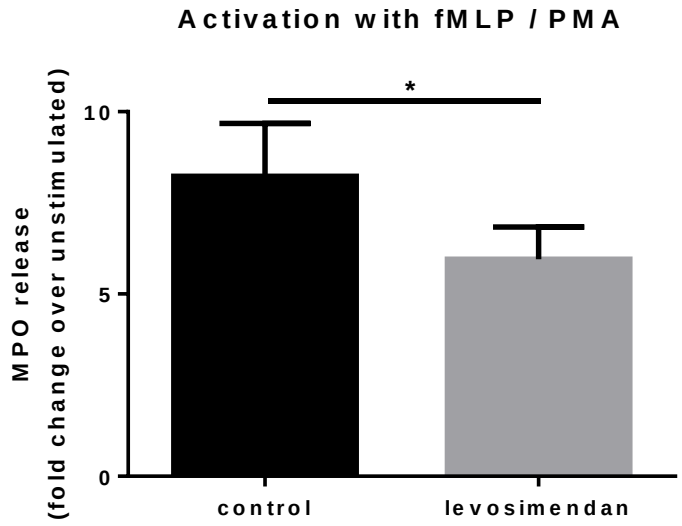


Abbildung 26: Aktivierung der Granulozyten mit fMLP/PMA, Beobachtung der MPO-Ausschüttung aus Vollblut; Kontrolle n=9; Levosimendan n=10

Signifikante Unterschiede der MPO-Ausschüttung konnten bei der Stimulation von Granulozyten mit fMLP/PMA zwischen der Kontrollgruppe und der Levosimendan-Gruppe beobachtet werden.

Messung der Elastase-Ausschüttung bei Aktivierung der Granulozyten mit fMLP/PMA:

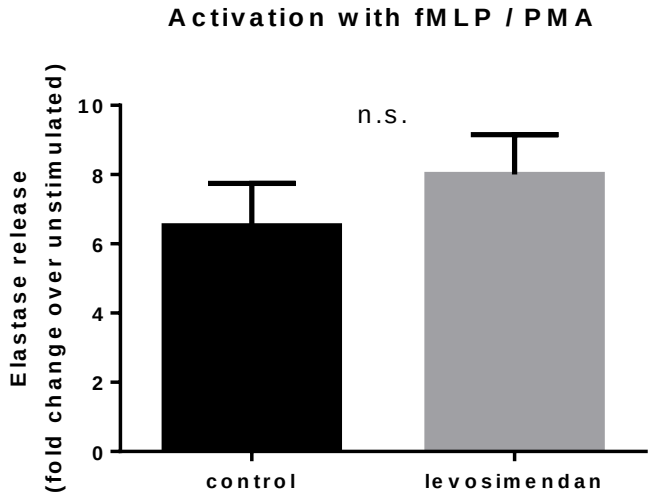


*Abbildung 27: Stimulation der Granulozyten mit fMLP/PMA und Beobachtung der Elastase-Ausschüttung aus Vollblut, n=18 pro Gruppe; * p<0,05;** p<0,005*

Im Elastase-ELISA konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit Gabe von Levosimendan und kein Levosimendan festgestellt werden.

Stimulation von Granulozyten mit TNF- alpha mit Messung der MPO-Ausschüttung

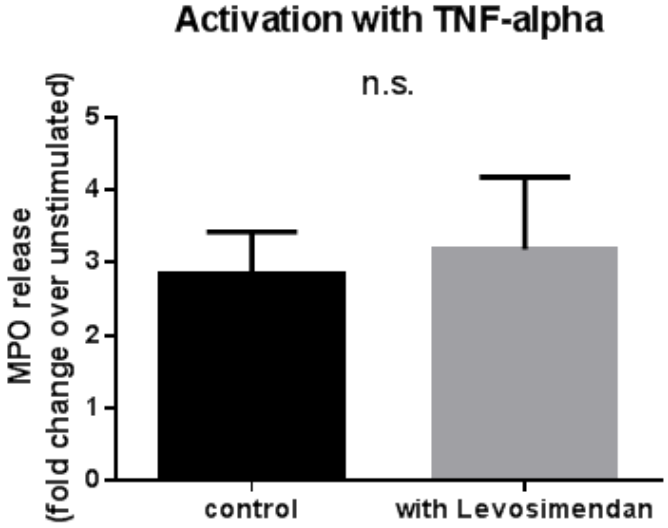


Abbildung 28: Ausschüttung von MPO nach Stimulation der Granulozyten mit TNF-alpha aus Vollblut; n=6 pro Gruppe

Bei der Aktivierung der Granulozyten mit TNF-alpha konnten keine signifikanten Unterschiede bei der MPO-Ausschüttung zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Stimulation von Granulozyten mit TNF- alpha und Messung der Elastase-Ausschüttung

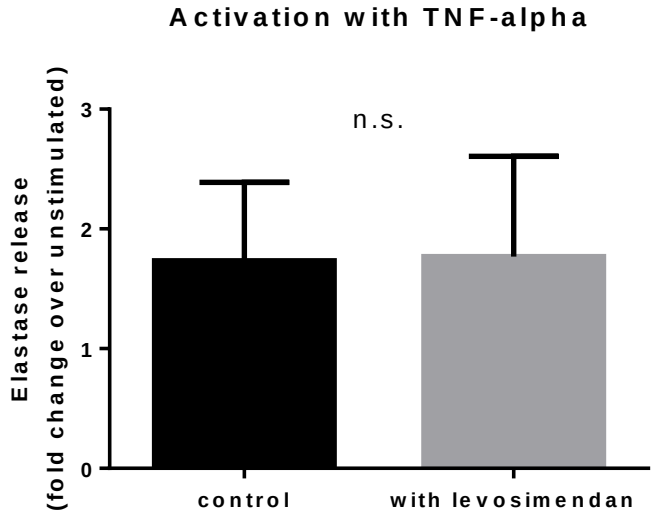


Abbildung 29: Aktivierung der Granulozyten mit Angiotensin II und Beobachtung der Ausschüttung von Elastase aus Vollblut, n=6 pro Gruppe

Bei der Aktivierung der Granulozyten mit TNF-alpha konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Elastase-Ausschüttung zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt werden

Stimulation von Granulozyten mit Angiotensin II mit Messung der MPO-Ausschüttung

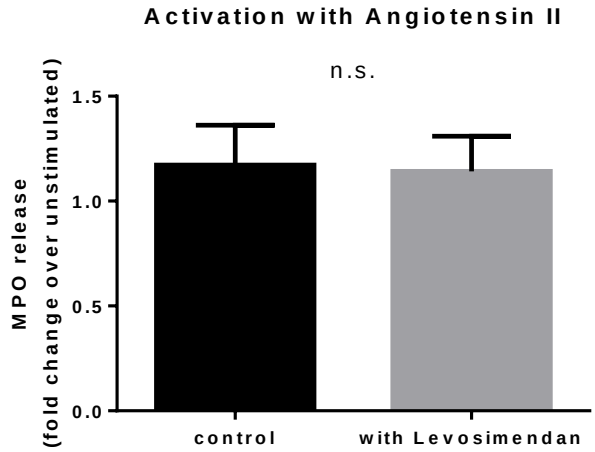


Abbildung 30: Aktivierung der Granulozyten mit Angiotensin II und Beobachtung der Ausschüttung von MPO aus Vollblut; n=6 pro Gruppe

Bei der Aktivierung der Granulozyten mit Angiotensin II konnten keine signifikanten Unterschiede bei der MPO-Ausschüttung zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es konnte ausschliesslich eine minimale Aktivierung von Leukozyten unter Angiotensin II-Stimulation festgestellt werden (1,17-facher Anstieg von MPO in der Kontrolle vs. 1,14-facher Anstieg in der Levosimendan-Gruppe).

Stimulation von Granulozyten mit Angiotensin II mit Messung der Elastase-Ausschüttung

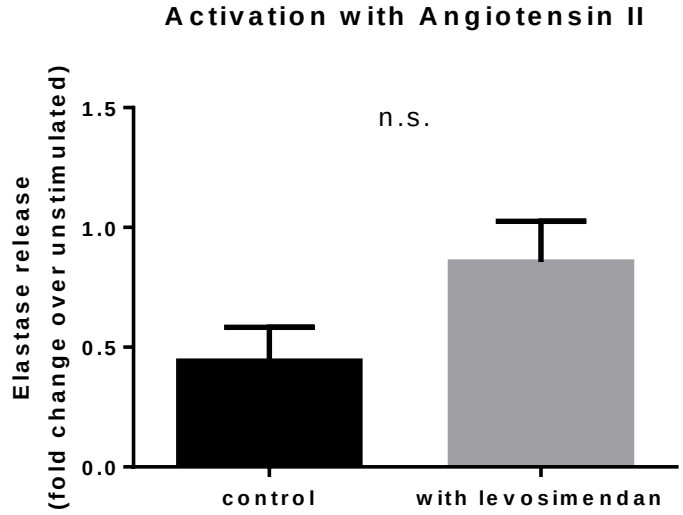


Abbildung 31: Aktivierung der Granulozyten mit Angiotensin II und Beobachtung der Ausschüttung von Elastase aus Vollblut (n=6 pro Gruppe)

Bei der Aktivierung der Granulozyten mit Angiotensin II konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Elastase-Ausschüttung zwischen den Gruppen festgestellt werden.

7.12 Zusammenfassung

Zusammenfassung der Ergebnisse der in vivo Daten

1. MPO

   Patienten im Zustand einer akuten Verschlechterung ihrer chronischen Herzinsuffizienz zeigten bei Gabe einer Levosimendan-Infusion, zunächst einen signifikanten Abfall der Myeloperoxidase von 252,1 ± 31,1 pg/ml auf 215,0 ± 28,0 pg/ml. Zum Zeitpunkt des Follow-Up nach 7 Tagen konnte ein signifikanter Wiederanstieg auf 377,4 ± 15,4 gemessen werden.

2. Elastase

   Zunächst war ein signifikanter Abfall der Elastase zum Zeitpunkt 6 Stunden und 24 Stunden nach Beginn der Levosimendaninfusion zu messen (von Baseline-Untersuchung 103.2 ± 17,7 ng/ml zu 81 ± 12,1 ng/ml zum Zeitpunkt 6h und 66,7 ± 5,7 ng/ml zum Zeitpunkt 24h). Im Studienverlauf zwischen dem 2. zum 7. Tag zeigte sich ein Wiederanstieg der Elastase-Plasmakonzentration ohne signifikante Werte zu erreichen.

3. Nitrit

   Innerhalb der ersten zwei Tage der Studie konnten keine Veränderungen der Nitrit-Werte gemessen werden. Zum Ende der Studie wurden signifikant hohe Werte des Nitrits gemessen (von Baseline Untersuchung 14.2 ± 1,1 µM zum Zeitpunkt 7 Tage mit 82.3 ± 11.7 µM, $p<0.01$)

4. Granulozyten

   Die Werte der Granulozyten zeigten 6 Stunden nach Beginn der Gabe der Levosimendan- Infusion einen hochsignifikanten Abfall (64.78 ± % vs. 68.17 ± 2.22% zum Zeitpunkt der Baseline- Bestimmung). Im weiteren Verlauf erreichten die Granulozyten wieder ihr Ausgangsniveau und zeigten über den gesamten Studienzeitraum keine Veränderungen mehr.

5. Entzündungsparameter

   Die Entzündungsparameter zeigen für CRP einen signifikanten Abfall nach 24 Stunden (10,2 ± 2,4 vs. 8,55 ± 1,4mg/dl Baseline). Zum Studienende konnten erhöhte jedoch nicht signifikant unterschiedliche Werte bei großem Standardfehler gemessen werden.

Einen signifikanten Anstieg zeigte IL-6 vom Zeitpunkt 1 zu 24 Stunden. Verglichen zum Zeitpunkt 6 Stunden wurden am Studienende erniedrigte Werte für IL-6 gemessen.

6. Herzinsuffizienz/ kardiale Belastungsparameter

   Die Zeichen der akuten Herzbelastung, in unserer Studie indirekt über das NT-proBNP gemessen, zeigten 24 Stunden nach Start der Levosimendan-Infusion einen Abfall der bis zum Studienende messbar ist (von Baseline 6907,9 ± 1142.0 pg/ml zu 3974 ± 634.4 pg/ml nach 7 Tagen).

   Kreatinin, als Parameter der renalen Funktion, zeigt 24 Stunden nach Beginn der Levosimendan-Infusion einen signifikanten Abfall, der auch zum Zeitpunkt 48 Stunden messbar ist. Zum Studienende hin können Werte auf Ausgangsniveau gemessen werden.

7. Kreislaufparameter

   Die Herzfrequenz unter Levosimendangabe blieb gleich. Es zeigten sich Blutdrucksenkungen. Vor allem der diastolische Blutdruck sank während der Infusion ab. Es konnte ein hochsignifikanter Abfall der diastolischen Blutdrücke gemessen werden. Der Effekt der Absenkung war zum Studienende weiter signifikant.

8. Gewicht

   Während des Studienzeitraumes konnte eine deutliche Gewichtsabnahme, mit signifikanten Ergebnissen zum Zeitpunkt 48 Stunden gemessen werden. Zum Studienende war ein hochsigifikanter Gewichtsverlust zu messen (90.2 ± 3.6 kg vs. 82.3 ± 3.2 kg innerhalb des Studienzeitraumes von 7 Tagen).

Zusammenfassung der Ergebnisse der in vitro Daten

Um zusätzlich eine Aussage zu den Effekten von Levosimendan auf die Aktivierung von PMN machen zu können, wurde Vollblut von gesunden Probanden mit einer Konzentration von 500ng/ml Levosimendan inkubiert. Die Proben wurden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass nur eine Zugabe von Levosimendan keinen direkten Einfluß auf die MPO- oder Elastase- Freisetzung aus den Leukozyten im Vollblut hat.

Es konnte jedoch ein signifikanter Abfall der MPO-Ausschüttung bei der Levosimendan-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, wenn die im Vollblut enthaltenen Leukozyten und Granulozyten mit fMLP/PMA stimuliert worden waren (8,2 ± 1,4 facher Anstieg mit Stimulation ohne Levosimendan vs. 6 ± 0.9 facher Anstieg in stimulierten Zellen mit Levosimendan.

8 Diskussion

In dieser prospektiven, beobachtenden Arbeit sollte der Einfluss von Levosimendan auf die leukozytäre und endotheliale Funktion bei 25 Patienten mit akut dekompensierter chronischer Herzinsuffizienz gezeigt werden. Im Speziellen sollte untersucht werden, ob eine Behandlung mit Levosimendan zu einer Abnahme der MPO-Plasmakonzentration führt und somit die endotheliale und leukozytäre Funktion günstig beeinflusst wird.

Patienten, die im Rahmen einer akuten Verschlechterung und Dekompensation ihrer Herzinsuffizienz in das universitäre Herzzentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf kamen, wurden bei Erfüllung der geforderten Einschlußkriterien in die Studie aufgenommen und mit Levosimendan behandelt. Der Beobachtungszeitraum betrug eine Woche.

Levosimendan hat einen, zumindest kurzfristig, günstigen Einfluss auf den Verlauf der akuten Herzinsuffizienz. Diese kurzfristigen Effekte des Levosimendans, die unter anderem durch deutlich verringerte BNP-Werte, einer Abnahme des Körpergewichts sowie der Abnahme der Symptome von Dyspnoe und Müdigkeit deutlich werden, wurden bereits in verschiedenen Studien beschrieben u. a. (Slawsky, Colucci et al. 2000; Follath, Cleland et al. 2002).

Wie in der Einleitung beschrieben, konnten mehrere Studien zu Levosimendan positive Wirkungen von Levosimendan bei Patienten im Zustand einer akuten Exazerbation der Herzinsuffizienz zeigen. Zu diesen Wirkungen zählen eine verbesserte Inotropie ohne vermehrten Sauerstoffverbrauch am Herzen (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008; Lunghetti, Palmerini et al. 2011; Papp, Edes et al. 2012), positive Auswirkungen auf die Vasodilatation vergleiche u. a. (Kivikko and Lehtonen 2005; Antila, Sundberg et al. 2007), Kardioprotektion (Nieminen, Akkila et al. 2000; O'Rourke 2004; Maytin and Colucci 2005) sowie antiinflammatorische Eigenschaften (Parissis, Adamopoulos et al. 2004; Avgeropoulou, Andreadou et al. 2005; Kyrzopoulos, Adamopoulos et al. 2005). Bis heute sind allerdings nicht alle Wirkungen von Levosimendan bekannt.

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Levosimendan auf die leukozytäre und endotheliale Funktion bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zu messen

und die festzustellenden Verbesserungen des Gesundheitszustandes der Patienten während und nach der Gabe von Levosimendan mit weiteren Daten zu belegen. Durch die Studie versuchten wir neue Rückschlüsse auf die Wirkung von Levosimendan zu ziehen, um das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz und die Rolle von MPO besser zu verstehen und eventuell neue Ansatzpunkte für weitere Studien zu finden.

Bekannt ist, dass MPO einen ungünstigen Einfluss auf die Gefäßrelaxation des Endothels ausübt und, durch die Gabe von Levosimendan im akuten Stadium der Dekompensation einer chronischen Herzinsuffizienz, eine signifikante Besserung des Zustandes der Patienten erreicht werden kann. In vorangegangenen Arbeiten zeigten verschiedene Arbeiten den Zusamenhang zwischen MPO und einer Verschlechterung der Gefäßrelaxation durch schnelleren NO Abbau (Brennan, Penn et al. 2003; Nicholls and Hazen 2005; Baldus, Rudolph et al. 2006). Auch ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion wurde bereits beschrieben (Cai and Harrison 2000; Vita, Brennan et al. 2004).

Patienten, die im Zustand einer akuten Verschlechterung ihrer chronischen Herzinsuffizienz in das universitäre Herzzentrum kamen, zeigten bei Gabe einer Levosimendan-Infusion zunächst einen signifikanten Abfall von MPO-Plasmaspiegeln. In den sequentiellen Messungen der MPO-Spiegel konnte beobachtet werden, dass nach 6 Stunden ein signifikanter Abfall der MPO-Spiegel stattfand (MW von 215 ± 31,1 pg/ml nach 6h vs. 252 ± 28,0 pg/ml bei Baseline Untersuchung). Im Verlauf des Studienzeitraumes wurden steigende Messwerte beobachtet, zum Zeitpunkt des Follow-Up war gar eine signifikante Steigerung der MPO-Spiegel (377,4 ± 15,4) zu messen.

Bekannt ist, dass von Granulozyten ausgeschüttetes MPO an die Endothelwand bindet, akkumuliert und in den subendothelialen Raum gelangt, um dort NO zu oxidieren. Dies führt zu einer lokal verminderten Bioverfügbarkeit von NO und somit zu einer Verschlechterung der endothelialen Funktion (Eiserich, Baldus et al. 2002; Baldus, Heeschen et al. 2003; Mollnau, Schulz et al. 2003).

Dass Heparin eine wichtige Rolle beim Ablösen des MPO vom Endothel spielt und so zu einer Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit führt beschrieben Baldus et al. (Baldus, Rudolph et al. 2006). Heparinadministration verbessert weiterhin nicht nur die NO-

Bioverfügbarkeit, sondern ebenfalls die endotheliale Funktion bei Patienten (Rudolph, Rudolph et al. 2010).

In unserer Studie steht interessanterweise der Anstieg des MPO entgegen der verbesserten Endothelfunktion, die sich durch eine vermehrte Bioverfügbarkeit von NO darstellt, gemessen durch die hohen Nitritwerte in unserer Studie (Kleinbongard, Rassaf et al. 2002; Lauer, Kleinbongard et al. 2002; Tsikas 2007). Eventuell spielt hier ein anderer Faktor eine Rolle. Möglich ist, dass sich im Laufe unseres Beobachtungszeitraums MPO von der Endothelwand löst und somit mehr NO zur Verfügung steht. Denkbar wäre auch ein weiterer Mechanismus. Dadurch dass die Gabe von Levosimendan zu einem verringerten peripheren Widerstand mit vermehrter NO-Produktion beziehungsweise erniedrigten diastolischen Blutdruck führt setzt eine vermehrte kompensatorische Ausschüttung von MPO ein. Zu diesen Vermutungen sind allerdings keine Daten zu finden, weshalb diese beiden Ansätze rein spekulativ sind. Einzig Rudolph et al. beschrieb eine Verbesserung der endothelialen Funktion mit Anstieg der MPO-Plasmakonzentration nach Heparinadministration (Rudolph, Rudolph et al. 2010). Jedoch gab es in unseren Messungen zu keiner Zeit signifikante Unterschiede zwischen den MPO- oder Elastase-Plasma Spiegeln der Patienten mit oder ohne Heparingabe. Somit bleibt die Ursache des zu verzeichnenden MPO-Wiederanstiegs spekulativ.

Es ist bekannt, dass ein TNF-alpha induzierter proinflammatorischer Stimulus die Aufnahme von Makromolekülen in die luminale endotheliale Glykokalix erhöht (Henry and Duling 2000). Möglich wäre somit, dass ein generell reduzierter Inflammationsstatus nach Levosimendan-Gabe zu einer Restrukturierung der Glykokalix führt und so eine verminderte Bindung von MPO induziert wird.

Auf Grund von Umstrukturierungen der Glykokalix kann sich bekannterweise eine veränderte elektrostatische Interaktion von MPO mit dem Endothel ergeben (Klinke 2009) und somit ist eine Freisetzung von MPO vom Endothel möglich, vergl. (Bangalore and Travis 1994; Baldus 2001; Lau, Mollnau et al. 2005).

Zusätzlich zu diesen Beobachtungen lassen unsere in vivo Daten vermuten, dass Levosimendan und seine Metabolite einen systemischen Effekt auf die Aktivierung von PMN ausübt und somit niederigere Werte von MPO 6 Stunden und Elastase bis zu 24 Stunden nach einer Levosimendan-Infusion zu messen sind. Diese Vermutung

konnte bereits in einer aktuellen Studie der Arbeitsgruppe von Hasslacher et al. bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Levosimendan immunmodulatorische Effekte besitzt, indem es den sogenannten „oxidativen Burst“ von PMN verringert. Diese Eigenschaft könnte Teil der kardioprotektiven Wirkung von Levosimendan sein (Hasslacher, Bijuklic et al. 2011).

Unsere Studie zeigt, dass die ex vivo Inkubation von Vollblut mit Levosimendan nach Stimulation mit PMA/fMLP zu einer Senkung der MPO-Ausschüttung führt. Diese Beobachtung unterstreicht die immunmodulatorischen Effekte des Levosimendans. Zusätzlich lassen unsere ex vivo Ergebnisse einen systemischen Effekt des Levosimedan auf die PMN-Aktivierung vermuten, einhergehend mit erniedrigten MPO- und Elastase-Konzentrationen 24 Stunden nach Beginn der Behandlung mit Levosimendan. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch bereits veröffentlichte Daten, die zum einen eine verbesserte Endothelfunktion 24 Stunden nach Beginn einer Levosimendan Therapie zeigen (Parissis, Karavidas et al. 2008) und darüber hinaus, dass die endotheliale Funktion durch Leukozytenaktivierung und insbesondere durch die Aktivität des MPO beeinflusst wird (Baldus, Rudolph et al. 2006; Rudolph, Wipper et al. 2012). Klinke et al. bestätigt diesen Mechanismus und konnte zeigen, dass eine verringerte Rekrutierung von PMNs, die bei Aktivierung MPO ausschütten und die Endothelfunktion weiter verschlechtern würden, zu einer deutlich verbesserten Endothelfunktion führt (Klinke, Nussbaum et al. 2011).

Insgesamt wird vermutet, dass bei erhöhter NO-Konzentration im Plasma, vermehrt vorhandenes NO, produziert durch die konstitutive NOS (cNOS) oder die selektive induzierbare NO-Synthase (iNOS), die Migration von Neutrophilen herunterreguliert. Dieser Effekt scheint eine Folge der Verringerung der am Endothel haftenden und abgelösten Neutrophilen zu sein (Zitat Tanja Rudolph EHJ). Weiterhin scheint es eine induzierte Apoptose in den abgelösten/ abgewanderten Neutrophilen zu geben (Dal Secco, Paron et al. 2003).

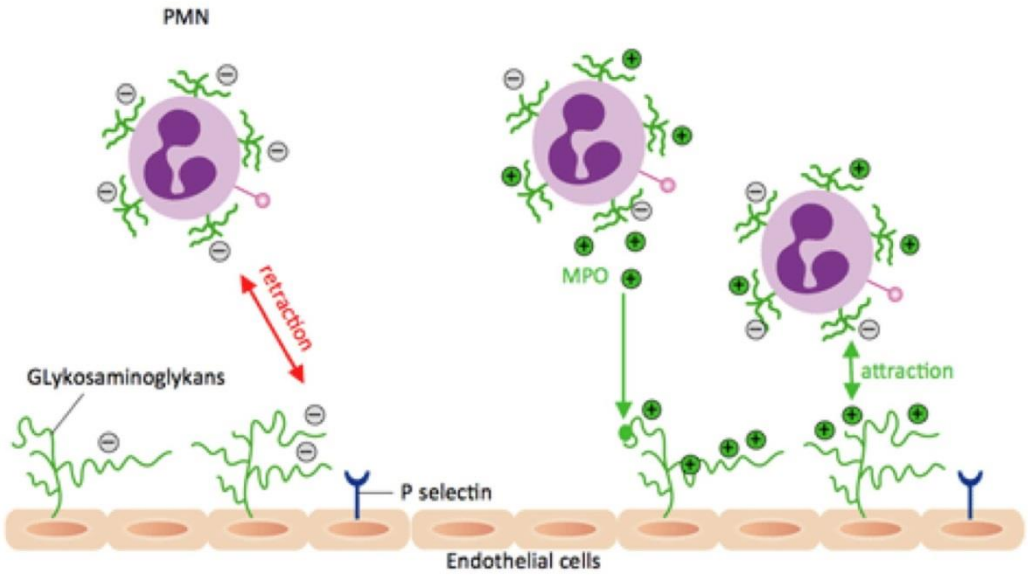


Abbildung 32: Schematische Darstellung der MPO-vermittelten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (PMN) durch Reduktion der elektrostatischen Abstoßung zwischen Glykokalyx von Endothel und PMN (Klinke, Nussbaum et al. 2011)

Die Elastasewerte zeigten zu Beginn unserer Studie eine starke signifikante Senkung. Im Verlauf und zum Follow up wurden Werte nahe des Ausgangsniveaus beziehungsweise des Zeitpunktes 1 Stunde gemessen.

Der relativ ähnliche Verlauf der Messwerte von Elastase im Zusammenhang mit MPO in unserer Studie zeigt, dass Elastase, ebenso wie MPO, von den frei zirkulierenden Granulozyten ausgeschüttet wird, da beide gemeinsam in den azurophilen Granulozyten gespeichert werden (Shapiro, Campbell et al. 1991). Im Tierversuch konnten kardioprotektive Effekte der Elastastase bei Ratten festgestellt werden (Tiefenbacher, Ebert et al. 1997).

Im Verlauf der Studie zeigten sich, wie bei den MPO-Werten, zunächst signifikante Senkungen der Elastase-Plasmalevel. Im Gegensatz zu den MPO-Werten, die gegen Ende der Studie signifikant erhöht waren, konnte bei den Elastase-Werten „nur“ Werte nahe der Ausgangswerte gemessen werden. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, wie schon von Rudolph et al. beschrieben, daß keine erneute Ausschüttung von Elastase bzw. MPO aus den Granulozyten stattgefunden hat, sondern MPO eventuell vom Gefäßendothel gelöst wurde, was erhöhte MPO-Plasmalevel zur Folge hat. Vergleiche (Rudolph, Rudolph et al. 2010).

In unserer Studie konnte bei der in vitro Inkubation von Elastase mit Levosimendan kein Unterschied gesehen werden. Die unterschiedliche Sekretion von MPO und Elastase in unseren Versuchen ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Reaktion auf die jeweiligen Stimuli (fMLP/PMA, AT II, TNF-α) zurückzuführen.

Dies konnte in einer Studie von Ceusters et al. in vitro bei Pferden gezeigt werden. Es wurde untersucht ob und wie sich die Myeloperoxidase- und Elastase-Ausschüttung aus Neutrophilen bei Pferden mit verschiedenen Stimuli unterscheiden. Als Stimuli wurden PMA, TNF-α, LPS (Lipopoylsaccharide) sowie die Kombination von Cytochalasin B (CB) mit fMLP und LPS mit TNF-α verwendet. Insgesamt wurde bei den Versuchen jeweils immer die Ausschüttung von MPO beobachtet, bei Elastase kam es dabei nie zu einer signifikanten Elastase-Sekretion, mit Ausnahme bei der Stimulation mit PMA (Ceusters, Serteyn et al. 2012).

Verschiedenste klinische Daten zeigen, dass durch eine Behandlung mit Levosimendan die Marker für oxidativen Stress nicht ansteigen und der beschleunigte Abbau von NO reduziert wird (Parissis, Andreadou et al. 2008). Dies konnte durch unsere Messungen bestätigt werden, durch den Nachweis von signifikant erhöhten Plasmakonzentration von Nitrit zum Studienende gegenüber dem Ausganswert.

Da NO ein sehr kurzlebiges Molekül ist, behalfen wir uns durch die gängige Griess Methode bei der im Plasma vorkommendes Nitrit gemessen wird vergl. (Kleinbongard, Rassaf et al. 2002; Lauer, Kleinbongard et al. 2002; Tsikas 2007). In einer Studie von Lauer et al. wurde gezeigt, dass die Messung von NO_2^- im Plasma des Kreislaufes des Unterarms, Änderungen in der lokalen eNOS-Aktivität widergespiegelt (Lauer, Preik et al. 2001).

Levosimendan verursacht einen konzentrationsabhängigen und Kalium assoziierten Anstieg der NO-Produktion. Dieser Effekt wurde von Grossini untersucht und zeigte eine Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), bedingt durch intrazelluläre Reaktionen von cAMP und dem Öffnen von mitchondrialen K^+-Kanälen (Grossini, Molinari et al. 2009). NO verhindert die Leukozytenadhäsion am Endothel die sich in einem nicht proliferativen Zustand befinden und limitiert gleichzeitig die Plättchenaggregation (Schäfer, Fraccarollo et al. 2009). Weiterhin besitzt NO die Fähigkeit die endotheliale Aktivierung zu begrenzen und eine

Adhäsion von Monozyten am Endothel zu verhindern, um so einige seiner antiatherogenen und entzündungshemmenden Eigenschaften innerhalb der Gefäßwand auszuüben (De Caterina, Libby et al. 1995). In unserer Studie konnte zum Follow-up ein hochsignifikanter Anstieg von Nitrit nach 7 Tagen gemessen werden, der als Ausdruck einer verbesserten Endothelfunktion und eventuell einer Regenerierung des Endothels zu sehen ist. Interessanterweise geht dieser Wert mit einer systemischen und körperlichen Verbesserung beziehungsweise Regression der dekompensierten Herzinsuffizienz einher vergl. (Parissis, Papadopoulos et al. 2007). Inwieweit diese hohen Werte von NO weiterbestehen, konnte durch unsere Studie nicht nachvollzogen werden und müsste in Studien untersucht werden. Weiterführende Studien hinsichtlich Persistenz der verbesserten kardialen Leistung, einer verbesserten körperlichen Leistungsfähigkeit und eventuell einem Stopp oder einer Regression der Herzinsuffizienz könnten weitere Aufschlüsse über die langfristigen Wirkungen von Levosimendan geben. Kleinere Studien zur Untersuchung unter anderem der „Quality of life“, einer verbesserten LV-Funktion und Symptom-Regression haben hierzu schon stattgefunden vergl. (Papadopoulou, Mavrogeni et al. 2009) (Mavrogeni, Giamouzis et al. 2007).

Erhöhte Nitrit-Plasma Level können weiterhin ein Indikator einer Makrophagen-Aktivierung sein (Tzeng, Ho et al. 2003). In unseren Ergebnissen fanden wir keine erhöhten NO- Plasmawerte korrelierend mit hohen Werten der Inflammation. Nach einer Woche waren keine signifikanten Anstiege von IL-6, Granulozyten, Leukozyten oder CRP zu messen. Bei den Granulozyten konnte insgesamt beobachtet werden, dass zunächst ein signifikanter Abfall stattfand, zum Studienende hin wurden Werte nahe dem Ausgangsniveau gemessen.

Ob ein Abfall der Granulozyten auf einen Verbrauch/ Abbau oder eine Konsumption zurückzuführen ist, kann aus unseren Ergebnissen nicht nachvollzogen werden. Womöglich ist der Granulozyten-Abfall ein Zeichen für den Verbrauch. Bei einer vermehrten Aktivierung von PMNs sollte jedoch auch der MPO- Spiegel ansteigen, was in unseren Daten nicht nachvollzogen werden kann.

Keine signifikanten Veränderungen konnten bei den Gesamt-Leukozyten-Zahlen gemessen werden.

Wie bereits erwähnt, besitzt Levosimendan anti-oxidative, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften. Insgesamt sind die immunmodulatorischen Eigenschaften noch nicht komplett verstanden. Sie könnten aber eine wichtige Rolle in der neurohumeralen Antwort bei Herzinsuffizienz spielen (Adamopoulos, Parissis et al. 2006; Zager, Johnson et al. 2006; Parissis, Andreadou et al. 2008). Dies ist von Bedeutung, da die Anzahl der Zytokine (IL-6 und TNF alpha) bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht sind und sowohl mit dem Schweregrad, als auch der Prognose der Herzinsuffizienz korrelieren (Torre-Amione, Kapadia et al. 1996; Mann 2002). Vor allem IL-6 zeigte einen signifikanten Abfall während des Studienzeitraumes. Der Verlauf dieses sensiblen pro-inflammatorischen Markers deutet auf eine Verbesserung der kardialen Leistung hin. Adamopoulus et al. beschrieb, dass Levosimendan anti-inflammatorische Effekte bei Patienten mit Herzinsuffizienz besitzt. Am 3. Tag einer Behandlung mit Levosimendan zeigte sich bei diesen Patienten eine Senkung der Werte von TNF-alpha, Interleukin-6 und den löslichen FAS-Liganden (Adamopoulos, Parissis et al. 2006). Die Werte des CRP nahmen nicht den von uns erwarteten Verlauf entsprechend denen des IL-6, sondern zeigten im Trend gegen Studienende einen nicht signifikanten Anstieg. Dieser Anstieg kann zum einen oder eventuell mehrere „Ausreißer“ im Patientenkollektiv hindeuten, was auch den großen Standardfehler bei diesen Messungen erklären würde.

Zum anderen konnte bei der Betrachtung der IL-6-Werte zunächst ein signifikanter Anstieg gemessen werden. Im Verlauf der Studie war dann jedoch ein Abfall der Werte ab dem Zeitpunkt 48 Stunden zu sehen. Zum Studienende waren IL-6 Spiegel auf Höhe des Ausgangsniveaus zu messen. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass in kardialen Myozyten von Ratten Ischämie und anschließende Reperfusion einen Anstieg von IL-6 zur Folge hatten (Yamauchi-Takihara, Ihara et al. 1995). Der zunächst signifikante Anstieg könnte durch die Effekte von Levosimendan und eine eventuell verbesserte kardiale Perfusion und Zirkulation erklärt werden, was wiederum zum beschriebenen Abfall von IL-6 führt. Weiterhin spiegelte sich in unserem Patientenkollektiv der zunächst beschriebene Anstieg von IL-6 nicht in der Steigung der CRP-Kurve wider, obwohl beide Marker positiv über den gesamten Studienzeitraum und die gesamte Studienpopulation miteinander korrelierten ($r=0.384$, $p<0.01$). Interessanterweise war sogar ein gegenteiliger Verlauf in den Kurven von IL-6 und CRP zu sehen, was umso überaschender ist da IL-6 einer der

Hauptinduktoren der Produktion der Akute-Phase-Proteine ist, zu denen CRP zählt. Studien zeigten, dass beide Marker während einer akuten linksventrikulären Dekompensation erhöht sind (Sato, Takatsu et al. 1999) und abfallen sobald die kardiale Situation verbessert wird. Unter bestimmten Bedingungen reagieren sie allerdings nicht identisch und dem Anstieg von Il-6 folgt kein Anstieg des CRP (Czarkowska-Paczek, Bartlomiejczyk et al. 2005). Eine therapeutische Unterstützung der Herzinsuffizienz mit Levosimendan könnte also dieser Situation ähneln, in der IL-6 ansteigt, CRP aber nicht unbedingt diesem Trend folgen muss.

Es konnte in verschiedenen älteren Studien gezeigt werden, dass erhöhte IL-6 und TNF-α Werte mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz einhergehen (Levine, Kalman et al. 1990; Torre-Amione, Kapadia et al. 1996; Tsutamoto, Hisanaga et al. 1998; Plenz, Song et al. 2001). Gleichzeitig erkannte man, dass Wirkstoffe, die die Zytokin-Level senken, die ventrikuläre Funktion und das klinische Bild der Herzinsuffizienz deutlich verbessern (Gullestad, Aass et al. 2001; Skudicky, Bergemann et al. 2001). Möglicherweise kann Levosimendan seine anti-apoptotischen und entzündungshemmenden Wirkungen durch die Verringerung von pro-inflammatotischen Zytokinen und von löslichen Apoptose Mediatoren entfalten (Parissis, Adamopoulos et al. 2004; Avgeropoulou, Andreadou et al. 2005; Kyrzopoulos, Adamopoulos et al. 2005).

Während wir in unserer Studie keine Aussage über die körperliche Belastarkeit treffen können, sind indirekte Marker der Rekompensation, wie ein Rückgang des Körpergewichtes und ein Abfall der Plasma NT-proBNP-Werte vorhanden.

Bei der Beobachtung des NT-proBNP zeigte sich ein deutlicher Abfall ab dem Zeitpunkt 24 Stunden, der bis zum Studienende deutlich messbar war. Insgesamt zeigten die NT-proBNP-Plasmaspiegel einen Abfall über den gesamten Studienzeitraum. Da NT-proBNP ein deutlicher Parameter für die Herzbelastung ist lässt er eine Aussage über die Abnahme der kardialen Belastung zu. Mebazza et al. beschrieb diese Beobachtung schon in der Survive Studie, in der Levosimendan im Vergleich mit Dobutamin angewendet wurde (Mebazaa, Nieminen et al. 2007). Levosimendan verringert die Vor- und Nachlast und hat positive inotrope und lusitrope Eigenschaften. Die Effekte auf die diastolische Funktion sind hauptächlich durch das ANS (autonomes Nervensystem) vermittelt (Harkin, Pagel et al. 1995).

NT-proBNP als hochsensitiver Marker in unserer Studie und BNP, als häufig benutzter Marker in veröffentlichten Studien, gelten als wichtige prognostische Faktoren der Herzinsuffizienz. Cheng et al. zeigte in seinen Studien, dass es einen deutlichen Zusammenhang zwischen hohen BNP-Werten, Mortalität und Rehospitalisierung gibt (Cheng, Kazanagra et al. 2001). Mit gesunkenen BNP-Werten während einer Behandlung der akut dekompensierten Herzinsuffizienz mit Levosimendan ging, im Gegensatz zu gleichbleibenden BNP-Werten, ein geringeres Mortalitätsrisiko einher (Cohen-Solal, Logeart et al. 2009). Auch wurde beobachtet, dass mit gesunkenen BNP-Werten, neben dem besseren Outcome und der geringeren Rehospitalisierungsrate, ein längerer klinisch unauffälliger, beziehungsweise ereignisfreier Zeitraum einherging (Farmakis, Parissis et al. 2010). Gleichzeitig wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass Levosimendan BNP deutlich senken kann und eine Verbesserung des klinischen Zustandes der Patienten zur Folge hat (Avgeropoulou, Andreadou et al. 2005; Kyrzopoulos, Adamopoulos et al. 2005; Moertl, Berger et al. 2005; Parissis, Panou et al. 2005). Diese bekannten Daten können durch unsere Studienergebnisse bestätigt werden.

Die Messwerte für Kreatinin zeigten in unserer Studie zunächst einen leichten Abfall, der nach 24 Stunden anhaltend bis zum Zeitpunkt 48 Stunden, signifikant niedrige Werte zeigte. Zum Zeitpunkt des Follow-up wurden Werte nahe dem Ausgangsniveau gemessen. Im Zusammenhang mit der Gabe von Levosimendan zeigten verschiedene Studien eine deutliche Verbesserung der Nierenfunktion nach Gabe von Levosimendan. Dies konnte bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, die auf eine Herztransplantation warteten, beobachtet werden (Zemljic, Bunc et al. 2007). Auch andere Autoren sahen eine Verbesserung der Nierenfunktion bei Gabe von Levosimendan (Zorlu, Yucel et al. 2012). Eine chinesische Forschergruppe konnte in einer placebokontrollierten Studie positive Effekte auf die renale Funktion bis 14 Tage nach Gabe von Levosimendan beobachten (Hou, Sun et al. 2013). Auch im Vergleich zu einer Behandlung mit Dobutamin zeigte sich in der Levosimendangruppe eine verbesserte Nierenfunktion (Yilmaz, Yalta et al. 2007). Bereits in den 90er Jahren wurden die positiven Effekte von Levosimendan auf die Nierenfunktion am Tiermodell beim Hund beobachtet (Pagel, Hettrick et al. 1996). In einem weiteren Tiermodell konnte an Schweinen ein renoprotektiver Effekt nachgewiesen werden (Grossini, Molinari et al. 2012). Derselbe Effekt wurde von Fedele et al. bei Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz nachgewiesen

(Fedele, Bruno et al. 2013). Diese Studien passen insgesamt zu unseren Beobachtungen. Einen interessanten Aspekt bildete der Zusammenhang zwischen Levosimendan und dem Gewicht der Patienten. 48 Stunden nach Beginn der Levosimendangabe konnte eine hochsignifikante Abnahme des Gewichts der Patienten gemessen werden. Dies wirft sich die Frage auf, wie dieser große Gewichtsverlust innerhalb des kurzen Studienzeitraumes zustande kommt. Bekannt ist, dass Levosimendan positive diuretische Eigenschaften besitzt (Tavares, Rezlan et al. 2008; Feola, Lombardo et al. 2011). Der gemessene Gewichtsverlust ist somit auf die vermehrte diuretische Wirkung von Levosimendan zurückzuführen. In einem aktuellen Konsensbericht wurden positive renale Effekte bei der Gabe von Levosimendan beobachtet (Yilmaz, Grossini et al. 2013). In der Herzchirurgie zeigen neuere Untersuchungen, dass Levosimendan eine gute Möglichkeit zur Verhinderung postoperativer Herzinsuffizienz/ Herzversagen, durch eine akute Nierenschädigung nach herzchirurgischem Eingriff sein könnte (Bragadottir, Redfors et al. 2013).

Hämoglobin zeigte in unserer Studie einen Abfall nach 1 Stunde, anhaltend bis zum Zeitpunkt 48 Stunden. Dies könnte mit der Dilution durch die Gabe der Infusion zu erklären sein. Im weiteren Verlauf der Studie steigt der Hb-Wert wieder an. In diesem Zuge nimmt auch das Körpergewicht zunächst zu, welches im Verlauf signifikant sinkt. In diesem Zusammenhang können auch die Ergebnisse für Kreatinin gesehen werden. Durch die Dilution mit der Levosimendan-Infusion kommt es zunächst zum Abfall und dann, mit zunehmender Diurese, zu einem Anstieg seiner Werte, einhergehend mit einer verminderten Flüssigkeitsretention im Kreislauf.

Bei der Herzfrequenz der Patienten konnten während des gesamten Studienzeitraumes keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. In anderen Studien wurden Anstiege der Herzfrequenz beobachtet, vergleiche (Kivikko, Antila et al. 2002). Betrachtet man das Patientenkollektiv, so kann man feststellen, dass alle Patienten im universitären Herzzentrum bekannt, im Vorfeld der Studie bereits medikamentös vorbehandelt und der Großteil (76%, n= 19) mit ß-Blocker austherapiert waren. Insgesamt war der Anteil der Patienten, die mit Beta-Blocker, Diuretika, Heparin und Statinen eine bestehende Vormedikation aufwiesen hoch. Allerdings ist diese Medikation im Rahmen einer vorbestehenden kardiologischen Erkrankung, respektive einer Herzinsuffizienz, typisch. Dies erklärt, weshalb hier

möglicherweise keine Anstiege der Herfrequenz beobachtet werden konnten. Insgesamt lassen sich aus unseren Ergebnissen aber keine weiteren Aussagen in Bezug zur Beeinflussung der Herzfrequenz durch Levosimendan machen.

6 Stunden nach Beginn der Infusion zeigte sich eine signifikante Senkung der diastolischen Blutdruckwerte, die über den gesamten Studienzeitraum bestehen blieben. In verschiedenen Studien wurden immer wieder Hypotonien beobachtet u.a. (Kivikko and Lehtonen 2005). Diese werden eventuell durch eine Aktivierung von Glibenclamid sensitiven Kalium- Kanälen ausgelöst, die eine Hyperpolarisation der arteriellen Myozyten zur Folge hat (Yokoshiki, Katsube et al. 1997; Kivikko and Lehtonen 2005). Auch in unserer Studie konnten Hypotonien beobachtet werden, die einen kurzfristigen Stopp der Infusion (maximal bis zu 1 Stunde) zur Folge und/ oder eine Anpassung der Laufrate an die jeweils aktuellen Blutdruckwerte und den körperlichen AZ hatten. Insgesamt wurden Daten von 2 Patienten aus unserer Studie indiziert, die im Verlauf der Studie katcheolamin- und somit intensivpflichtig wurden. Bei 4 Patienten musste aufgrund niedriger diastolischer Blutdrücke (>60mmHg) die Laufrate auf 11ml/h halbiert werden. Bei 2 Patienten war ein Stopp der Infusion für 1 Stunde und einer anschließenden Laufrate von 11ml/h zu dokumentieren. Alle Patienten erhielten die gesamte Menge Levosimendan infundiert. Eine wichtige Rolle bei der Vasodilatation stellen die Kalium-Kanäle dar (Yildiz 2007). Auch gibt es Hinweise darauf, dass die langlebigen Metabolite OR-1896 des Levosimendans für die langandauernde Vasodilatation eine Rolle spielen könnten (Erdei, Papp et al. 2006). Dass die diastolischen Blutdruck-Werte während des Behandlungszeitraumes/ Studienzeitraumes sinken, ist unter anderem aus der Survive Studie bekannt vergl.(Mebazaa, Nieminen et al. 2007) oder (Kivikko, Antila et al. 2002) und zeigte sich auch in unserer Studie deutlich. Michaels et al. konnte zeigen, dass trotz der Vasodilatation und dem damit einhergehenden verringerten koronaren Perfusiondruck durch Levosimendan eine verbesserte linkssystolische Funktion des Herzens einhergeht (Michaels, McKeown et al. 2005). Dies konnten wir anhand des deutlich besseren AZ der Patienten und deren subjektiven besseren Wohlbefinden in Kombination mit einem Abfall von Gewicht und NT-proBNP nachvollziehen. Daten einer erneuten Echokardiographie, zur Messung einer eventuell verbesserten EF, sind jedoch nicht vorhanden und lassen somit nur einen Zusammenhang vermuten.

8.1 Limitationen

In dieser Arbeit wurden insgesamt 25 Patienten beobachtet. Der angesetzte Zeitraum für die Studie betrug 7 Tage. Den gesamten Studienzeitraum durchliefen 17 Patienten. Diese Tatsache schränkt die Aussagekraft der in vivo Ergebnisse ein. Die Gründe für das vorzeitige Ausscheiden der Patienten aus der Studie wurden bereits genannt. Eine Vergleichsgruppe beziehungsweise Placebogruppe mit gleichem Studienaufbau hätte die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse vergleichbarer gemacht und die zu Studienbeginn aufgestellten Thesen stützen oder entkräften können. Aus moralisch-ethischen und medizinischen Gründen war eine solche Vergleichsgruppe nicht möglich, da den Patienten eine wahrscheinlich nützliche Therapie mit Levosimedan vorenthalten worden wäre.

Ein verlängerter Studienzeitraum hinsichtlich des klinischen Zustandes der Patienten mit abschließender oder intermittierender Befunderhebung (erneute Echokardiographie und Bestimmung der EF, Folge-Herzkatheter, Bestimmung von Laborparametern wie NT-proBNP, Messung des Nitrits/ NO-Bioverfügbarkeit, MPO-/ Elastase-Spiegel, erneute Klassifikation nach NYHA) könnte weitere Aspekte hinsichtlich der Wirkdauer sowie die langfristigen Wirkungen einer Levosimendangabe ergeben. Durch die Kenntnis, ob durch eine Levosimendan-Therapie ein Stopp oder sogar eine langfristige Verbesserung der Herzinsuffizienz bewirkt wird und ob repititive Gaben von Levosimendan dieselben Effekte hervorrufen, würde der Therapie mit Levosimendan einen neuen Stellenwert in der Behandlung der Herzinsuffizienz zuweisen. Im Weiteren wäre zu untersuchen welche Zeitabstände zwischen den Gaben/ Therapien mit Levosimedan sinnvoll sind und einen nachgewiesenen Effekt auf die Progression oder den Stopp einer Herzinsuffizienz haben. Parameter einer verbesserten körperlichen Leistungsfähigkeit wären ein weiterer interessanter Aspekt in Hinsicht auf die längerfristigen Wirkeigenschaften des Levosimendan, zumal bekannt ist, dass körperliche Aktivität die Belastbarkeit und Endothelfunktion bei Herzinsuffizienz-Patienten erhöht, vergl. (Hambrecht, Niebauer et al. 1995; Hornig, Maier et al. 1996; Hambrecht, Fiehn et al. 1998; Linke, Schoene et al. 2001)

Andere Techniken bei der Messung der Endothelfunktion, wie FMD etc. hätten unsere Beobachtungen mit einem direkten Nachweis der Wirkung von Levosimendan auf die Endothelfunktion unterstützen können.

9 Zusammenfassung

Bei der Behandlung der Herzinsuffizienz kommt seit mehreren Jahren Levosimendan erfolgreich zur Anwendung. Bisher noch nicht untersucht wurde dabei der immunmodulatorische Effekt von Levosimendan auf die endotheliale und leukozytäre Funktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Enzym Myeloperoxidase, welches bei Aktvierung aus neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird. Ein Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und Myeloperoxidase konnte durch Studien bereits belegt werden.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung der akut dekompensierten Herzinsuffizienz mit Levosimendan die Ausschüttung von MPO und Elastase aus neutrophilen Granulozyten, bei Patienten im Stadium der akuten Dekompensation einer Herzinsuffizienz, signifikant reduziert wird.

Weiterhin konnte im ex vivo Versuch festgestellt werden, dass eine Inkubation von Vollblut mit Levosimendan zu einer verringerten MPO-Ausschüttung nach Stimulation mit fMLP / PMA führt.

Signifikant erhöhte Nitrit-Plasmaspiegel als Marker der NO-Bioverfügbarkeit und der Endothelfunktion zum Ende der Studie unterstreichen die Wirksamkeit von Levosimendan im Rahmen der akuten Dekompensation einer Herzinsuffizienz und lassen eine verbesserte Endothelfunktion eine Woche nach Levosimendan-Gabe vermuten. Dieser Effekt ist verbunden mit einem Wiederanstieg des MPOs im Plasma, ein Fakt, der auf eine mögliche Interaktion zwischen Endothelfunktion und der Menge des endothelial gebundenen MPO hinweisen könnte. Ob es sich hierbei jedoch um einen direkten Effekt des Levosimendans auf das Endothel und MPO handelt, oder beispielsweise um das Surrogat einer kompensatorischen Reaktion auf einen vermehrten Abfall des peripheren Widerstandes bleibt spekulativ und sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Zusammenfassend können wir in unserer Studie die immunmodulatorischen Effekte von Levosimendan bestätigen und auf das Enzym Myeloperoxidase ausweiten. Dieser Mechanismus könnte für die Regulation der endothelialen Funktion sowie des Gefäßtonus bei Herzinsuffizienz-Patienten wichtig sein.

10 Abkürzungsverzeichnis

AHA	American Heart Association
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Angina Pectoris
AT II	Angiotensin II
BE	Blutentnahme
BGA	Blutgasanalyse
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
Bpm	Beats per minute; Schläge pro Minute
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclisches Aminomonophosphat
CHF	Chronic heart failure
CRP	C-Reaktives Protein
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektions Fraktion
ESC	European Society of Cardiology
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HI	Herzinsuffizienz
hsCRP	High sensitivity C-Reactive Protein
ICD 10	Internationales Krankheitsklassifikationssystem
IL 6	Interleukin 6
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Kardiomyopathie
LPS	Lipopoylsaccharide
LÖ	Lungenödem
MI	Myokardinfarkt
MPO	Myeloperoxidase
MRDR	Modification of Diet in Renal Disease

MW	Mittelwert
NaCL	Natrium Chlorid 0,9%
NO	Stickstoffmonoxid
NT-pro BNP	N-terminales-proBNP
NVL	Nationale Versorgungsleitlinien
NYHA	New York Heart Association
OD	Optische Dichte
PCWP	Pulmonary Capillary Wedge Pressure, Verschlussdruck
PEEP	Positiv endexspiratorischer Druck
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
RCF	relative centrifugal force
RPM	Revolutions per minute
RR	Blutdruck
SEM	Standardfehler

Tabelle 31: Abkürzungsverzeichnis

11 Patienteninformation

Anlage 1

Blutentnahmen zur Bestimmung von Plasmaspiegeln der leukozytären und endothelialen Funktion vor, während und nach Applikation von Levosimendan

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

sie sind an einer Herzinsuffizienz (Einschränkung der Pumpleistung des Herzens) erkrankt. Auf Grund dieser Tatsache werden sie in unserem Krankenhaus behandelt.

Um Ihre Erkrankung besser zu verstehen, führen wir eine Studie durch. Dabei interessiert uns vor allem, inwiefern die Funktion ihrer weißen Blutkörperchen und ihrer Gefäße durch die Herzschwäche verändert sind, und ob sie durch Medikamente beeinflusst werden kann. Wir würden Ihnen gerne anbieten, an dieser Studie teilzunehmen. Die Teilnahme ist selbstverständlich freiwillig.

Sie müssen allerdings davon ausgehen, dass die Ergebnisse der Studie für sie momentan noch nicht von Nutzen sind, da wir erst am Anfang der wissenschaftlichen Arbeit stehen.

Diese Studie sieht eine Untersuchung von 2 Patientengruppen vor, um diese miteinander vergleichen zu können.

Im ersten Fall sehen ihre behandelnden Ärzte bei Ihnen momentan die Indikation zu einer Behandlung mit einem Medikament mit dem Namen Levosimendan. Dieses Medikament soll helfen, die Pumpkraft ihres Herzens zu unterstützen.

Im zweiten Fall ist die Herzinsuffizienz bei Ihnen stabil und sie sind momentan ambulant oder stationär in ärztlicher Behandlung. In diesem Fall sind Sie ein Patient der Kontrollgruppe. Die Teilnahme an der Studie bedeutet für sie einen zeitlichen Mehraufwand, alle Untersuchungen sind jedoch selbstverständlich ambulant möglich.

Aus früheren wissenschaftlichen Arbeiten wissen wir, dass durch Herzinsuffizienz auch gewisse Eiweisse, z.B. die Myeloperoxidase (MPO), im Blut in veränderten

Konzentrationen auftreten. Der Zusammenhang zwischen der Herzschwäche und den Blut-Konzentrationen dieser Eiweisse ist noch nicht gut verstanden. Wir wissen jedoch, daß die Myeloperoxidase-Konzentration im Blut bei herzschwachen Patienten höher ist, als bei herzgesunden Menschen. Wahrscheinlich kommt es durch die Herzschwäche zu einer Aktivierung von weißen Blutzellen, die dann vermehrt MPO ausschütten.

Daher ist es für uns von grosser Bedeutung, zu verstehen, was mit den Blut-Konzentrationen dieser Proteine passiert, wenn ein Medikament wie Levosimendan die Pumpleistung ihres Herzens unterstützt und damit die Herzinsuffizienz verbessert.

Zur Messung der Konzentration dieser Proteine benötigen wir insgesamt 6x zusätzliche Blutentnahmen von Ihnen, entweder weil Sie das Medikament Levosimendan erhalten, oder weil wir Ihr Blut als Referenzwert (Bezugswert) benötigen. Die Blutentnahmen werden zu Beginn der Therapie oder zum Startzeitpunkt der Beobachtung, 1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Beginn abgenommen. Weiterhin bitten wir sie, genau 1 Woche nach Beginn der Studie erneut um eine Blutentnahme. Bei jeder Blutentnahme nehmen wir genau 21,1ml Blut ab, somit werden im Laufe einer Woche maximal 126,6ml Blut abgenommen. Diese Menge führt aller Erfahrung nach nicht zu einer Beeinträchtigung der Durchblutung oder des Befindens und liegt deutlich unter der Menge, die beispielsweise bei einer Blutspende entnommen wird.

Das Risiko für sie ist sehr klein, es kann lediglich in seltenen Fällen zur Hämatombildung an der Einstichstelle und in seltensten Fällen zur Infektion oder Nervenverletzungen kommen.

Sollten sie im Rahmen der Krankenhaus-Routine noch kein Herz-Ultraschall erhalten haben, werden sie diese Untersuchung, die mit wenig Aufwand machbar ist und bei der keine Risiken bestehen, im Rahmen der Studie erhalten.

Der Informationsgewinn für die Wissenschaft ist sehr hoch, so dass wir Ihnen für die Teilnahme an dieser Studie sehr dankbar wären.

Alle medizinischen Entscheidungen trifft weiterhin ihr betreuender Arzt, die Therapie und weitere Nachsorge, sei es stationär oder ambulant, in der Patientengruppe mit

Levosimendanbehandlung oder in der Kontrollgruppe, findet unverändert von der Studie weiterhin im normalen Rahmen statt.

Die Teilnahme an dieser Studie ist selbstverständlich freiwillig, Sie können zu jedem Zeitpunkt ohne Nachteile für Sie von der Teilnahme zurücktreten.

Datenschutz:
Die im Rahmen der Studie nach Einverständniserklärung erhobenen persönlichen Daten, insbesondere Befunde, unterliegen der Schweigepflicht und den datenschutzrechtlichen Bestimmungen. Sie werden in Papierform und auf Datenträger im Universitären Herzzentrum aufgezeichnet bzw. pseudonymisiert (verschlüsselt)[1] gespeichert.
Die Nutzung der Daten erfolgt in pseudonymisierter Form.

Eine Weitergabe der erhobenen Daten im Rahmen des Forschungszwecks erfolgt nur in pseudonymisierter Form. Gleiches gilt für die Veröffentlichung der Studienergebnisse.

Sie haben das Recht, über die von Ihnen stammenden personenbezogenen Daten Auskunft zu verlangen, und über möglicherweise anfallenden personenbezogene Ergebnisse der Studie gegebenenfalls informiert oder nicht informiert zu werden. Gegebenfalls wird der Leiter der Studie Ihre Entscheidung darüber einholen.
Die Aufzeichnung bzw. Speicherung der Daten erfolgt für die Dauer von 15 Jahren.
Im Falle des Widerrufs des Einverständnisses werden die bereits erhobenen Daten entweder gelöscht oder anonymisiert[2] in dieser Form weiter genutzt.

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!

12 Patienteneinwilligung

Anlage 2

Blutentnahmen zur Bestimmung von Plasmaspiegeln der leukozytären und endothelialen Funktion vor, während und nach Applikation von Levosimendan

Name, Vorname:

.....

Geburtsdatum:.....

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig.

Ich bin über das Ziel, die Bedeutung und den Ablauf der Studie zur Bestimmung von Plasmaspiegeln der leukozytären und endothelialen Funktion vor, während und nach der Therapie von Levosimendan unterrichtet worden.

Das mir ausgehändigte Informationsblatt habe ich gelesen. Alle Fragen bezüglich der Blutentnahme und den Studienablauf wurden mir in verständlicher Form beantwortet.

Über die eventuellen Risiken wurde ich eingehend aufgeklärt. Ich bin mit der Teilnahme an der Studie und den damit verbundenen Untersuchungen einverstanden.

Durch meine Unterschrift erkläre ich mich auch damit einverstanden, daß die im Rahmen der Studie an mir erhobenen Krankheitsdaten aufgezeichnet und in pseudonymisierter Form veröffentlicht werden dürfen.

Ich wurde darüber informiert, daß ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen widerrufen kann, ohne daß mir daraus persönliche Nachteile entstehen.

.....

Ort, Datum

....

Unterschrift des aufklärenden Arztes Unterschrift des Patienten

13 Literaturnachweis

Abassi, Z., T. Karram, et al. (2004). "Implications of the natriuretic peptide system in the pathogenesis of heart failure: diagnostic and therapeutic importance." Pharmacol Ther **102**(3): 223-241.

Ackerman, M. J., S. G. Priori, et al. (2011). "HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA)." Heart Rhythm **8**(8): 1308-1339.

Adamopoulos, S., J. T. Parissis, et al. (2006). "Effects of levosimendan versus dobutamine on inflammatory and apoptotic pathways in acutely decompensated chronic heart failure." Am J Cardiol **98**(1): 102-106.

Akar, F., Y. Manavbasi, et al. (2007). "The gender differences in the relaxation to levosimendan of human internal mammary artery." Cardiovasc Drugs Ther **21**(5): 331-338.

Amaro, A., F. Gude, et al. (1995). "Activity of leucocyte elastase in women with coronary artery disease documented using angiography." J Cardiovasc Risk **2**(2): 149-153.

Antila, S., A. Jarvinen, et al. (1997). "Studies on psychomotoric effects and pharmacokinetic interactions of the new calcium sensitizing drug levosimendan and ethanol." Arzneimittelforschung **47**(7): 816-820.

Antila, S., M. Kivikko, et al. (2004). "Pharmacokinetics of levosimendan and its circulating metabolites in patients with heart failure after an extended continuous infusion of levosimendan." Br J Clin Pharmacol **57**(4): 412-415.

Antila, S., S. Sundberg, et al. (2007). "Clinical pharmacology of levosimendan." Clin Pharmacokinet **46**(7): 535-552.

Askari, A. T., M.-L. Brennan, et al. (2003). "Myeloperoxidase and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Play a Central Role in Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction." The Journal of Experimental Medicine **197**(5): 615-624.

Avgeropoulou, C., I. Andreadou, et al. (2005). "The Ca2+-sensitizer levosimendan improves oxidative damage, BNP and pro-inflammatory cytokine levels in patients with advanced decompensated heart failure in comparison to dobutamine." Eur J Heart Fail **7**(5): 882-887.

Baldus, S. (2001). "Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration." J Clin Invest **108**(12): 1759-1770.

Baldus, S., C. Heeschen, et al. (2003). "Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes." Circulation **108**(12): 1440-1445.

Baldus, S., T. Heitzer, et al. (2004). "Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion." Free Radic Biol Med **37**(6): 902-911.

Baldus, S., R. Koster, et al. (2005). "Oxypurinol improves coronary and peripheral endothelial function in patients with coronary artery disease." Free Radic Biol Med **39**(9): 1184-1190.

Baldus, S., K. Mullerleile, et al. (2006). "Inhibition of xanthine oxidase improves myocardial contractility in patients with ischemic cardiomyopathy." Free Radic Biol Med **41**(8): 1282-1288.

Baldus, S., V. Rudolph, et al. (2006). "Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase." Circulation **113**(15): 1871-1878.

Bangalore, N. and J. Travis (1994). "Comparison of properties of membrane bound versus soluble forms of human leukocytic elastase and cathepsin G." Biol Chem Hoppe Seyler **375**(10): 659-666.
Bauersachs, J. and A. Schafer (2004). "Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches." Curr Vasc Pharmacol **2**(2): 115-124.
Bragadottir, G., B. Redfors, et al. (2013). "Effects of levosimendan on glomerular filtration rate, renal blood flow, and renal oxygenation after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a randomized placebo-controlled study." Crit Care Med **41**(10): 2328-2335.
Brennan, M. L., M. S. Penn, et al. (2003). "Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain." N Engl J Med **349**(17): 1595-1604.
Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-844.
Ceusters, J. D., D. A. Serteyn, et al. (2012). "An in vitro whole blood model to test the effects of different stimuli conditions on the release of myeloperoxidase and elastase by equine neutrophils." Vet Immunol Immunopathol **150**(3-4): 221-227.
Chen, H. H. and J. C. Burnett (2000). "Natriuretic peptides in the pathophysiology of congestive heart failure." Curr Cardiol Rep **2**(3): 198-205.
Cheng, V., R. Kazanagra, et al. (2001). "A rapid bedside test for B-type peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study." J Am Coll Cardiol **37**(2): 386-391.
Clark, A. L., M. Loebe, et al. (2001). "Ventricular assist device in severe heart failure: effects on cytokines, complement and body weight." Eur Heart J **22**(24): 2275-2283.
Cohen-Solal, A., D. Logeart, et al. (2009). "Lowered B-type natriuretic peptide in response to levosimendan or dobutamine treatment is associated with improved survival in patients with severe acutely decompensated heart failure." J Am Coll Cardiol **53**(25): 2343-2348.
Coym, A. (2011). Regulaion der Endothelfunktion durch das leukozytäre Hämprotein Myeloperoxidase, Universität Hamburg.
Czarkowska-Paczek, B., I. Bartlomiejczyk, et al. (2005). "Lack of relationship between interleukin-6 and CRP levels in healthy male athletes." Immunol Lett **99**(1): 136-140.
Dal Secco, D., J. A. Paron, et al. (2003). "Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis." Nitric Oxide **9**(3): 153-164.
De Caterina, R., P. Libby, et al. (1995). "Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines." J Clin Invest **96**(1): 60-68.
de Lemos, J. A., D. A. Morrow, et al. (2001). "The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes." N Engl J Med **345**(14): 1014-1021.
Del Ry, S. (2013). "C-type natriuretic peptide: a new cardiac mediator." Peptides **40**: 93-98.
Del Ry, S., C. Passino, et al. (2006). "C-type natriuretic peptide and heart failure." Pharmacol Res **54**(5): 326-333.
DESTATIS (2010). Gesundheitsausgaben in Deutschland.

DESTATIS (2012). Sterbefälle insgesamt 2012 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10, Statistisches Bundesamt.
DESTATIS (2014). Krankheitskosten: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD10). Gesundheit.
Dickstein, K., A. Cohen-Solal, et al. (2008). "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 Heart J **29**(19): 2388-2442.
Earl, G. L. and J. T. Fitzpatrick (2005). "Levosimendan: a novel inotropic agent for treatment of acute, decompensated heart failure." Ann Pharmacother **39**(11): 1888-1896.
Eiserich, J. P., S. Baldus, et al. (2002). "Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase." Science **296**(5577): 2391-2394.
Erdei, N., Z. Papp, et al. (2006). "The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the K(ATP) and BK(Ca) channels in rat isolated arterioles." Br J Pharmacol **148**(5): 696-702.
Farmakis, D., J. T. Parissis, et al. (2010). "Plasma B-type natriuretic peptide reduction predicts long-term response to levosimendan therapy in acutely decompensated chronic heart failure." Int J Cardiol **139**(1): 75-79.
Fedele, F., N. Bruno, et al. (2013). "Levosimendan improves renal function in acute decompensated heart failure: possible underlying mechanisms." Eur J Heart Fail.
Feola, M., E. Lombardo, et al. (2011). "Effects of levosimendan/furosemide infusion on plasma brain natriuretic peptide, echocardiographic parameters and cardiac output in end-stage heart failure patients." Med Sci Monit **17**(3): PI7-13.
Follath, F., J. G. Cleland, et al. (2002). "Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial." Lancet **360**(9328): 196-202.
Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.
Grossini, E., C. Molinari, et al. (2009). "Levosimendan induces NO production through p38 MAPK, ERK and Akt in porcine coronary endothelial cells: role for mitochondrial K(ATP) channel." Br J Pharmacol **156**(2): 250-261.
Grossini, E., C. Molinari, et al. (2012). "Levosimendan protection against kidney ischemia/reperfusion injuries in anesthetized pigs." J Pharmacol Exp Ther **342**(2): 376-388.
Guimaraes-Costa, A. B., M. T. Nascimento, et al. (2009). "Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(16): 6748-6753.
Gullestad, L., H. Aass, et al. (2001). "Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure." Circulation **103**(2): 220-225.
Hambrecht, R., E. Fiehn, et al. (1998). "Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure." Circulation **98**(24): 2709-2715.

Hambrecht, R., J. Niebauer, et al. (1995). "Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles." J Am Coll Cardiol **25**(6): 1239-1249.
Harkin, C. P., P. S. Pagel, et al. (1995). "Systemic and coronary hemodynamic actions and left ventricular functional effects of levosimendan in conscious dogs." J Cardiovasc Pharmacol **26**(2): 179-188.
Hasslacher, J., K. Bijuklic, et al. (2011). "Levosimendan inhibits release of reactive oxygen species in polymorphonuclear leukocytes in vitro and in patients with acute heart failure and septic shock: a prospective observational study." Crit Care **15**(4): R166.
Henry, C. B. and B. R. Duling (2000). "TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(6): H2815-2823.
Hoppe (2009). "Pocket Leitlinien, Therapie der chronischen und akuten Herzinsuffizienz, Update 2009."
Hoppe, E. (2011). Klinische Kardiologie, DOI 10.1007/978-3-642-16481-1 _5, E.Erdmann.
Hornig, B., V. Maier, et al. (1996). "Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure." Circulation **93**(2): 210-214.
Hou, Z. Q., Z. X. Sun, et al. (2013). "Effect of levosimendan on estimated glomerular filtration rate in hospitalized patients with decompensated heart failure and renal dysfunction." Cardiovasc Ther **31**(2): 108-114.
Ignarro, L. J., G. M. Buga, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9269.
Jackson, G. (2000). "ABC of heart failure. Pathophysiology." BMJ **320**(7228): 167-170.
John J.V. McMurray, S. A., Stefan D. Anker, Angelo Auricchio, Michael Boehm, Kenneth Dickstein, Volkmar Falk, Gerasimos Filippatos, Candida Fonseca, Miguel Angel Gomez Sanchez, Tiny Jaarsma, Lars Kober, Gregory Y.H. Lip, Aldo Pietro Maggioni, Alexander Parkhomenko, Burket M. Pieske, Bogdan A. Popescu, Per K. Roennevik, Frans H. Rutten, Juerg Schwitter, Petar Seferovic, Janina Stepinska, Pedro T. Trindade, Adriaan A. Voors, Faiez Zannad, Andreas Zeiher (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment

of acute and chronic heart failure 2012 European Heart Journal (2012) 33, 1787–1847

doi:10.1093/eurheartj/ehs104. **EHJ 2012:33;1787-1847**.
Kalra, P. R., J. R. Clague, et al. (2003). "Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure." Circulation **107**(4): 571-573.
Karlsson, M., T. Korkolainen, et al. (1997). "Automated analysis of levosimendan in human plasma by on-line dialysis and liquid chromatography." Biomed Chromatogr **11**(1): 54-58.
Kivikko, M., S. Antila, et al. (2002). "Pharmacodynamics and safety of a new calcium sensitizer, levosimendan, and its metabolites during an extended infusion in patients with severe heart failure." J Clin Pharmacol **42**(1): 43-51.
Kivikko, M., S. Antila, et al. (2002). "Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure." Int J Clin Pharmacol Ther **40**(10): 465-471.

Kivikko, M. and L. Lehtonen (2005). "Levosimendan: a new inodilatory drug for the treatment of decompensated heart failure." Curr Pharm Des **11**(4): 435-455.
Kivikko, M., L. Lehtonen, et al. (2003). "Sustained hemodynamic effects of intravenous levosimendan." Circulation **107**(1): 81-86.
Klebanoff, S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." J Leukoc Biol **77**(5): 598-625.
Kleinbongard, P., T. Rassaf, et al. (2002). "Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein-containing samples." Methods Enzymol **359**: 158-168.
Klinke, A. (2009). Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten
Klinke, A., C. Nussbaum, et al. (2011). "Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces." Blood **117**(4): 1350-1358.
Kohno, M., T. Horio, et al. (1995). "Brain natriuretic peptide as a marker for hypertensive left ventricular hypertrophy: changes during 1-year antihypertensive therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitor." Am J Med **98**(3): 257-265.
Kopustinskiene, D. M., P. Pollesello, et al. (2001). "Levosimendan is a mitochondrial K(ATP) channel opener." Eur J Pharmacol **428**(3): 311-314.
Kyrzopoulos, S., S. Adamopoulos, et al. (2005). "Levosimendan reduces plasma B-type natriuretic peptide and interleukin 6, and improves central hemodynamics in severe heart failure patients." Int J Cardiol **99**(3): 409-413.
Lam, C. S. P., E. Donal, et al. (2011). "Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction." Eur J Heart Fail **13**(1): 18-28.
Landoni, G. e. a. (2010). "Levosimendan reduces mortality in critically ill patients. A meta-analysis of randomized controlled studies." Minerva Anestesiol **76**(4): 276-286.
Lau, D. and S. Baldus (2006). "Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease." Pharmacol Ther **111**(1): 16-26.
Lau, D., H. Mollnau, et al. (2005). "Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(2): 431-436.
Lauer, T., P. Kleinbongard, et al. (2002). "Indexes of NO bioavailability in human blood." News Physiol Sci **17**: 251-255.
Lauer, T., M. Preik, et al. (2001). "Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12814-12819.
Lehtonen, L. A. (2001). "Levosimendan: a parenteral calcium-sensitising drug with additional vasodilatory properties." Expert Opin Investig Drugs **10**(5): 955-970.
Levine, B., J. Kalman, et al. (1990). "Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure." N Engl J Med **323**(4): 236-241.
Lilleberg, J., M. Laine, et al. (2007). "Duration of the haemodynamic action of a 24-h infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure." Eur J Heart Fail **9**(1): 75-82.
Linke, A., N. Schoene, et al. (2001). "Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: systemic effects of lower-limb exercise training." J Am Coll Cardiol **37**(2): 392-397.
Ludmer, P. L., A. P. Selwyn, et al. (1986). "Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries." N Engl J Med **315**(17): 1046-1051.

Lunghetti, S., E. Palmerini, et al. "Effects of levosimendan without loading dose on systolic and diastolic function in patients with end-stage heart failure." Cardiol J **18**(5): 532-537.
Lunghetti, S., E. Palmerini, et al. (2011). "Effects of levosimendan without loading dose on systolic and diastolic function in patients with end-stage heart failure." Cardiol J **18**(5): 532-537.
Lymperopoulos, A., G. Rengo, et al. (2007). "Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation." Trends Mol Med **13**(12): 503-511.
Maeda, K., T. Tsutamoto, et al. (2000). "High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure." J Am Coll Cardiol **36**(5): 1587-1593.
Mann, D. L. (2002). "Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future." Circ Res **91**(11): 988-998.
Mavrogeni, S., G. Giamouzis, et al. (2007). "A 6-month follow-up of intermittent levosimendan administration effect on systolic function, specific activity questionnaire, and arrhythmia in advanced heart failure." J Card Fail **13**(7): 556-559.
Maytin, M. and W. S. Colucci (2005). "Cardioprotection: a new paradigm in the management of acute heart failure syndromes." Am J Cardiol **96**(6A): 26G-31G.
Mebazaa, A., M. S. Nieminen, et al. (2007). "Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial." JAMA **297**(17): 1883-1891.
Mehta, J., J. Dinerman, et al. (1989). "Neutrophil function in ischemic heart disease." Circulation **79**(3): 549-556.
Meuwese, M. C., E. S. Stroes, et al. (2007). "Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study." J Am Coll Cardiol **50**(2): 159-165.
Michaels, A. D., B. McKeown, et al. (2005). "Effects of intravenous levosimendan on human coronary vasomotor regulation, left ventricular wall stress, and myocardial oxygen uptake." Circulation **111**(12): 1504-1509.
Modena, M. G., P. Aveta, et al. (2001). "Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction." Am Heart J **141**(1): 41-46.
Moertl, D., R. Berger, et al. (2005). "Short-term effects of levosimendan and prostaglandin E1 on hemodynamic parameters and B-type natriuretic peptide levels in patients with decompensated chronic heart failure." Eur J Heart Fail **7**(7): 1156-1163.
Moiseyev, V. S., P. Poder, et al. (2002). "Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN)." Eur Heart J **23**(18): 1422-1432.
Mollnau, H., E. Schulz, et al. (2003). "Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(4): 615-621.
Mosterd, A. and A. W. Hoes (2007). "Clinical epidemiology of heart failure." Heart **93**(9): 1137-1146.
Mukoyama, M., K. Nakao, et al. (1991). "Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system,

atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide." J Clin Invest **87**(4): 1402-1412.
Neumann, T. (2009). "Herzinsuffizienz: Häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte." Deutsches Ärzteblatt.
Nicholls, S. J. and S. L. Hazen (2005). "Myeloperoxidase and cardiovascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(6): 1102-1111.
Nieminen, M. S., J. Akkila, et al. (2000). "Hemodynamic and neurohumoral effects of continuous infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure." J Am Coll Cardiol **36**(6): 1903-1912.
Nussbaum, C., A. Klinke, et al. (2013). "Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease." Antioxid Redox Signal **18**(6): 692-713.
O'Rourke, B. (2004). "Evidence for mitochondrial K+ channels and their role in cardioprotection." Circ Res **94**(4): 420-432.
Packer, M., W. S. Colucci, et al. (2003). "Development of a comprehensive new endpoint for the evaluation of new treatments for acute decompensated heart failure: results with levosimendan in the REVIVE 1 study." Journal of Cardiac Failure **9**(5, Supplement 1): S61-S61.
Pagel, P. S., D. A. Hettrick, et al. (1996). "Influence of levosimendan, pimobendan, and milrinone on the regional distribution of cardiac output in anaesthetized dogs." Br J Pharmacol **119**(3): 609-615.
Papadopoulou, E. F., S. I. Mavrogeni, et al. (2009). "Assessment of quality of life using three activity questionnaires in heart failure patients after monthly, intermittent administration of levosimendan during a six-month period." Hellenic J Cardiol **50**(4): 269-274.
Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, et al. (2010). "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps." J Cell Biol **191**(3): 677-691.
Papp, Z., I. Edes, et al. "Levosimendan: Molecular mechanisms and clinical implications Consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan." Int J Cardiol.
Papp, Z., I. Edes, et al. (2012). "Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan." Int J Cardiol **159**(2): 82-87.
Parissis, J. T., S. Adamopoulos, et al. (2004). "Effects of levosimendan on circulating pro-inflammatory cytokines and soluble apoptosis mediators in patients with decompensated advanced heart failure." Am J Cardiol **93**(10): 1309-1312.
Parissis, J. T., I. Andreadou, et al. (2008). "Novel biologic mechanisms of levosimendan and its effect on the failing heart." Expert Opin Investig Drugs **17**(8): 1143-1150.
Parissis, J. T., A. Karavidas, et al. (2008). "Effects of levosimendan on flow-mediated vasodilation and soluble adhesion molecules in patients with advanced chronic heart failure." Atherosclerosis **197**(1): 278-282.
Parissis, J. T., F. Panou, et al. (2005). "Effects of levosimendan on markers of left ventricular diastolic function and neurohormonal activation in patients with advanced heart failure." Am J Cardiol **96**(3): 423-426.
Parissis, J. T., C. Papadopoulos, et al. (2007). "Effects of levosimendan on quality of life and emotional stress in advanced heart failure patients." Cardiovasc Drugs Ther **21**(4): 263-268.
Pathak, A., M. Lebrin, et al. (2013). "Pharmacology of levosimendan: inotropic, vasodilatory and cardioprotective effects." J Clin Pharm Ther **38**(5): 341-349.

Plenz, G., Z. F. Song, et al. (2001). "Activation of the cardiac interleukin-6 system in advanced heart failure." Eur J Heart Fail **3**(4): 415-421.
Ramos-Kichik, V., R. Mondragon-Flores, et al. (2009). "Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **89**(1): 29-37.
Remme, W. J. and K. Swedberg (2001). "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure." Eur Heart J **22**(17): 1527-1560.
Roig, E., F. Perez-Villa, et al. (2000). "Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure." Eur Heart J **21**(1): 53-57.
Rudolph, T. K., V. Rudolph, et al. (2010). "Liberation of vessel adherent myeloperoxidase by enoxaparin improves endothelial function." Int J Cardiol **140**(1): 42-47.
Rudolph, T. K., S. Wipper, et al. (2012). "Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans." Eur Heart J **33**(13): 1625-1634.
Rudolph, V., T. K. Rudolph, et al. (2007). "Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function." Free Radic Biol Med **43**(8): 1189-1196.
Saito, Y., K. Nakao, et al. (1989). "Brain natriuretic peptide is a novel cardiac hormone." Biochem Biophys Res Commun **158**(2): 360-368.
Sandell, E. P., M. Hayha, et al. (1995). "Pharmacokinetics of levosimendan in healthy volunteers and patients with congestive heart failure." J Cardiovasc Pharmacol **26 Suppl 1**: S57-62.
Sasayama, S., A. Matsumori, et al. (1999). "New insights into the pathophysiological role for cytokines in heart failure." Cardiovasc Res **42**(3): 557-564.
Sato, Y., Y. Takatsu, et al. (1999). "Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL)-4, and IL-6 in patients with acute left heart decompensation." Clin Cardiol **22**(12): 811-813.
Schäfer, A., D. Fraccarollo, et al. (2009). "Inhibition of platelet activation in rats with severe congestive heart failure by a novel endothelial nitric oxide synthase transcription enhancer." Eur J Heart Fail **11**(4): 336-341.
Schrier, R. W. and W. T. Abraham (1999). "Hormones and hemodynamics in heart failure." N Engl J Med **341**(8): 577-585.
Seta, Y., K. Shan, et al. (1996). "Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis." J Card Fail **2**(3): 243-249.
Shapiro, S. D., E. J. Campbell, et al. (1991). "Elastin degradation by mononuclear phagocytes." Ann N Y Acad Sci **624**: 69-80.
Skudicky, D., A. Bergemann, et al. (2001). "Beneficial effects of pentoxifylline in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and carvedilol: results of a randomized study." Circulation **103**(8): 1083-1088.
Slawsky, M. T., W. S. Colucci, et al. (2000). "Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure. Study Investigators." Circulation **102**(18): 2222-2227.
Stewart, S., K. MacIntyre, et al. (2003). "Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century?" Heart **89**(1): 49-53.
Tang, W. H., M. L. Brennan, et al. (2006). "Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure." Am J Cardiol **98**(6): 796-799.
Tavares, M., E. Rezlan, et al. (2008). "New pharmacologic therapies for acute heart failure." Crit Care Med **36**(1 Suppl): S112-120.

Teerlink, J. R., B. M. Massie, et al. (2006). "Levosimendan Reduces Length of Initial Hospital Stay: The REVIVE II Study." Journal of Cardiac Failure **12**(6, Supplement 1): S84-S84.
Tiefenbacher, C. P., M. Ebert, et al. (1997). "Inhibition of elastase improves myocardial function after repetitive ischaemia and myocardial infarction in the rat heart." Pflugers Arch **433**(5): 563-570.
Torre-Amione, G., S. Kapadia, et al. (1996). "Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)." J Am Coll Cardiol **27**(5): 1201-1206.
Tsikas, D. (2007). "Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **851**(1-2): 51-70.
Tsutamoto, T., T. Hisanaga, et al. (1998). "Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure." J Am Coll Cardiol **31**(2): 391-398.
Tzeng, H.-P., F.-M. Ho, et al. (2003). "β-Lapachone Reduces Endotoxin-induced Macrophage Activation and Lung Edema and Mortality." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **168**(1): 85-91.
Urban, C. F., U. Reichard, et al. (2006). "Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms." Cell Microbiol **8**(4): 668-676.
Vasilyev, N., T. Williams, et al. (2005). "Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction." Circulation **112**(18): 2812-2820.
Vita, J. A., M. L. Brennan, et al. (2004). "Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans." Circulation **110**(9): 1134-1139.
Yamauchi-Takihara, K., Y. Ihara, et al. (1995). "Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6." Circulation **91**(5): 1520-1524.
Yildiz, O. (2007). "Vasodilating mechanisms of levosimendan: involvement of K+ channels." J Pharmacol Sci **104**(1): 1-5.
Yilmaz, M. B., E. Grossini, et al. (2013). "Renal effects of levosimendan: a consensus report." Cardiovasc Drugs Ther **27**(6): 581-590.
Yilmaz, M. B., K. Yalta, et al. (2007). "Levosimendan improves renal function in patients with acute decompensated heart failure: comparison with dobutamine." Cardiovasc Drugs Ther **21**(6): 431-435.
Yokoshiki, H., Y. Katsube, et al. (1997). "Levosimendan, a novel Ca2+ sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K+ channel in rat arterial myocytes." Eur J Pharmacol **333**(2-3): 249-259.
Zager, R. A., A. C. Johnson, et al. (2006). "Levosimendan protects against experimental endotoxemic acute renal failure." Am J Physiol Renal Physiol **290**(6): F1453-1462.
Zemljic, G., M. Bunc, et al. (2007). "Levosimendan improves renal function in patients with advanced chronic heart failure awaiting cardiac transplantation." J Card Fail **13**(6): 417-421.
Zhang, R., M. L. Brennan, et al. (2001). "Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease." JAMA **286**(17): 2136-2142.

Zorlu, A., H. Yucel, et al. (2012). "Effect of levosimendan in patients with severe systolic heart failure and worsening renal function." Arq Bras Cardiol **98**(6): 537-543.
Zugck, C., A. Muller, et al. (2010). "[Health economic impact of heart failure: An analysis of the nationwide German database]." Dtsch Med Wochenschr **135**(13): 633-638.

14 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Stephan Baldus danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am universitären Herzzentrum des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf schreiben zu können, für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung während dieses Projektes ganz herzlich. Mein allergrößter Dank gilt Dr. Matti Adam, der mir stets mit fachlicher und tatkräftiger Unterstützung zur Seite stand. Über die Grenzen der Kontinente hinaus wurde einige Zeit sogar zwischen Stanford (USA) und Shanghai (China) korrespondiert und diese Arbeit vorangetrieben. Trotz Entfernung konnte ich immer auf seine Hilfe setzen und fühlte mich jederzeit bestens betreut.

Dr. Sven Meyer möchte ich für sein Engagement, seine Anregungen, Ideen und die konstruktive Kritik danken. Durch ihn bekam ich die Möglichkeit diese Arbeit am UHZ zu schreiben. Dem Laborteam gilt mein besonderer Dank. Dr. Anna Klinke, Dr. Denise Lau, Lisa Remane und Hartwig Wiebold möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft, die Unterstützung bei den Laborarbeiten, die Hilfe bei der Suche nach Lösungsansätzen und den vielen Ideen danken. Dr. Ulf Radunski möchte ich für seine Unterstützung vor Ort im UKE danken.

Ein größtmöglicher herzlicher Dank gilt meinen Eltern Peter und Ulrike Knors die mich immer uneingeschränkt unterstützt haben und mir die nötige Zeit zur Fertigstellung dieser Arbeit gaben. Meinen Brüdern Hanno und Arno danke ich für die motivierenden und wohlgesetzten Worte in dieser Zeit.

Meiner Freundin Julia Grobecker gilt großer Dank für die andauernde Motivation und Unterstützung sowie das ausdauernde Korrekturlesen.

Dr. Kerstin Vogel aus der Kardiologie des MVZ Sylt möchte ich für das Korrekturlesen, die fachlichen Anmerkungen und Diskussionen und vor allem für die Bereitstellung des Arbeits-/ und Schreibzimmers auf Sylt danken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Beate Brand- Saberi danke ich für die Unterstützung und ständige Motivation während der Zeit in Freiburg.

Meinen Großeltern gilt mein tiefer Dank. Sie waren mir stets ein Vorbild. Ihre gelebten Werte bewundere ich bis heute und versuche sie weiterzuleben.

15 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

16 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....