

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Universitäres Herzzentrum Hamburg
Direktor: Prof. Dr. S. Blankenberg

**Myeloperoxidase Plasmaspiegel bei chronischer Herzinsuffizienz und deren
Bedeutung für die Gefäßfunktion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Hendrik Runte

aus Iserlohn

Hamburg 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 17.10.2013
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Baldus
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. E. Tolosa
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Diese Arbeit widme ich meinem Vater Thomas Runte.

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung	6
2 Einleitung	7
2.1 Chronische Herzinsuffizienz	7
2.1.1 <i>Epidemiologie und Prognose</i>	7
2.1.2 <i>Ätiologie</i>	8
2.1.3 <i>Pathophysiologie</i>	9
2.2 Dilatative Kardiomyopathie.....	11
2.3 Chronische Herzinsuffizienz als Multisystemerkrankung	12
2.3.1 <i>Inflammation</i>	12
2.3.2 <i>Oxidativer Stress</i>	13
2.3.3 <i>Alteration der Gefäßfunktion</i>	14
2.3.4 <i>Bedeutung der Skelettmuskulatur</i>	14
2.4 Einfluss von körperlichem Training auf Herzinsuffizienz	15
2.5 Stickstoffmonoxid als Mediator der Endothelfunktion.....	16
2.6 Myeloperoxidase.....	20
2.6.1 <i>Bedeutung</i>	20
2.6.2 <i>Katalytische Mechanismen und in vivo Substrate von MPO</i>	22
2.6.3 <i>Myeloperoxidase und Herzinsuffizienz</i>	23
3 Material und Methoden	24
3.1 Patientenkollektive.....	24
3.1.1 <i>Herzinsuffizienzgruppe</i>	24
3.1.2 <i>Kontrollgruppe</i>	25
3.2 Studienprotokoll	25
3.3 Endothelfunktionsmessung.....	26
3.3.1 <i>Bestimmung der flussabhängigen Vasodilatation</i>	26
3.3.2 <i>Patientenvorbereitung</i>	26
3.3.3 <i>Messung der FMD</i>	26
3.3.4 <i>Messung der flussunabhängigen Vasodilatation</i>	29
3.3.5 <i>Auswertung der Filmsequenzen</i>	29
3.4 Studien an Blutproben	29
3.4.1 <i>Probengewinnung</i>	29
3.4.1 <i>Plasmabestimmungen</i>	30

3.4.2	<i>Isolierung von Neutrophilen Granulozyten</i>	31
3.5	Studien an Muskelbiopsien des Musculus Vastus laterales.....	32
3.5.1	<i>Gewinnung der Muskelbiopsien</i>	32
3.5.2	<i>Quantitative Myeloperoxidase Bestimmung</i>	32
3.5.3	<i>Fluoreszenzimmunhistochemie</i>	37
3.6	Körperliches Training und Untersuchung der Leistungsfähigkeit	38
3.6.1	<i>Spiroergometrie</i>	38
3.6.2	<i>Körperliches Training auf Fahrradergometern</i>	39
3.7	Statistische Auswertung	39
3.8	Materialien.....	40
4	Ergebnisse	43
4.1	Klinische Charakteristika Studiengruppe	43
4.2	Studien an Blutproben	44
4.2.1	<i>Vergleich Herzinsuffiziente mit Kontrollgruppe</i>	44
4.2.2	<i>Vergleich Interventionsgruppe prä und post Herzkreislauf-Training</i>	51
4.3	Studien an Muskelproben	59
4.3.1	<i>Western Blot</i>	59
4.3.2	<i>Immunhistochemie</i>	61
5	Diskussion	62
5.1	Limitationen	66
5.2	Ausblick	67
6	Zusammenfassung	68
7	Literaturverzeichnis	69
8	Abkürzungsverzeichnis	76
9	Danksagung	78
10	Lebenslauf	79
11	Eidesstattliche Versicherung:	80

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Neben der Koronaren Herzkrankheit (KHK) ist auch die Herzinsuffizienz charakterisiert durch Entzündungsprozesse, wobei der Aktivierung von Leukozyten eine möglicherweise bisher unterschätzte Bedeutung zukommt. Leukozyten, insbesondere Neutrophile Granulozyten (PMN), setzen vasoaktive Proteine frei, wobei Myeloperoxidase (MPO) hier eine Schlüsselrolle zukommt. MPO degradiert NO und verschlechtert damit die Endothelfunktion. In dieser Arbeit soll die Bedeutung dieses Mechanismus für die peripher vaskuläre Widerstandserhöhung, einem zentralen hämodynamischen Charakteristikum der Herzinsuffizienz, untersucht werden.

Ziel dieser Studie ist es herauszufinden, ob Herzinsuffiziente höhere Myeloperoxidase Spiegel aufweisen und ob diese durch körperliches Training zu senken sind.

Dabei sollen im Einzelnen folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Herzinsuffiziente weisen höhere Myeloperoxidase Plasmaspiegel auf als Gesunde.
2. Bei herzinsuffizienten Patienten ist die Endothelfunktion im Vergleich zu Gesunden eingeschränkt.
3. Unter körperlichem Training sinken die Myeloperoxidase Plasmaspiegel bei Herzinsuffizienten.
4. Die durch körperliches Training hervorgerufenen Verbesserung der Endothelfunktion korreliert mit der Abnahme der Myeloperoxidase Spiegel.

2 Einleitung

2.1 Chronische Herzinsuffizienz

Die WHO definiert Herzinsuffizienz als verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung. Es handelt sich um ein klinisches Syndrom dem verschiedene Ursachen zugrunde liegen können.

Aufgrund der hohen Prävalenz, der schlechten Prognose *quaod vitam* und der mit ihr verbundenen Morbidität ist die chronische Herzinsuffizienz eine enorme medizinische und gesellschaftliche Herausforderung. Sie kann für betroffene Patienten eine ernste Behinderung darstellen und die Lebensqualität entscheidend verringern.

2.1.1 Epidemiologie und Prognose

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Erkrankungen der westlichen Industrieländer. Pro Jahr erkranken 1-5 auf 1000 Menschen^{1 2}.

In den USA sind 2% der Bevölkerung, oder 5 Millionen Menschen betroffen, wobei die Prävalenz der 40 bis 59 Jährigen bei 2%, die der 60 bis 69 Jährigen bei 5% und die der über 70 Jährigen bei 10% liegt³. Gerade in den westlichen Ländern mit einer Überalterung der Bevölkerung wird die Herzinsuffizienz in der Zukunft eine noch größere Rolle spielen.

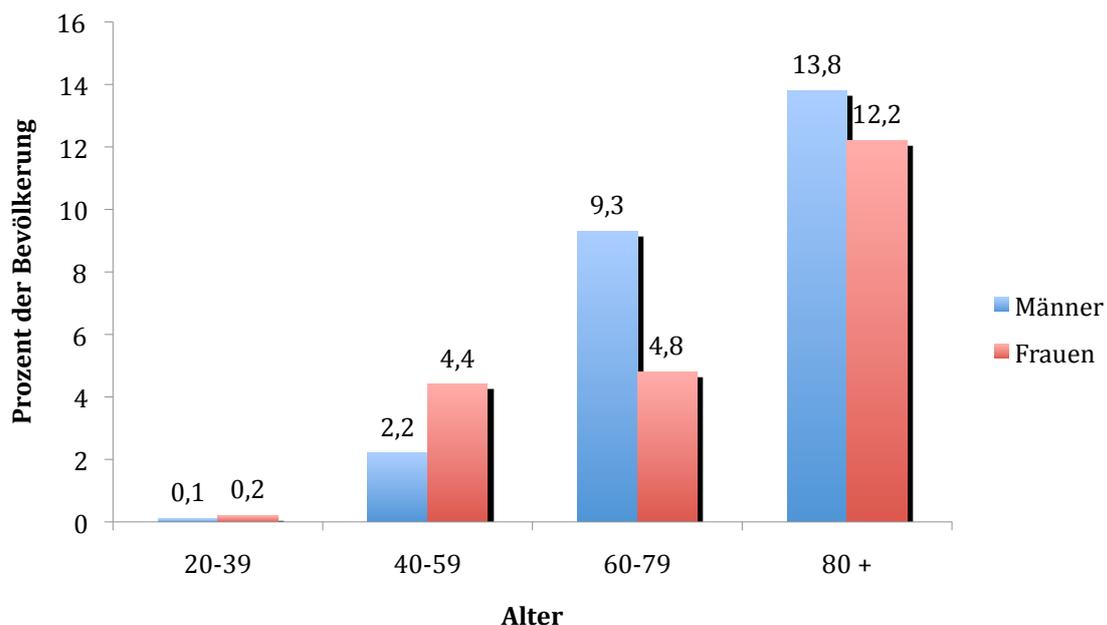


Abb. 2-1: Prävalenz der Herzinsuffizienz nach Alter und Geschlecht, *Heart Disease and Stroke Statistics — 2009 Update*, American Heart Association

Auch nach Einführung der Therapie mit Betablockern und ACE-Hemmern ist die Prognose der Herzinsuffizienz schlecht und mit der maligner Erkrankungen vergleichbar⁴.

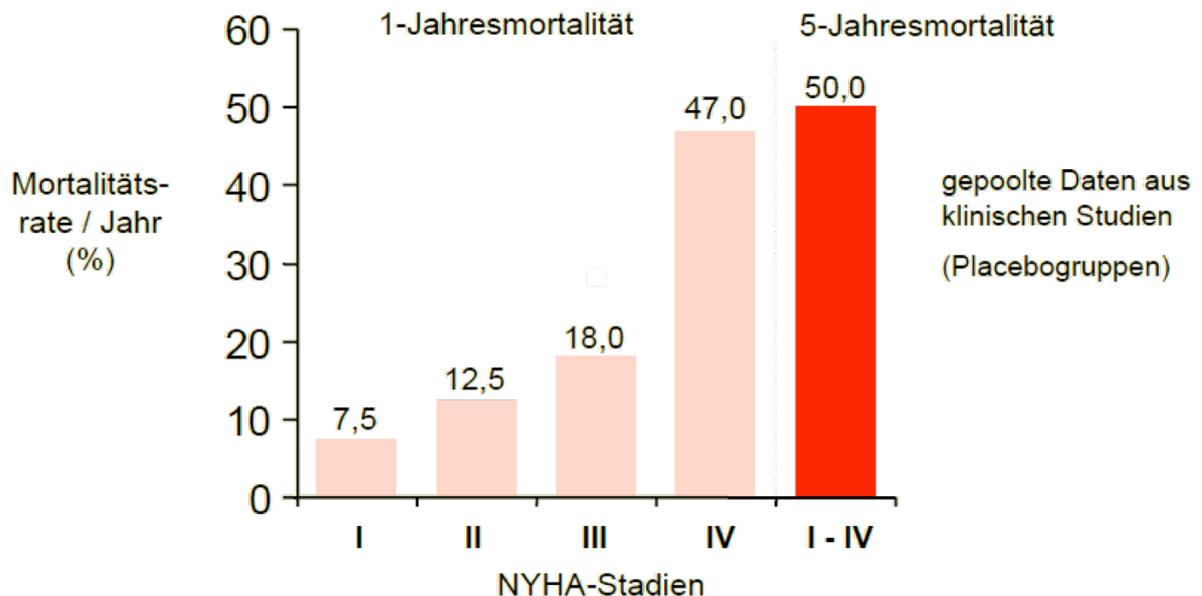


Abb. 2-2: Mortalität in Abhängigkeit vom Schweregrad, Massie BM, Am Heart J 1997; 133: 703 – 712; Boyko WL, Am Heart J 1999; 137: 115 – 119

2.1.2 Ätiologie

Mit 50-60% liegt der chronischen Herzinsuffizienz am häufigsten die koronare Herzkrankheit zugrunde. Die zweite bedeutende Ursache ist in der hypertensiven Herzkrankheit (9-20%) zu sehen, wobei die Koinzidenz von arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit von ca. 40 % beachtet werden muss. Seltener Ursachen sind Herzvitien, Myokarditiden, Endokarditiden und toxische Kardiomyopathien^{2 5}.

2.1.3 Pathophysiologie

Nachdem die Herzinsuffizienz lange als ein rein myokardiales Problem verstanden wurde, wissen wir heute, dass es sich um eine komplexe Multisystemerkrankung handelt, die das neurokrine, muskuloskeletale, renale und immunologische System einbezieht (s.u.). Der Körper verfügt über verschiedene Mechanismen, mit denen eine Verschlechterung der Pumpfunktion kompensiert werden soll. Jedoch führen diese Prozesse allenfalls initial zu einer Verbesserung, über längere Zeit entsteht aber ein Circulus vitiosus mit weiterem Fortschreiten der Herzinsuffizienz:

Das relativ verminderte Herzzeitvolumen führt zu verminderter Organperfusion und konsekutiv zu Aktivierung des sympathoadrenergen- und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).

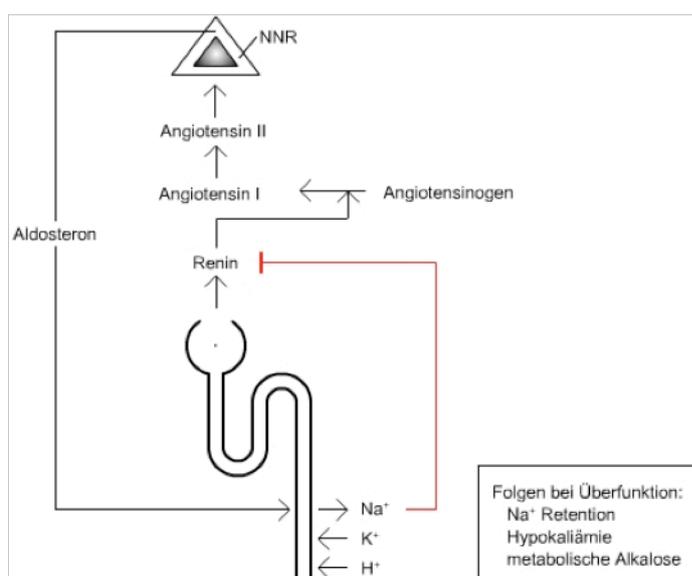


Abb. 2-3: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Bei der Herzinsuffizienz kommt es zur vermehrten Ausscheidung von Renin aus der Niere. Renin setzt aus dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen Angiotensin I frei, anschließend wird dieses durch das Angiotensin-converting-enzyme (ACE) in Angiotensin II umgebaut. Angiotensin II wirkt vasokonstringierend und stimuliert die Produktion von Aldosteron in der Nebennierenrinde. Aldosteron aktiviert in den Sammelrohren der Niere durch intrazellulär gelegene Rezeptoren die basal gelegene Natrium-Kalium-ATPase.

Angiotensin II ist eines der Endprodukte des RAAS mit mehreren Wirkungen. Direkt wirkt es über den Angiotensin II (AT II)-Rezeptor und führt zu Vasokonstriktion. Außerdem stimuliert AT II die Exkretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde,

welches seinerseits eine vermehrte Wasserrückresorption nach sich zieht. Im Gehirn kommt es zu gesteigertem Durstgefühl und Appetit auf salzige Speisen. Darüber hinaus wird der Nervus Vagus durch Aldosteron gehemmt und der Sympathikus stimuliert.

Somit resultiert aus dem aktivierten RAAS insgesamt eine Nachlastserhöhung, zum Einen durch die periphere Widerstandserhöhung bei vermehrter Vasokonstriktion und zum Anderen durch das erhöhte Plasmavolumen als Folge der gesteigerten Natrium- und Flüssigkeitsretention. Dies induziert die Entwicklung struktureller Umbauprozesse im Myokard mit vermehrtem Einbau von Kollagen und Fibroblasten. Die Folge ist ein zunehmender myokardialer Elastizitätsverlust, somit eine Relaxationsstörung des Herzens die in Restriktion und Progredienz der diastolischen Herzinsuffizienz endet⁶.

Die chronische Aktivierung des sympathoadrenergen Systems unterhält ebenfalls den Progress der Erkrankung⁷.

Patienten mit Herzinsuffizienz haben im Vergleich zur Normalbevölkerung einen 2- bis 3-fach erhöhten Noradrenalinspiegel, begleitend mit Erhöhung anderer Katecholamine wie Dopamin und Adrenalin⁸. Die chronische adrenerge Überstimulation hat mehrere negative Folgen: Die Erhöhung der Herzfrequenz führt zu einem erhöhtem Energieverbrauch bei gleichzeitiger Verkürzung der Diastolendauer und damit relativer Verringerung des koronaren Blutflusses. Die Arrhythmie neigung steigt. Auf zellulärer Ebene kommt es zur „Down“-Regulation der Beta-1-Rezeptoren am Herzen, sowie Kontraktilitätsminderung (negative Frequenz-Kraft-Beziehung). Das maximal stimulierte Herz kann dauerhaft der Beanspruchung nicht standhalten, was zu Umbauprozessen führt, die letzten Endes in die Herzinsuffizienz münden. Die wichtige Rolle des sympathischen Nervensystems zeigt sich dabei auch an der Bedeutung der selektiven Betablockade als ein Hauptpfeiler der medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz.

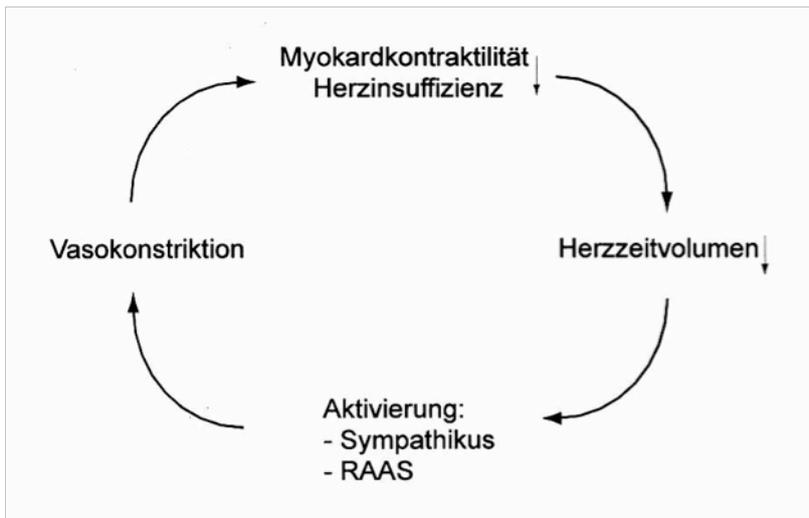


Abb. 2-4: Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz mit Aktivierung des sympathoadrenergen- und RAA-Systems.

In Folge der abnehmenden Herzleistung werden das sympathoadrenerge- und RAA-System aktiviert um eine ausreichende Organperfusion zu erhalten. Die Folge davon ist eine erhöhtes Plasmavolumen durch vermehrte Wasserrückresorption und eine Erhöhung der Nachlast durch die periphere Vasokonstriktion. Myokardiale Hypertrophie und Fibrose sind die Folge.

2.2 Dilatative Kardiomyopathie

Kardiomyopathien sind Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen. Bei der dilatativen Kardiomyopathie ist das Herz vergrößert und die systolische ventrikuläre Ejektionsfraktion vermindert. Zusätzlich kann die diastolische Funktion gestört sein, welches sich in verminderter diastolischer Relaxation und erhöhter Steifigkeit des Myokards manifestiert.

Die Ursachen sind vielfältig. Neben genetischen Faktoren kommen Virusinfektionen und toxische Ursachen wie Chemotherapie oder Alkoholabusus in Frage. Häufig lässt sich kein offensichtlicher Grund für die Erkrankung feststellen.

2.3 Chronische Herzinsuffizienz als Multisystemerkrankung

2.3.1 Inflammation

Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien, die einen Zusammenhang von Herzinsuffizienz und chronischer Inflammation, respektive einem Anstieg verschiedener Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF alpha) und Interleukin 6 belegen. Sowohl bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, als auch mit ischämischer Kardiomyopathie kann eine erhöhte Mastzellichte nachgewiesen werden, welche die vermehrte Bildung, bzw. erhöhte Aktivität inflammatorischer Mediatoren zur Folge hat⁹.

Nicht nur wurde beschrieben, dass Zytokine wie Interleukin 6 und TNF alpha bei Herzinsuffizienz erhöht sind, sondern konnte auch gezeigt werden, dass sie mit dem Schweregrad und der Prognose der Patienten mit Herzinsuffizienz korrelieren, also insofern auch von klinischer Relevanz sind^{10 11}.

Die Bedeutung und die genauen Ursprungsorte der Synthese der proinflammatorischen Mediatoren im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz sind noch nicht eindeutig geklärt.

Bei Druckbelastung des Ventrikels kann TNF alpha von kardialen Myozyten produziert werden¹⁰. Daher könnte angenommen werden, dass der Ort der vermehrten Zytokinproduktion bei Herzinsuffizienz überwiegend der Herzmuskel ist. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied der Zytokinkonzentration bei einer vergleichenden Untersuchung von Koronarsinusblut und arteriellem Blut nachgewiesen werden¹². Im Blut zirkulierende Leukozyten stellen wahrscheinlich einen zweiten bedeutsamen Produktionsort für Zytokine dar.

Vermutlich gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen RAAS Aktivierung und Inflammation bei Herzinsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass Angiotensin die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine auslöst und diese bei ACE-Hemmertherapie signifikant reduziert wird¹³.

In Anbetracht der überzeugenden Daten aus den Tierversuchen^{14 15 16} wurden bereits Studien mit immunmodulatorischer Therapie bei Herzinsuffizienz unternommen - u. a. eine große Multicenterstudie mit dem Tumornekrosefaktor-

Alpha-Antagonisten Etanercept¹⁷. Diese zeigten jedoch keine Einflüsse auf die klinischen Endpunkte, Tod oder Hospitalisierung durch kardiale Dekompensation. In der Attach-Studie kam sogar zur Übersterblichkeit unter einer immunmodulatorischen Therapie¹⁸.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Herzinsuffizienz mit großer Sicherheit mit inflammatorischen Prozessen einhergeht. Allerdings sind die Zusammenhänge noch nicht ausreichend verstanden, um dieses komplexe Geschehen gezielt therapeutisch bzw. ursächlich beeinflussen zu können.

2.3.2 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress - ein insgesamt unscharfer Terminus – subsumiert die überschießende Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS –reactive oxygen species) und scheint eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des kardialen Remodelings und der Herzinsuffizienz zu spielen¹⁹.

Durch oxidativen Stress werden intrazelluläre Signalketten gestört, die zu zellulärer Dysfunktion und Zerstörung führen. Diese Radikale entstehen aus verschiedenen Quellen, u.a. NAD(P)H Oxidase, Xanthinoxidase, und NO Synthasen^{20 21 22}. Die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien scheint dabei aber besonders wichtig zu sein²³, denn wenn dort das Gleichgewicht von Reaktiven Sauerstoffspezies und Antioxidantien aufgehoben ist, entsteht ein Teufelskreis, bei dem über die Beschädigung mitochondrialer DNA eine Funktionseinschränkung und somit eine weitere Radikalbildung resultiert. Am Ende dieses Prozesses steht immer die Zellschädigung. ROS induzieren Hypertrophie der Myozyten, Apoptose und interstitielle Fibrose durch Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen^{24 25} und tragen dadurch einen wesentlichen Teil zu ungünstigen Umbauprozessen des Myokards und somit dem Herzversagen bei.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress auch zu Dysfunktion von Skelettmuskulatur führt²⁶ und insofern auch mit Belastungsintoleranz bei Herzinsuffizienz assoziiert ist²⁷.

2.3.3 Alteration der Gefäßfunktion

Vereinfacht kann die endotheliale Dysfunktion durch eine verminderte vasodilatatorische Kapazität in Folge einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) verstanden werden²⁸. Der Gefäßtonus wird entscheidend durch die Bildung von NO reguliert²⁹. Die durch endotheliales Stickstoffmonoxid (NO) vermittelte Vasodilatation, die durch hormonelle Reize oder durch Scherstress ausgelöst wird, ist bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Individuen erniedrigt^{30 31}. Dies ist durch eine verminderte Synthese von NO aus Arginin und vermehrten Abbau des NO durch Reaktive Sauerstoffspezies bedingt^{32 33}. Diese verminderte Fähigkeit der Vasodilatation ist mit geringerer Hyperämie bei Belastung und einer Störung der funktionellen klinischen Belastbarkeit der Patienten assoziiert^{34 35}. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Störung der Endothelfunktion, gemessen durch eine erniedrigte flussabhängige Dilatation der A. brachialis (FMD) bei Herzinsuffizienten mit einer erhöhten Mortalität einhergeht³⁶.

2.3.4 Bedeutung der Skelettmuskulatur

Bei chronischer Herzschwäche mit systolischer kardialer Dysfunktion entspricht der Grad der Belastungseinschränkung nicht direkt dem der kardialen Einschränkung^{37 38}. Viele der Symptome wie Dyspnoe und Müdigkeit, die die Herzinsuffizienz charakterisieren, stehen nicht selten direkt mit Veränderungen der Skelettmuskulatur in Beziehung.

Das Verständnis der Rolle der Skelettmuskulatur ist von großer Bedeutung, da die Therapie der Herzinsuffizienz primär auf die kardiale Funktion abzielt, aber die körperliche Belastbarkeit der Patienten oft nur unzureichend verbessert.

Verschiedene Studien konnten einige Eigenschaften der Skelettmuskulatur zeigen, die sich bei Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant von denen bei gesunden Individuen unterscheiden.

So ist der Muskeldurchmesser der unteren Extremität bei Herzinsuffizienten deutlich geringer als bei Gesunden und korreliert wiederum mit der maximalen Sauerstoffaufnahme ($VO_2\max$)^{39 40}. Morphologische Untersuchungen zeigten eine Verschiebung der Muskelfasertypen von langsamen oxidativen Typ I Fasern zu

schnellen IIB Fasern⁴¹. Duscha et al konnten zeigen, dass zudem die Dichte der Kapillaren im Muskelgewebe signifikant erniedrigt war⁴².

Verschiedene chronische Erkrankungen, wie Herzinsuffizienz, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und Niereninsuffizienz haben gemeinsam, dass der Organismus unter Stress steht; dies manifestiert sich durch eine chronisch erhöhte Erregung von sympathischen Nervenfasern und erhöhten Katecholaminspiegeln im Blut. Diese sympathische Aktivierung trägt hauptsächlich zur peripheren Vasokonstriktion und damit der verringerten Durchblutung der Extremitäten bei Herzinsuffizienz bei. Besonders unter Belastung führt die inadäquate Blutversorgung zu unzureichender Perfusion und Ischämie, die wiederum von vermehrter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gefolgt wird und somit Muskelinflammation triggert²⁶. In verschiedenen Experimenten korrelierten erhöhte TNF alpha - Spiegel bei Herzinsuffizienz mit einer erhöhten Rate an Apoptose in der Skelettmuskulatur⁴³. Interleukin 6 ist umgekehrt proportional zu der Muskelfaserdichte bei Herzinsuffizienz⁴⁴. Zudem wurden erhöhte Level an Interleukin 1 β und induzierbare NO-Synthase (iNOS) in Muskelbiopsien von Patienten mit Herzinsuffizienz gemessen⁴⁵.

2.4 Einfluss von körperlichem Training auf Herzinsuffizienz

Neben der medikamentösen Therapie nimmt heute die Bedeutung von körperlicher Aktivität für die Behandlung der Herzinsuffizienz einen immer größeren Stellenwert ein. Körperliche Belastung galt für chronisch Herzinsuffiziente lange als strikt kontraindiziert. Patienten wurde die Vermeidung physischer Belastungen oder sogar Bettruhe empfohlen. Durch Immobilität verstärkten sich unerwünschte Effekte wie Skelettmuskelatrophie und Belastungsintoleranz jedoch.

Seit den 80er Jahren wurden Studien an Herzinsuffizienten durchgeführt, die beabsichtigten, die periphere Adaptation des Organismus und den Einfluss von körperlicher Aktivität auf Herzinsuffizienz zu untersuchen. Heute ist es unumstritten, dass die Belastungsintoleranz bei Herzinsuffizienten ein multifaktorielles Geschehen ist und die reduzierte körperliche Belastbarkeit eher auf periphere Veränderungen als nur auf die linksventrikuläre Funktion zurückzuführen ist⁴⁶. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die neurohormonale Interaktion zwischen Peripherie und Herzen ein

wichtiger Determinant für Symptome und Prognose dieser Patienten ist^{47 48}. Neben einer Verbesserung von Symptomen wie Dyspnoe, Müdigkeit, Muskelschwäche, die zuletzt auch eine Verbesserung des NYHA - Stadiums zur Folge hatten, stellten Studien fest, dass auch objektive Parameter wie der maximale Sauerstoffverbrauch (VO_2max), Lungenfunktion, und die autonome Regulation des Kreislaufes durch Training verbessert werden konnten⁴⁹. Letzteres zeigte sich unter anderem durch einen reduzierten Sympathikotonus und erhöhte Aktivität des Vagus⁵⁰. Zudem ist eine Verbesserung der endothelialen Funktion und der biochemischen und histologischen Struktur der Skelettmuskulatur durch zahlreiche Veröffentlichungen dokumentiert^{51 52 53 54 55 56}. Dies führte auch dazu, dass körperliches Training Einzug in die Leitlinien der Therapie der Herzinsuffizienz gefunden hat⁵⁷.

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass körperliches Training bei Herzinsuffizienz prognoseverbessernd ist; allerdings konnte dieser Zusammenhang noch nicht komplett belegt werden.

2.5 Stickstoffmonoxid als Mediator der Endothelfunktion

Über die Guanylcyclase führt Stickstoffmonoxid intrazellulär zu einem Anstieg von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP). Das cGMP wirkt dann als zweiter Botenstoff und aktiviert Proteinkinasen vom G-Typ, dies führt zu einer Verminderung der Calciumkonzentration und somit zu einer Relaxation glatter Muskelzellen.

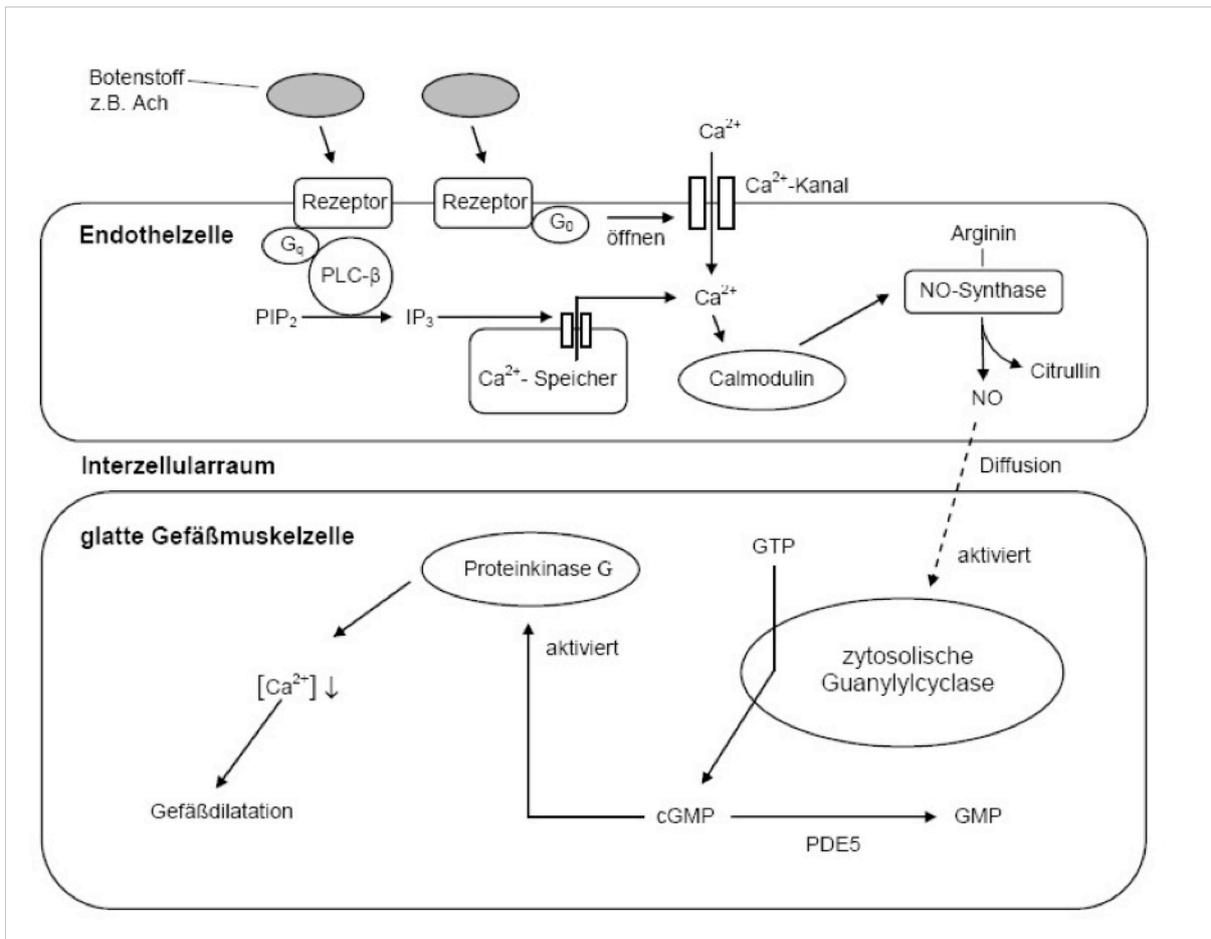


Abb. 2-5: Stickstoffmonoxid vermittelte Vasodilatation

Stickstoffmonoxid wird, katalysiert durch die endotheliale NO-Synthase bei der Umwandlung von L-Arginin zu Citrullin gebildet. Dieses Enzym kann aber nur in Anwesenheit von Calcium, welches sich mit Calmodulin verbindet, aktiviert werden. Nach Freisetzung diffundiert NO in die Gefäßmuskelzelle und stimuliert dort eine lösliche Guanylatcyclase, mit der Folge eines intrazellulären cGMP-Anstiegs, der wiederum eine Aktivierung der cGMP abhängigen Proteinkinase induziert, damit eine verminderte Ca-Empfindlichkeit bewirkt und so zur Relaxation der Gefäßmuskelzelle bzw. Dilatation des Gefäßes führt.

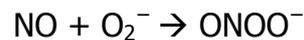
Das Ausmaß der Vasodilatation ist durch eine Endothelfunktionsmessung (Flow mediated Dilation, FMD) bestimmbar.

Stickstoffmonoxid wird mit Hilfe der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet⁵⁸. Die Freisetzung von NO führt, wie oben beschrieben, über Relaxation zu Vasodilatation und kann durch Scherkräfte oder verschiedene Pharmaka verursacht werden.

Eine NO-Freisetzung ins Blut führt zu einer Inhibition der Thrombozytenaggregation und Monozytenadhäsion⁵⁹ und hat somit auch ausgeprägte antiinflammatorische und antiaggregatorische Effekte.

Die antiinflammatorischen Effekte werden durch Hemmung der Expression von Oberflächen-Adhäsions-Molekülen wie CD 11/18, P-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 vermittelt. Die Adhäsion von Monozyten an das Endothel und die darauf folgende Migration durch die Gefäßwand wird hierdurch gemindert^{60 61}.

Endotheliale Dysfunktion ist ein Befund bei vielen chronischen Krankheiten. Auch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, Hypertonus und Hypercholesterinämie gehen mit einer Verschlechterung der Gefäßfunktion einher^{28 62 63}. Dort kommt es zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, vor allem Superoxid (O_2^-), welches seinerseits NO oxidiert. Die daraus folgende NO-Konsumption führt nicht nur zu verminderter NO-Bioverfügbarkeit, sondern zur Generierung toxischer Oxidantien wie Peroxinitrit ($ONOO^-$).



Das Ergebnis ist eine Potenzierung des oxidativen Stresses und eine Reduktion der Endothelfunktion.

Die endotheliale Dysfunktion konnte als eigenständiger Risikomarker für erneute kardiale Ereignisse bei Patienten mit manifester KHK oder chronischer Herzinsuffizienz identifiziert werden^{64 65}.

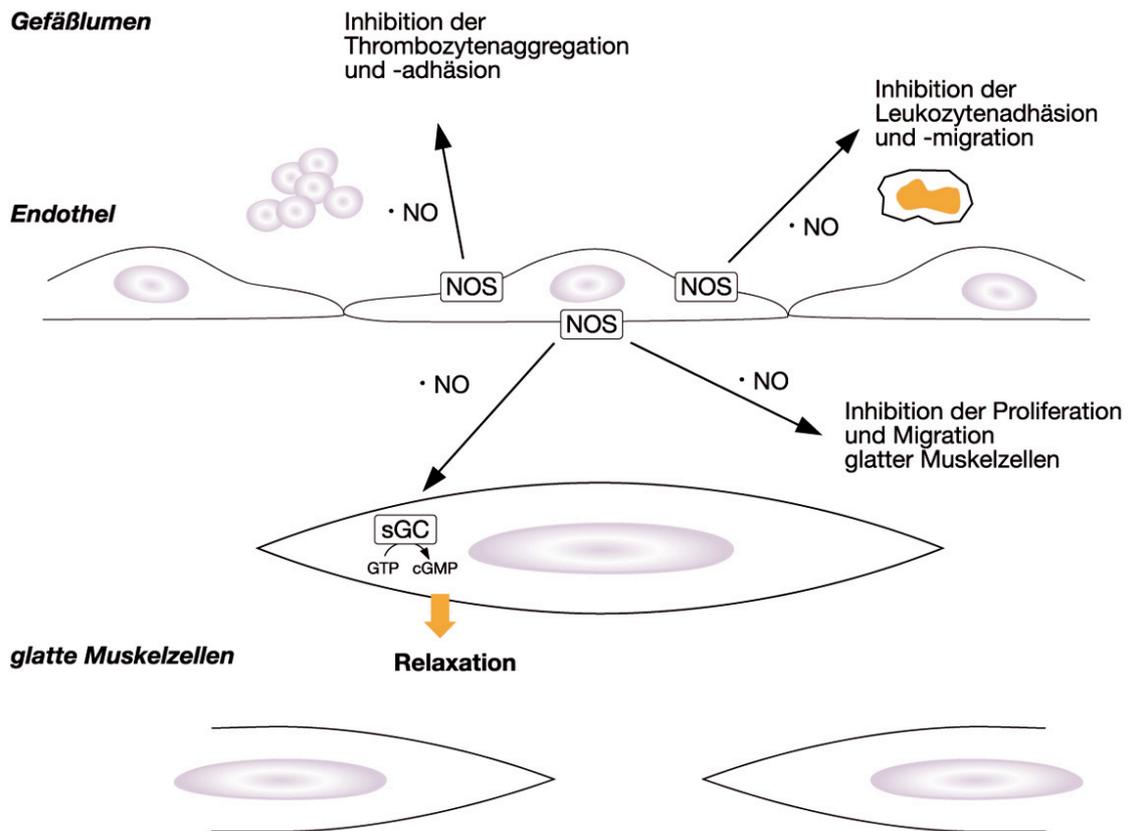


Abb. 2-6: Bedeutung der physiologischen Freisetzung von NO \cdot aus dem Endothel. Nach Diffusion aus dem Endothel ins Gefäßlumen, hemmt NO die Leukozytenadhäsion und -migration sowie die Thrombozytenaggregation und -adhäsion ans Endothel. In der Gefäßmuskulatur wirkt es über die Guanulatzyklase (sGC) relaxierend und ist an der Modulation der Gefäßstruktur beteiligt, wobei es insbesondere die Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen inhibiert.

2.6 Myeloperoxidase

2.6.1 Bedeutung

Ursprünglich nahm man an, dass Myeloperoxidase (MPO) ausschließlich der innate Immunabwehr dient, da es mit Hilfe des Cosubstrates H_2O_2 bakterizide Spezies wie HOCl generiert.

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass MPO allerdings zudem wichtige Funktionen in der Pathogenese der chronisch vaskulären Inflammation zugeschrieben werden können. Es wurde in Studien ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt und Tod bei hohen MPO Serumspiegeln gezeigt^{66 67}.

Vermehrte Granulozytenaktivierung führt zu verstärkter lokaler Ausschüttung von MPO, welches zunächst an die Oberfläche des Endothels bindet. Anschließend folgt eine endotheliale Transzytose und Akkumulation im subendotheliale Raum^{67 68}. An dieser strategisch günstigen Position kann MPO endothelial generiertes Stickstoffmonoxid auf dem Weg zu dessen Wirkort, der Tunica media, oxidieren und somit abfangen.

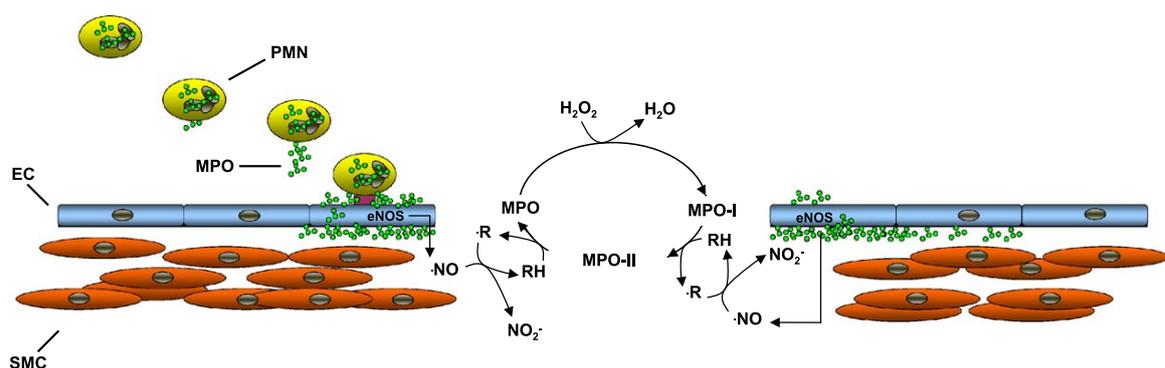


Abb. 2-7: Oxidation von Stickstoffmonoxid durch Myeloperoxidase

Das Ergebnis ist eine verminderte Bioverfügbarkeit des endothelial generierten Stickstoffmonoxid (NO)⁶⁹ und damit eine Verschlechterung der endothelialen Funktion.

Quantitativ ist MPO eines der bedeutendsten Enzyme, das von neutrophilen Granulozyten sowie von Makrophagen und Monozyten gebildet wird. Gespeichert in azurophilen Granula macht es über 4 % des Gesamtproteingehaltes der Granulozyten aus⁷⁰. In den azurophilen Granula wird auch Elastase, ein anderes proteolytisches Enzym, gespeichert, welches bei Degranulation aktivierter Granulozyten gemeinsam mit MPO in den extrazellulären Raum ausgeschüttet wird^{71 72}.

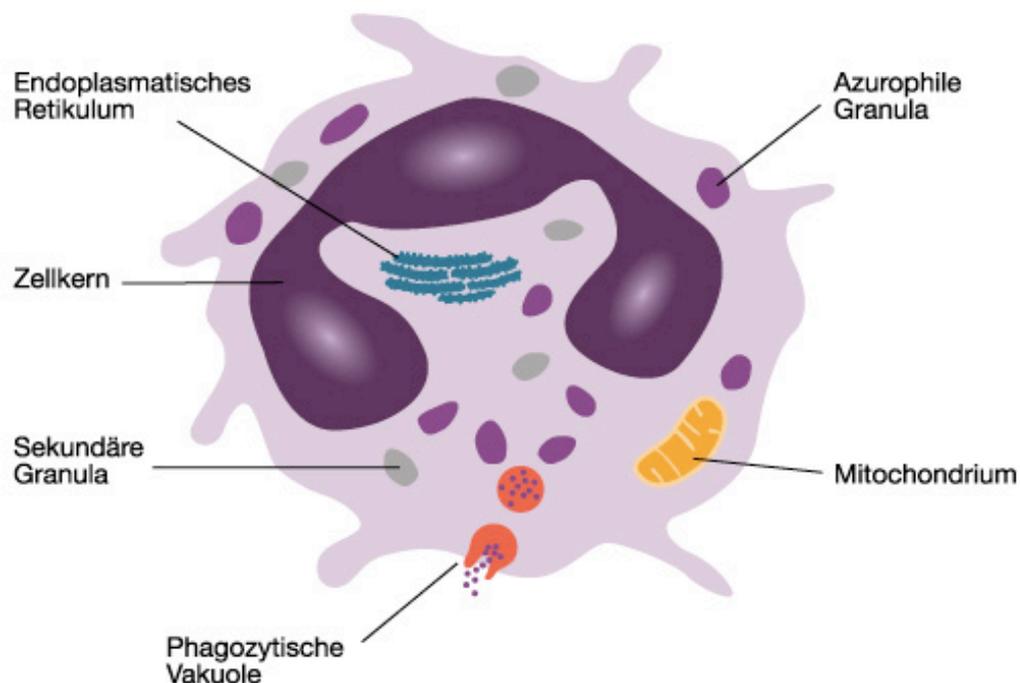


Abb. 2-8: Bei der Degranulation neutrophiler Granulozyten werden die in der azurophilen Granula gespeicherten MPO und Elastase aus phagozytischen Vakuolen in den extrazellulären Raum ausgeschüttet.

Die Primärstruktur des Enzyms ist ein 140 kDa Homodimer, welches eine Hämgruppe enthält. Die einzelnen Dimere bestehen aus einer schweren (55 – 64 kDa) und einer leichten (10 – 15 kDa) Untereinheit^{73 74}. Die Sekundärstruktur von MPO ist hauptsächlich α -helikal, wobei jedes Monomer einen Kern aus fünf Aminosäureschleifen und einer Hämgruppe (Fe_3^+) besitzt. Dabei bestehen vier der Schleifen aus dem großen und die fünfte aus dem kleinen Polypeptid⁷⁵.

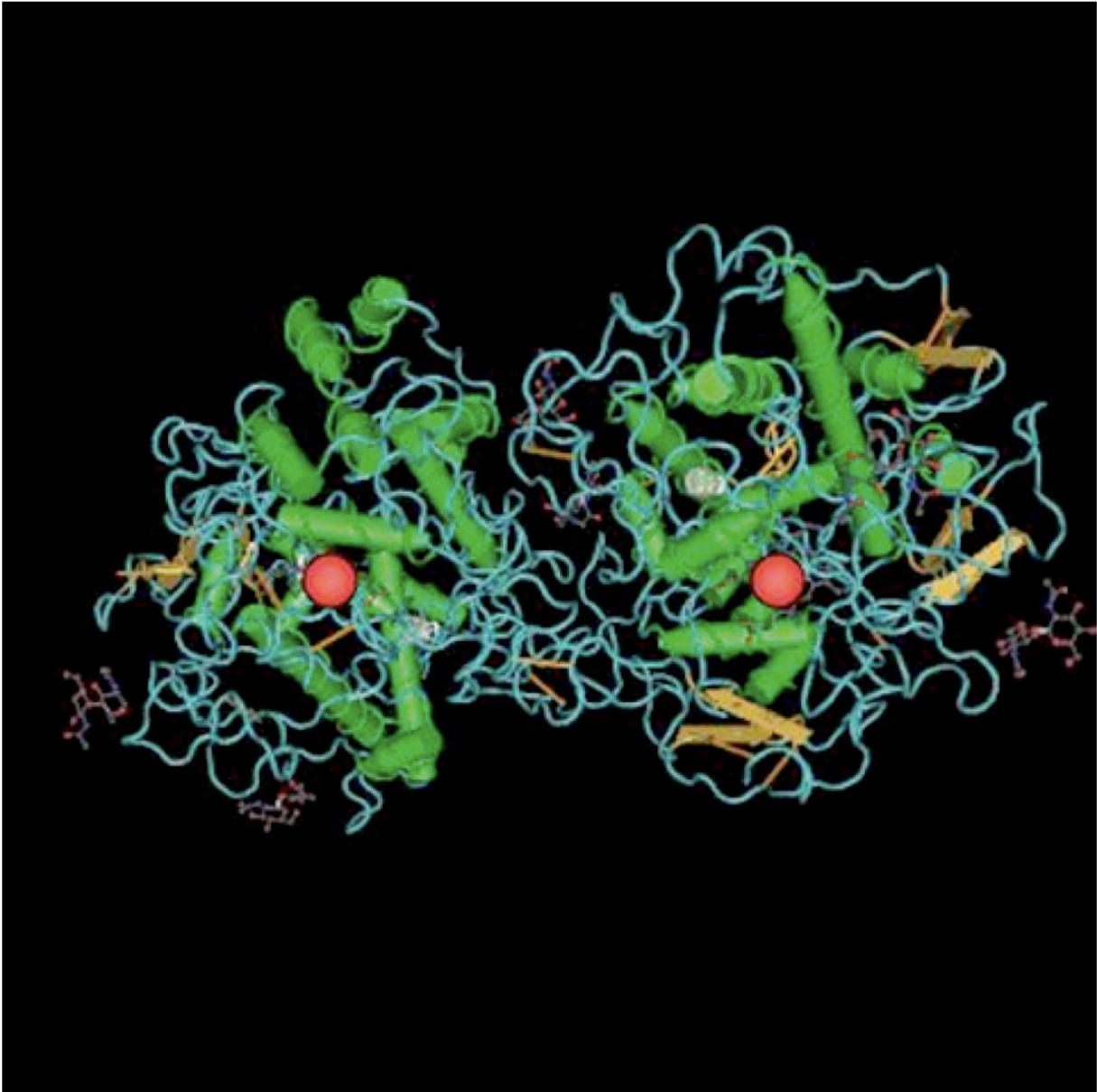
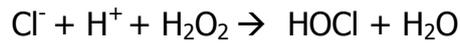


Abb. 2-7: Dreidimensionale Struktur des MPO-Homodimers. Herausgehoben sind die Hämgruppen im Kern (rot) und die α -Helices (grün). Lau und Baldus in *Pharmacol Ther* 2006.

2.6.2 Katalytische Mechanismen und in vivo Substrate von MPO

Die Abwehr von Mikroorganismen durch das MPO-System ist lange bekannt und gut untersucht. Es besteht aus dem Enzym MPO, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und einem oxidierbarem Kofaktor. Die in der Grundform von MPO existierenden Eisen(III)-Ionen werden in Gegenwart von H_2O_2 , dem essentiellen Co-Substrat der Peroxidase, oxidiert. Dabei entsteht die kurzlebige Oxidationsstufe $MPO-I^{76}$, die wiederum verschiedene Substrate, wie z. B. Halide, oxidiert. Die Oxidation von Chlor zu dem bakteriziden Oxidanz Hypochlorit ($HOCl$) spielt die wohl größte physiologische Rolle⁷⁷.



Neben den Haliden werden auch mehrere organische und anorganische Substrate, wie z. B. aromatische Aminosäuren, durch MPO-I über einen singulären Elektronentransfer oxidiert, wodurch MPO-II entsteht.

Die Rückreduktion zu MPO aus MPO-II, das nicht mehr mit Haliden reagiert, erfolgt durch Oxidation von Reduktionsmitteln, wie z. B. Tyrosin oder Ascorbat. Ein weiteres Substrat für MPO-I ist NO, das durch Oxidation in Anwesenheit von H₂O₂ zu Nitrit (NO₂⁻) wird⁷⁸. Zu einem geringen Anteil geschieht dieses durch direkte Oxidation von NO durch MPO. Der weitaus größte Anteil von NO wird allerdings von kleinen durch MPO gebildeten Radikalintermediärprodukten, vor allem Tyrosyl- und Ascorbylradikalen, zu NO₂⁻ oxidiert⁶⁹. NO₂⁻ selbst dient wiederum als Substrat für MPO. In Anwesenheit von H₂O₂ wird es zu Stickstoffdioxid (NO₂), einem sehr instabilen Radikal oxidiert⁷⁹. NO₂ seinerseits wird für die Nitrierung von Proteinen und die Lipidperoxidation verantwortlich gemacht. So oxidiert es Tyrosin zu Nitrotyrosin (NO₂Tyr). Bisher wurde die Entstehung von NO₂Tyr zwar auf die Reaktion von ONOO⁻ und Tyrosin zurückgeführt, doch spricht die histologische Kolo-kalisation von MPO und NO₂Tyr, z. B. in koronararteriellen Plaques, im Lebergewebe sowie in Biopsaten lungentransplantierte Patienten⁸⁰, für eine direkte Bildung von NO₂Tyr durch aktive MPO.

2.6.3 Myeloperoxidase und Herzinsuffizienz

Ein Einfluss von MPO auf die myokardiale Funktion wird durch verschiedene neuere Tierversuchen nahegelegt. Bei akuter und chronischer Ischämie im Mausmodell konnte beobachtet werden, dass MPO kardiales Remodelling und Kammerrupturen fördert^{81 82 83}. Zusätzlich könnten die NO-oxidierenden Eigenschaften von MPO die myokardiale Funktion negativ beeinflussen und somit zu Verschlechterung der ventrikulären Funktion beitragen^{84 85 86}.

Rudolph et al konnten zeigen, dass MPO Plasmaspiegel bei linksventrikulärer Dysfunktion signifikant erhöht sind und erniedrigte LV-Funktion unabhängig von etablierten Herzinsuffizienz Markern vorhersagen⁸⁷.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektive

3.1.1 Herzinsuffizienzgruppe

Es wurden 22 Patienten eingeschlossen, die im Universitären Herzzentrum Hamburg-Eppendorf in den Jahren 2007 bis 2009 stationär oder ambulant vorstellig wurden.

3.1.1.1 Einschlusskriterien

- Männliche und weibliche Patienten
- chronische dilatative Kardiomyopathie mit linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LV-EF) $\leq 40\%$ (ermittelt mittels Transthorakaler Echokardiographie (TTE), Transösophagealer Echokardiographie (TEE) oder LV-Angiographie)
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung der Versuchsperson

3.1.1.2 Ausschlusskriterien

- Alter unter 18 Jahren
- Schwangerschaft, Stillzeit
- bekannte Niereninsuffizienz (Kreatinin $> 1,5$ mg/dl)
- bekannte Leberinsuffizienz
- Herzinsuffizienz ischämischer Ätiologie
- Dekompensierte Herzinsuffizienz
- Akutes Koronarsyndrom
- Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS)
- Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern (wie Clopidogrel)
- Therapie mit Antikoagulanzen (wie Cumarin-Derivate oder Heparin in therapeutischer Dosierung)
- krankhaft erhöhte Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese)

3.1.2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden 19 gesunde Probanden, die über Zeitungsannoncen gefunden wurden, eingeschlossen.

3.1.2.1 Einschlusskriterien

- Gesunde männliche und weibliche Patienten
- Alter zwischen 20 und 70 Jahren
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung der Versuchsperson

3.1.2.2 Ausschlusskriterien

- Nikotinabusus
- Regelmäßige Medikamenteneinnahme jeglicher Art
- Vorliegen einer Grunderkrankung

3.2 Studienprotokoll

Die Studie bestand aus zwei Teilen: eine Fall-Kontroll-Studie, in der Herzinsuffiziente mit gesunden Kontrollprobanden verglichen wurden; eine prospektiver Teil, in dem ein Teil der Herzinsuffizienten einem körperlichem Training zugeführt wurde, dessen Effekte untersucht werden sollten.

Bei allen Studienteilnehmern wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen folgende Untersuchungen durchgeführt:

Tag 1

- Blutentnahme
- Spiroergometrie
- Transthorakale Echokardiographie

Tag 2

- Endothelfunktionsmessung
- Muskelbiopsie aus dem Musculus Vastus Laterales

Für die Interventionsgruppe wurden alle Untersuchungen zeitnah nach Ende der Intervention wiederholt.

3.3 Endothelfunktionsmessung

3.3.1 Bestimmung der flussabhängigen Vasodilatation

Es ist hinlänglich bekannt, dass arterielle Blutgefäße auf Scherstress mit einer Vasodilatation reagieren⁸⁸. Dabei kommt es unter der Voraussetzung eines intakten Endothels durch den Scherstress zur endothelialen NO-Freisetzung. Dieser Mechanismus wird als flussabhängige Vasodilatation, im Englischen flow-mediated dilation (FMD) bezeichnet und kann als Parameter für die vaskuläre NO-Bioverfügbarkeit angesehen werden.

In einer Vielzahl von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es durch systemische vaskuläre Inflammation, z. B. beim Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren oder bei Patienten mit akuten oder chronischen Gefäßleiden aufgrund von NO-Depletion zu einer systemischen Inhibierung dieses Mechanismus kommt^{89 90 91}.

Die FMD wurde nach den Richtlinien des American College of Cardiology per Ultraschall gemessen⁹².

3.3.2 Patientenvorbereitung

Da die FMD durch viele Faktoren, wie z. B. Umgebungstemperatur, Nahrung und Medikamente beeinflusst wird, fand die Untersuchung in angenehm ruhiger Umgebung statt. Zusätzlich wurden die Patienten aufgefordert sechs Stunden vor der Untersuchung weder zu essen, zu trinken, noch zu rauchen.

3.3.3 Messung der FMD

Zur Messung lag der Patient in Rückenlage mit leicht erhöhtem Oberkörper auf einer Liege. Eine Blutdruckmanschette wurde um den Oberarm gelegt.

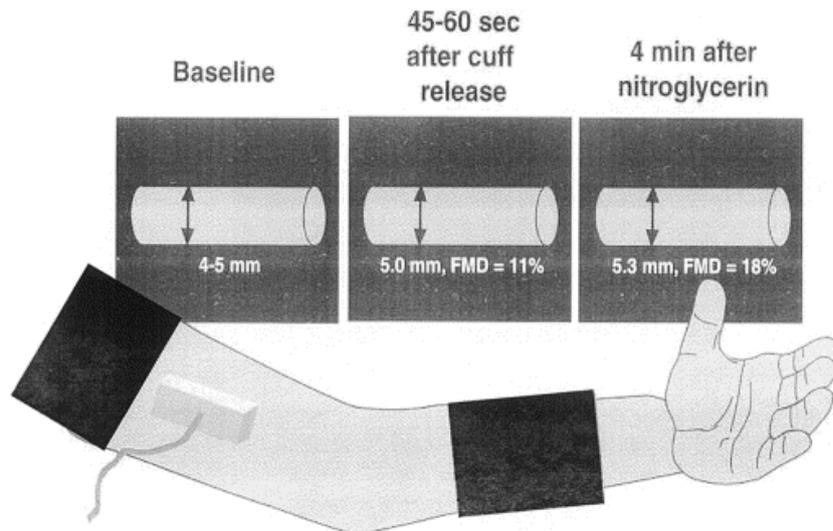


Abb. 3-1: Endothelfunktionsmessung

Anschließend wurde oberhalb der Ellenbeuge ein longitudinaler Anschnitt der A. brachialis mit dem Schallkopf dargestellt. Verwendet wurde hierfür ein Siemens Sonoline G 50 Ultraschallgerät mit einem zwölf MHz linear array transducer, um zweidimensionale Filmsequenzen der A. brachialis aufzunehmen. Ein Segment mit deutlicher vorderer und hinterer Abgrenzung der Intima zum Lumen wurde für die kontinuierliche zweidimensionale Messung der Gefäßdurchmesser ausgewählt (s. Abbildung 3-2). Um möglichst die gleiche Stelle bei allen Messungen zu gewährleisten, wurden äußerliche Merkmale zur Orientierung benutzt.

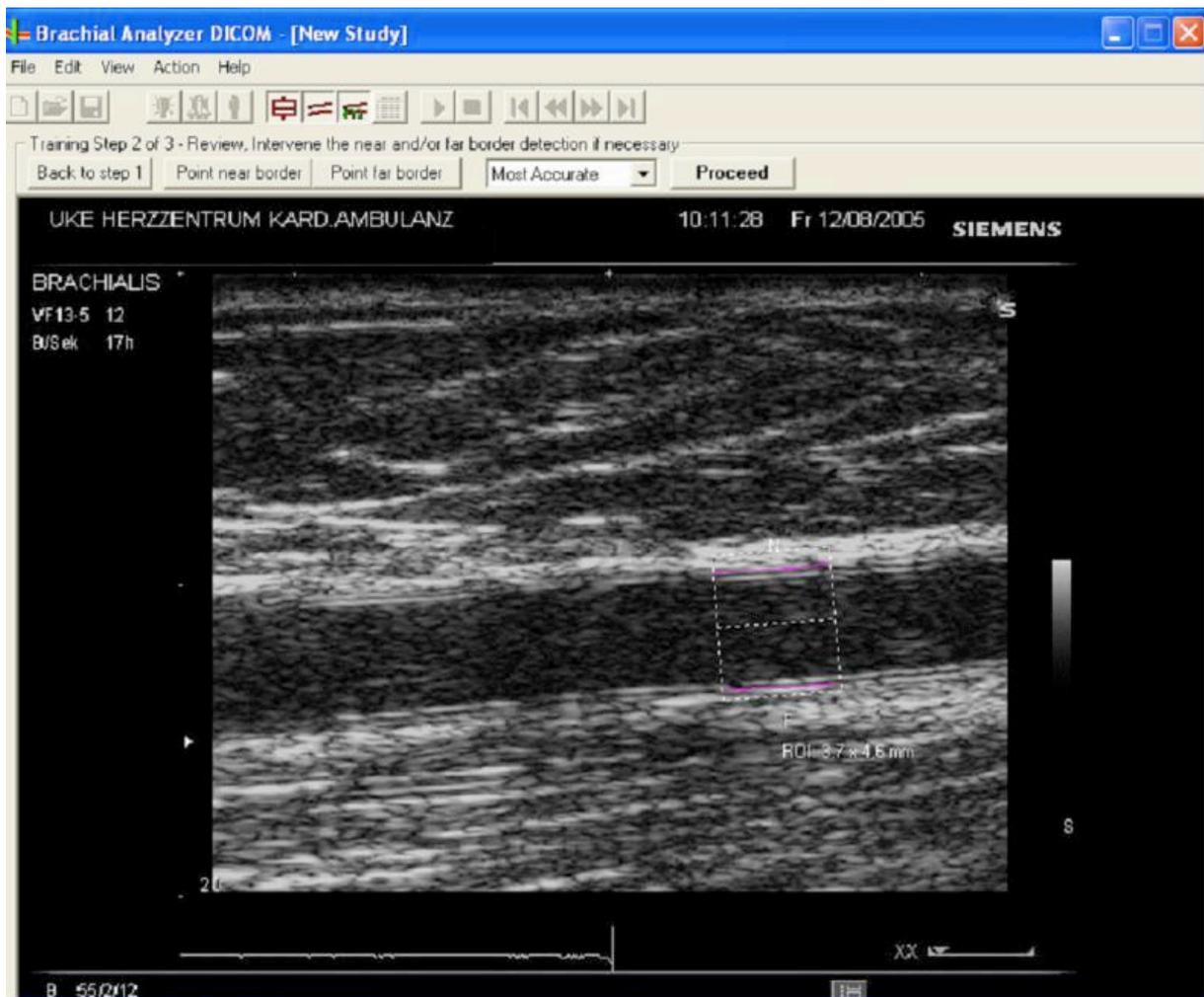


Abb. 3-2: Ultraschalldarstellung der A. brachialis im Längsschnitt und Messung des Gefäßdurchmessers von Intima zu Intima.

Um zunächst den Ausgangsdurchmesser zu bestimmen, wurde ein Längsschnitt der A. brachialis für vier Sekunden aufgenommen. Anschließend wurde die Blutdruckmanschette auf ungefähr 50 mmHg über den systolischen Blutdruck aufgepumpt und somit der Blutfluss für fünf Minuten unterbrochen. Durch die einsetzende Ischämie erfolgte eine Dilatation der distal gelegenen Widerstandsgefäße durch autoregulatorische Mechanismen. Nach dieser Zeit wurde der Druck aus der Blutdruckmanschette abgelassen. Die reaktive Hyperämie und der damit verbundene erhöhte Scherstress bewirkten eine Dilatation der A. brachialis. Direkt im Anschluss an das Öffnen der Blutdruckmanschette wurde das Geschwindigkeits-Zeit-Integral (VTI) des Doppler-Flusses mit Hilfe des pulsed-wave Dopplers ermittelt, um daraus den Volumenfluss-Quotienten (flow ratio) aus dem, durch die Ischämie hervorgerufenen, maximalen Fluss und dem Ausgangsfluss, zu berechnen. Da einige Studien gezeigt hatten, dass die maximale Zunahme des

Gefäßdurchmessers nach 60 Sekunden zu beobachten ist^{93 94}, wurde eine Minute nach Öffnen der Blutdruckmanschette erneut der Längsschnitt der A. brachialis für vier Sekunden per Ultraschallmessung aufgenommen.

3.3.4 Messung der flussunabhängigen Vasodilatation

Die flussunabhängige Vasodilatation (nitro-mediated dilation, NMD), also die endothelunabhängige Vasodilatation spiegelt die Funktion und Elastizität der glatten Gefäßmuskulatur wieder und wird durch Gabe von Nitroglycerin bestimmt. Hierzu wurden mindestens zehn Minuten nach der FMD-Messung abgewartet, um eine vergleichbare Ausgangslage wieder herzustellen. Zunächst wurde –wie oben beschrieben– die A. radialis im Ausgangszustand und erneut vier Minuten nach sublingualer Gabe von 0,4 mg Nitroglyzerin für vier Sekunden aufgezeichnet.

3.3.5 Auswertung der Filmsequenzen

Die zweidimensionalen Filmsequenzen sowohl der FMD als auch der flussunabhängigen Messungen wurden mit Hilfe der Graustufenerkennungssoftware Brachial Analyzer ausgewertet und die Durchmesser der Aa. radiales errechnet. Zur Veranschaulichung wurden die FMD und NMD als prozentuale Veränderung des post-stimulus Durchmessers zum Ausgangsdurchmesser angegeben.

3.4 Studien an Blutproben

3.4.1 Probengewinnung

Jeweils am ersten Tag einer Studiervisite erfolgte eine venöse Blutentnahme. Es wurde Blut in EDTA, Heparin- und Citratröhrchen abgenommen

Zwei der Heparinröhrchen wurden im Anschluss bei 4000 Umdrehungen/Minute (rpm) 3 Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde bei -80°C, bis zur endgültigen Messung der inflammatorischen Marker eingefroren.

3.4.1 Plasmabestimmungen

3.4.1.1 Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Das Plasma wurde zunächst über Nacht bei +4°C aufgetaut und am nächsten Morgen mit einem Probenverdünnungspuffer in vorgegebener Anleitung des ELISA-Testherstellers verdünnt. Daraufhin erfolgte die Pipettierung und Inkubation einer Mess- und Standardreihe auf eine Mikrotiterplatte. Diese Platte war mit einem polyklonalen Antikörper (*coating*-Antikörper) beschichtet, sodass das im Plasma befindliche Antigen hier binden konnte.

Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte mit einem dafür vorgesehenen Waschpuffer gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am (*coating*-) Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions- (*detection*)-Antikörper, gekoppelt mit einem Enzym zugegeben. Dieser bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (deshalb der Name Sandwich-ELISA - das Antigen ist zwischen die beiden Antikörper wie in einem Sandwich gepackt). Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen und dann ein, zum an den Antikörper gebundenen Enzym, passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt. Es kommt zu einem Farbumschlag, der in einem Photometer verfolgt werden kann. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

Nach diesem Testprinzip erfolgte die Plasmakonzentrationsbestimmung der folgenden Marker:

- Elastase ng/ml
- Hochsensitives CRP (hsCRP) mg/l
- Interleukin 6 (IL6) g/ml
- proBNP ng/l
- Myeloperoxidase (MPO) ng/ml

3.4.2 Isolierung von Neutrophilen Granulozyten

Die Isolation neutrophiler Granulozyten erfolgte nach Eiserich et al⁹⁵. Es wurden den Probanden 25 ml peripher-venöses Blut in eine Perfusor-Spritze abgenommen, die mit Heparin-Natrium vorgelegt war (Endkonzentration 20IE/ml). Das heparinisierte Blut wurde 1:1 auf eine Dextranlösung (45mg/ml 0,9% NaCl) gegeben. Erythrozyten, basophile und eosinophile Granulozyten sedimentierten, so dass nach 30 min der Überstand, bestehend aus Plasma mit Leukozyten, Thrombozyten und restlichen Erythrozyten, unter Erhaltung der Phasengrenze vorsichtig auf 15 ml Histopaque-1077 pipettiert wurde. Der Ansatz wurde anschließend 30 Minuten mit 600 x g und deaktivierter Bremsenfunktion zentrifugiert. Thrombozyten und mononukleäre Zellen, die in Histopaque den Überstand bildeten wurden verworfen. Restliche Erythrozyten aus dem Pellet wurden mit 6ml Aqua bidest. einige Sekunden resuspendiert und damit zur hypotonen Lyse gebracht. Durch Zugabe von 0,9% NaCl-Lösung wurde die Lyse beendet. Die neutrophilen Granulozyten wurden anschließend durch 10 minütige Zentrifugation mit 350 x g als Pellet gesammelt. Dieses wurde in 1ml steril filtriertem HBSS mit 0,25% BSA (Zellpuffer) aufgenommen. Die Zellzahl wurde durch Verdünnung und mikroskopische Zählung mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Granulozyten wurden zu je 2 Millionen Zellen in Epis pipettiert, zentrifugiert und nach Entfernung des Überstands bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

3.5 Studien an Muskelbiopsien des Musculus Vastus laterales

3.5.1 Gewinnung der Muskelbiopsien

Die Muskelbiopsien wurden aus dem Vastus laterales des Musculus Quadriceps Femoris gewonnen. Die Entnahme erfolgte in Lokalanästhesie, wobei nur die Haut und das subkutane Gewebe, jedoch keinesfalls der Muskel selbst, infiltriert wurden, da der Skelettmuskel für immunhistochemische Untersuchungen höchst irritabel und artefaktanfällig ist. Quetschung oder andere Verletzungen des Gewebes wurden vermieden.

Die den Muskel bedeckende Faszie wurde parallel zum Muskelfaserverlauf inzidiert. Um Kauterartefakte zu vermeiden, wurde das Ligieren der Blutgefäße der Elektrokoagulation vorgezogen.

Die entnommenen Proben hatten eine Größe von ca. 2 x 2 x 2 cm und wurden direkt nach der Entnahme in drei gleiche Teile geschnitten.

Von diesen wurde eines in 4 % Formaldehyd-Lösung gegeben und für histologische Untersuchungen anschließend in Paraffin gebettet. Ein weiteres Stück wurde auf OCT Medium langsam über flüssigem Stickstoff gefroren und dann auf -80°C für immunhistochemische Untersuchungen gelagert. Der letzte Teil der Biopsie wurde in flüssigem Stickstoff schock gefroren und sollte nach Homogenisierung quantitativen Analysen zur Verfügung stehen.

3.5.2 Quantitative Myeloperoxidase Bestimmung

3.5.2.1 Homogenisierung

Die tiefgefrorenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben. Anschließend wurden die Proben in ein ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes zwei ml Eppendorf- Tube überführt und mit kalter Homogenisierungs-Lösung langsam aufgetaut. Das Homogenat wurde anschließend für eine Stunde unter mehrmaligen Vortexen auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wurden die mit Membranen assoziierten Proteine durch das, in der Homogenisierungs-Lösung befindliche Triton X-100, aufgespalten. Darauf folgte eine Zentrifugation für zehn

Minuten bei 10000 rpm und 4 °C, um das unlösliche Material von dem Gelösten zu trennen. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Tube überführt. Für die Proteinbestimmung (s. u.) wurden 20 µl des Überstandes abgenommen. Der Rest wurde im Verhältnis 2:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

Im Anschluss wurden die Proben bis zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine bei -20 °C gelagert.

3.5.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays nach Bradford. Dabei wird durch Bindung eines im Bio-Rad-Reagenz enthaltenen Farbstoffs an Proteine das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm (ohne Protein) auf 595 nm (mit Protein) verschoben. Somit ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung.

Um die Proteinbestimmung nach Bradford durchzuführen, wurde zunächst eine Eichreihe aus BSA-Stammlösung (100 µg/ml Rindserum-Albumin) mit definierten aufsteigenden Proteinkonzentrationen (von 0 bis 25 µg/ml) hergestellt. Die Proben aus den Gefäßhomogenaten wurden nach Zugabe des Bio-Rad-Reagenz durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach 5 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde dann mit Hilfe der Eichkurve bestimmt.

3.5.2.3 Immunopräzipitation

3.5.2.3.1 Binden der Antikörper

Jeweils 50 µl Dynabeads wurden in Eppendorf-Tubes pipettiert und danach auf den Magnet gesetzt. Nach Entfernung des Überstandes wurden 200 µl des Antikörper Binde- und Waschpuffers und 10 µl des Erstantikörpers (anti-MPO Calbiochem) hinzugefügt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für zehn Minuten unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde über dem Magneten erneut der Überstand entfernt und die entstandenen Dynabead-Antikörper Komplexe ein weiteres Mal mit 200 µl Binde- und Waschpuffer gewaschen.

3.5.2.3.2 Immunopräzipitation der Myeloperoxidase

Es wurden jeweils 500 µg Protein der einzelnen Proben zu den Dynabead-Antikörper Komplexen gegeben, mit Homogenisierungspuffer bis auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und dann bei Raumtemperatur zehn Minuten lang unter Rotation inkubiert. Auf dem Magneten wurde anschließend der Überstand abpipettiert, und drei weitere Waschzyklen mit jeweils 200 µl Waschpuffer durchgeführt.

3.5.2.3.3 Elution

Die Dynabead-Antikörper-Antigen Komplexe wurden durch jeweils 20 µl Elutionspuffer aufgelöst. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abpipettiert und in ein neues Eppendorf Tube überführt. Das dort gelöste Protein wurde im Anschluss im Verhältnis 2:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

3.5.2.4 Bestimmung des MPO-Gehalts per Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum differentiellen Nachweis von Proteinen, die nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und dann mit spezifischen Antikörpern markiert werden.

Zur Quantifizierung wurden die antikörpermarkierten Proteine mit einem chemilumineszenten Zweitantikörper inkubiert.

3.5.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung des MPO-Gehalts per Western Blot mussten zunächst die Proteine aufgetrennt werden. Diese Auftrennung erfolgte mittels einer SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese). Das Detergenz SDS bildet mit den Proteinen negativ geladene Komplexe mit konstantem Ladungsverhältnis und Struktur, so dass die Auftrennung der Proteine fast ausschließlich vom Molekulargewicht abhängt.

Zunächst wurde ein 1,5 mm starkes und ca. 5 cm langes Trenngel (10 %-Acrylamid/Bisacrylamid) gegossen. Um eine gleichmäßige Gelkante zu erhalten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und ein ca. 1 cm starkes Sammelgel (4,5 %-

Acrylamid/Bisacrylamid) aufgegossen und ein Kamm hineingesteckt, so dass Kammern mit einer Breite von ca. 5 mm entstanden.

Nach der Polymerisation wurden die Kammern zunächst mit SDS-PAGE Laufpuffer ausgespült. Dann wurde von den aufgetauten und mit Probeladepuffer versetzten Proben jeweils das Präzipitat aus 500 µg Gesamtprotein in die Kammern gegeben. Zusätzlich zu den Proben wurde ein 10 kDa-Molekulargewichtsstandard und ein im Gel sichtbarer, vorgefärbter Proteinstandard aufgetragen.

Die Gelelektrophorese erfolgte dann mit dem SDS-PAGE Laufpuffer zunächst bei 60 V bis die Proben in das Trenngel eingetreten waren. Anschließend wurde die Elektrophorese für ca. zwei Stunden bei 150 V fortgeführt, bis die von den Proteinen getrennte Laemmli-Lösung aus dem Trenngel lief.

3.5.2.4.2 Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

In einer mit Transferpuffer gefüllten Schale wurde ein Schwamm, ein 1,5 mm starkes Filterpapier, das Trenngel, eine passend zurechtgeschnittene Nitrozellulose Membran, ein zweites Filterpapier und ein weiterer Schwamm luftblasenfrei aufeinander gelegt und mit einem Blothalter zusammengeklemt. Der Blothalter wurde dann so in eine mit vorgekühltem Transferpuffer gefüllte Transferkammer überführt, dass die Membran zur Anode ausgerichtet war.

Bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA erfolgte der Transfer innerhalb von 90 Minuten.

Nach Abbau des Blotaufbaus wurden die Proteine zur Kontrolle von Ladung und Transfer sowie zur Kennzeichnung der 10 kDa Standard-Banden mit Hilfe einer Ponceau-S Färbung sichtbar gemacht. Anschließend wurde die Färbung mit Waschpuffer (TBST) wieder entfernt.

Zur Sättigung der freien Proteinbindungsplätze wurde die Nitrozellulose Membran für 1,5 Stunden mit Milchpuffer (5 %) als Blockmedium inkubiert, wobei alle 30 Minuten der Puffer gewechselt wurde. Dabei wurde –wie bei allen folgenden Inkubationen– die Lösung durch leichtes Schwenken auf einem Horizontalschaukler ständig durchmischt.

Danach wurde die Membran mit einem anti-MPO-Antikörper (Calbiochem 1:2500) in Milchpuffer bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran mit dem Milchpuffer für 1,5 Stunden gewaschen, wobei wiederum alle 30 Minuten der Puffer gewechselt wurde. Anschließend folgte die Kopplung des mit einer Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers. Dazu wurde die Membran mit Milchpuffer und dem Sekundärantikörper (1:10000) für zwei Stunden inkubiert und anschließend für weitere 2 Stunden mit TBST gewaschen.

Nach dem Waschen wurde die Membran auf eine Glasplatte gelegt, die zwei Komponenten einer ECL-Lösung (Enhanced-Chemiluminescence) zusammengegeben und diese auf der Membran verteilt. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die Membran abgetropft und mit Klarsichtfolie bedeckt in eine Filmkassette gelegt. Die an dem Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysierte die Oxidation von dem in der ECL-Lösung vorhandenen Luminol und löste damit eine Chemilumineszenz aus. Die Detektion des durch die Reaktion freigesetzten Lichts erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms in einer Dunkelkammer.

3.5.3 Fluoreszenzimmunhistochemie

Aus den gewonnenen Proben, die auf OCT gefroren wurden, wurden mit einem Mikrotom 5 µm starke Schnitte erstellt. Diese Schnitte wurden fünf Minuten lang bei Raumtemperatur aufgetaut und daraufhin mit 3,7% Formaldehyd über fünfzehn Minuten fixiert.

Nach dreimaligem, fünfminütigem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit einem Dako-Wachsstift umrandet.

Als nächstes folgte die Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100 in PBS-Lösung für zwanzig Minuten. Nach einstündigem Blocken unspezifischer Bindestellen mit 10% Ziegenserum mit 0,1% Triton X-100 auf PBS erfolgte die Inkubation mit dem anti-MPO Erstantikörper von Calbiochem im Verhältnis 1:250 in der gleichen Blocklösung. An die sechzigminütige Inkubation fügten sich drei Waschzyklen mit PBS .

Nun folgte eine Inkubation mit dem Zweitantikörper über sechzig Minuten im Dunkeln. Der Verwendete Antikörper war Alexa 488 Goat anti-Rabbit im Verhältnis 1:100 in 0,1% Triton X-100 in PBS.

Nach zweimaligem Waschen in PBS im Dunkeln wurden die Präparate mit Dapi 1µg/ml über 15 min im Dunkeln inkubiert um die Zellkerne anzufärben.

Zum Abschluss wurden die Gewebe mit Dako Mounting Fluid betropft und dann luftblasenfrei mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Zur Auswertung wurden die Proben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes angeschaut.

3.6 Körperliches Training und Untersuchung der Leistungsfähigkeit

3.6.1 Spiroergometrie

Zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit wurde bei allen Studienteilnehmern eine Spiroergometrie durchgeführt.

Dabei wurden die Probanden auf Fahrradergometern unter steigendem Widerstand (Erhöhung um 10 W pro Minute) belastet, bis die Patienten ausbelastet waren oder ein Abbruchkriterium erreicht war (s.u.).

Während der Belastung wurden die Patienten mittels EKG und Blutdruckmessungen überwacht. Gleichzeitig wurden mittels Gesichtsmaske kontinuierlich die Atemgase gemessen. Aus diesen Messungen konnten folgende Werte bestimmt werden:

- Atemfrequenz
- Atemminutenvolumen
- Sauerstoffaufnahme (VO_2)
- Kohlendioxidabgabe (VCO_2)
- Respiratorischer Quotient (VCO_2 / VO_2)

Zusätzlich wurden aus kapillären Blutentnahmen in einem Abstand von 2 min Laktatwerte bestimmt, um die individuelle anaerobe Schwelle, also die maximale Leistungsfähigkeit, die ausdauernd gehalten werden kann, zu bestimmen.

Für alle Studienteilnehmer galten strenge Abbruchkriterien. So wurde die Untersuchung beendet, wenn eines der folgenden Kriterien zutraf:

- Blutdruckanstieg über 220 mmHg systolisch
- Blutdruckabfall unter den Ausgangswert
- ST-Strecken Senkungen oder Hebungen $>0,1$ mV im EKG
- Ventrikuläre Herzrhythmusstörungen
- Angina-Pectoris-Beschwerden

Wenn keines der Abbruchkriterien eintrat, wurde die Belastung fortgeführt, bis subjektiv durch den Patienten (z.B. bei eintretender Schwäche der Beine) oder objektiv bei einem Respiratorischen Quotienten $>1,1$, Ausbelastung erreicht wurde.

3.6.2 Körperliches Training auf Fahrradergometern

Probanden in der Interventionsgruppe trainierten über 12 Wochen, zweimal wöchentlich auf Fahrradergometer in den Räumen der Ambulanten Physiotherapie auf dem Gelände des UKE.

Das Training dauerte jeweils mindestens 30 min und wurde Herzfrequenz gesteuert durchgeführt. Das Institut für Sportmedizin der Universität Hamburg erstellte mit den aus der Spiroergometrie gewonnenen Daten individuelle Trainingsempfehlungen für die Studienteilnehmer.

Das Training sollte bei 60% der individuell anaeroben Schwelle durchgeführt werden. Das bedeutet, dass der Proband für das Training die Herzfrequenz halten sollte, die er in der Spiroergometrie bei 60 % der Last der anaeroben Schwelle hatte. Die Ergometer wurden so programmiert, dass sich der Widerstand je nach aktueller Herzfrequenz des Patienten anpasste, bis er in einem Bereich von 10 Schlägen pro Minute um die berechnete Zielfrequenz angelangt war.

3.7 Statistische Auswertung

Die in der Tabelle der klinischen Charakteristika dargestellten kontinuierlichen Variablen sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM). Die kategorischen Daten sind zusammengefasst als Häufigkeit und Prozent. Nicht normalverteilte Variablen wurden als Median und Interquartilsabstand (IR) angegeben. Zur graphischen Darstellung wurde der Boxplot verwendet. Vergleiche zwischen den Datengruppen wurden mit dem Student'schen T-Test oder Wilcoxon's signed-rank test, abhängig von ihrer Normalverteilung, durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde für Werte $p < 0,05$ angenommen. Alle statistischen Analysen wurden unter der Verwendung von STATA Version 10.1. durchgeführt.

3.8 Materialien

PBS-Puffer

8 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
1,26 g/l	Na ₂ HPO ₄

pH-Wert 7,3

Homogenisierungs-Lösung

10 ml	Homogenisierungspuffer
2 µg/ml	Pepstatin (2 mg/ml)
7 µg/ml	Leupeptin (2 mg/ml)
10 µg/ml	Aprotinin (1 mg/ml)
0,5 mmol/l	PMSF
0,5 % (v/v)	Triton X-100

Homogenisierungspuffer

20 mmol/l	Tris
250 mmol/l	Sucrose
3 mmol/l	EGTA
20 mmol/l	EDTA

pH-Wert 7,5

Trenngel 10 %

10 ml	Aqua dest.
5 ml	Trenngel-Puffer
5 ml	Acrylamid / Bisacrylamid 40 %
35 µl	Temed
120 µl	APS

Trenngel-Puffer

181,7 g/l	Tris
-----------	------

2,5 g/l EDTA
4 g/l SDS
pH-Wert 8,8

Sammelgel 4,5 %

6,4 ml Aqua dest.
2,5 ml Sammelgel-Puffer
1,13 ml Acrylamid / Bisacrylamid 40 %
30 µl Temed
120 µl APS

Sammelgel-Puffer

60,6 g/l Tris
2,5 g/l EDTA
pH-Wert 6,8
4 g/l SDS

SDS-PAGE Laufpuffer

3,0 g/l Tris
14,4 g/l Glycin
0,744 g/l EDTA
0,6 g/l SDS

Transferpuffer

3,03 g/l Tris
14,4 g/l Glycin
20 % (v/v) Methanol

TBST

2,42 g/l Tris
8 g/l NaCl
pH-Wert 7,6
0,01 % (v/v) Tween

Milchpuffer

TBST

5 % (w/v) non-fat dry milk

Proteinbestimmung

Bio-Rad Protein Assay von der Firma Bio-Rad (München, Deutschland).

Primärantikörper

Immunpräzipitation

Immunoprecipitation Kit - Dynabeads® Protein A von der Firma Invitrogen

ECL-Lösung

SuperSignal West Femto von der Firma Pierce Biotechnology Inc. (Illinois, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Charakteristika Studiengruppe

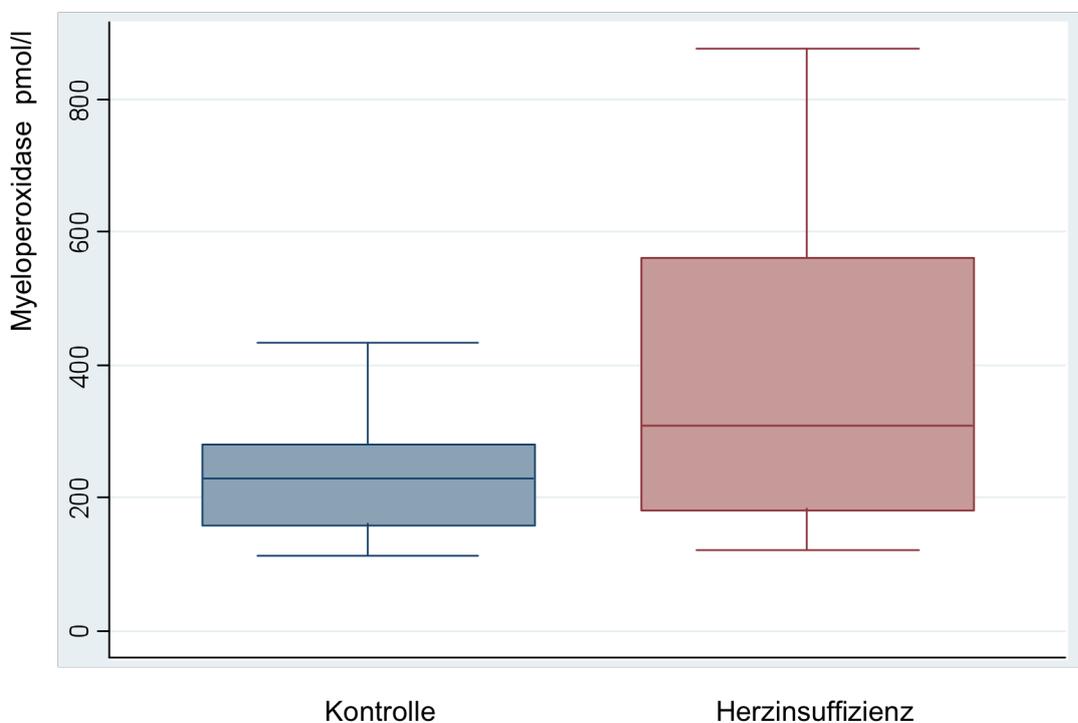
	Kontrollgruppe n=19	Herzinsuffizienz n= 22
Alter	50,16 +/- 12,16 Jahre	49,04 +/- 14,4 Jahre
Geschlecht:		
Männlich	11 (57,9 %)	21 (95,5 %)
Weiblich	8 (42,1 %)	1 (4,5 %)
Hb (g/dl)	14,2 +/- 1,3	13,7 +/- 1,8
Leukozyten (Mrd/ml)	7,01 +/- 1,1	7,76 +/- 2,4
Neutrophile (Mrd/ml)	4,60 +/- 1,0	4,84 +/- 1,7
Creatinin (mg/dl)	0,84 +/-0,15	1,01 +/- 0,19
LDL (mg/dl)	104,13 +/-34,6	118,27 +/- 39,3
GGT (U/l)	25,22 +/-17,1	67,25 +/-60,0
GPT (U/l)	27,23 +/- 16,4	35,23 +/- 20,5
Quick (%)	107,9 +/- 11,1	98,1 +/- 24,6
Hba1c (%)	-	5,60 +/- 0,62
Spiro max (Watt)	165,26 +/- 71,4	95,13 +/- 36,9
VO2 Max (ml/min x kgKG)	27,7 +/- 10,7	14,29 +/- 4,7

4.2 Studien an Blutproben

4.2.1 Vergleich Herzinsuffiziente mit Kontrollgruppe

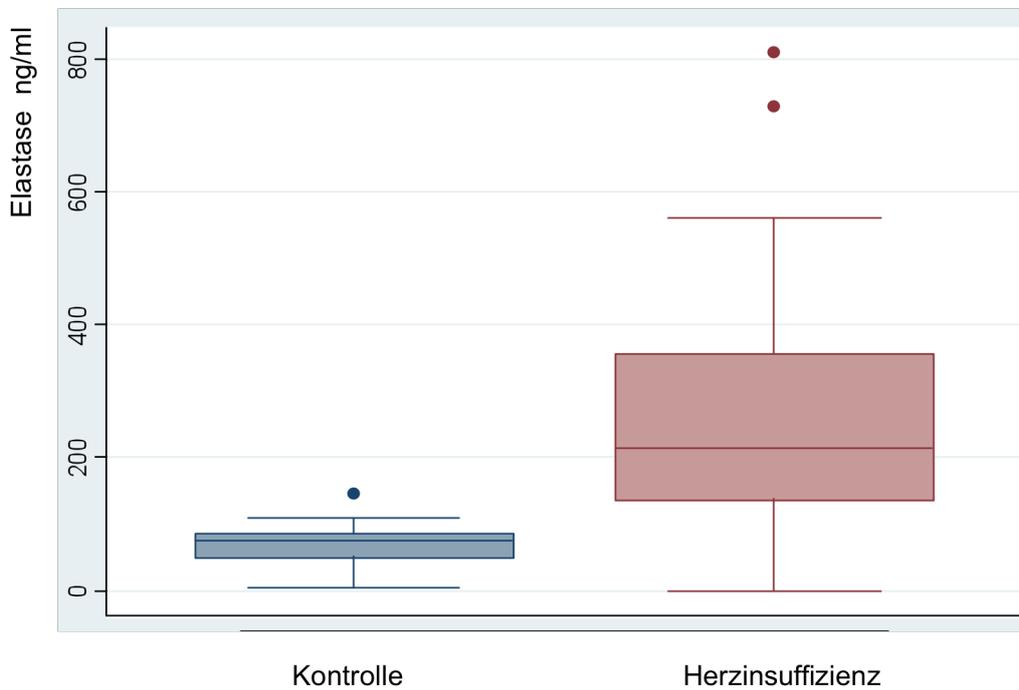
Verglichen wurden alle Probanden der Kontrollgruppe, n=19, mit allen Patienten der Herzinsuffizienzgruppe, n= 22, unabhängig davon ob diese später noch trainiert wurden, oder nicht.

4.2.1.1 Myeloperoxidase Plasma Spiegel



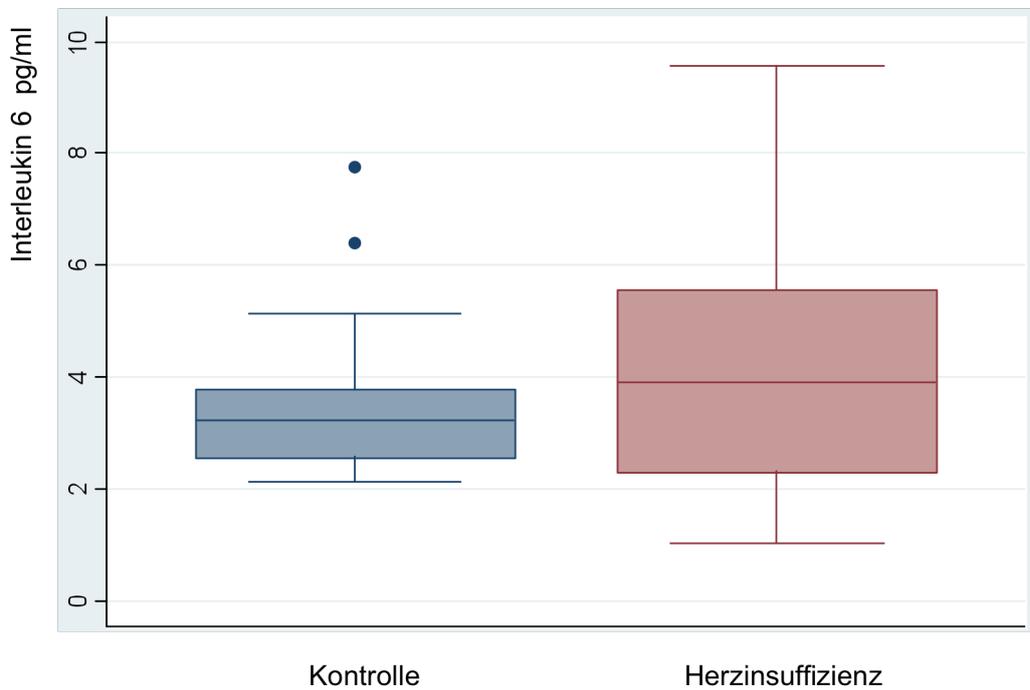
Der MPO Plasmaspiegel in der Kontrollgruppe (blauer Balken) liegt bei 230 [IR: 161-279] pmol/l und ist damit signifikant niedriger als in der Herzinsuffizienzgruppe (roter Balken) mit 310 [IR: 185-561] pmol/l. $p= 0.0039$.

4.2.1.2 Elastase Plasma Spiegel



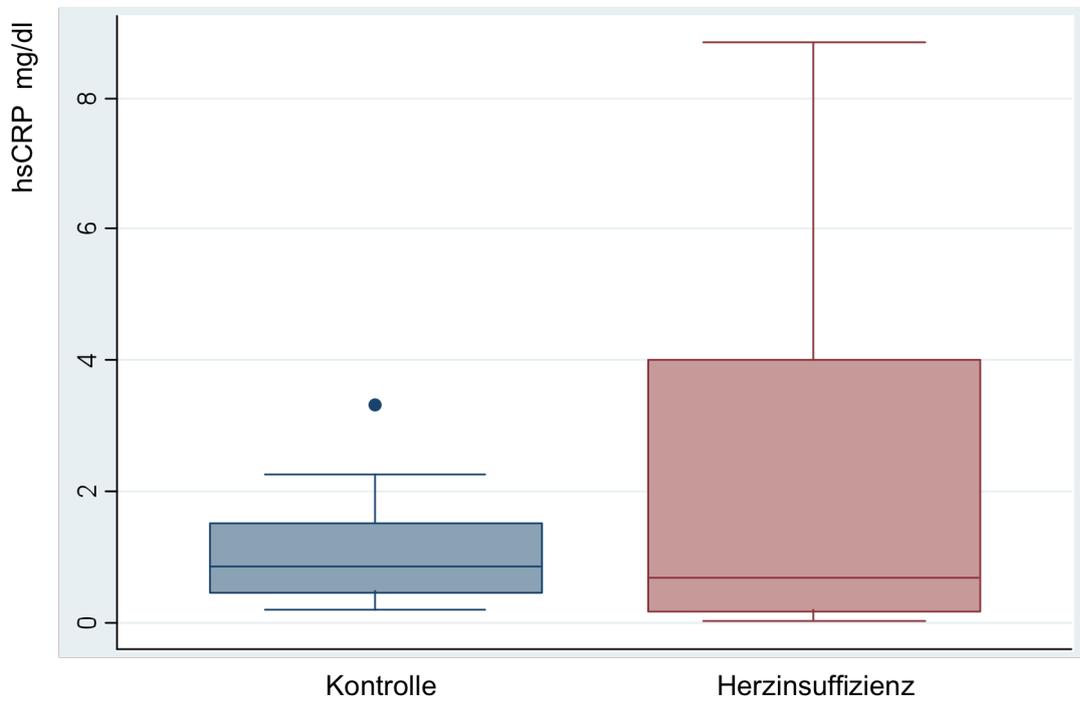
Für Elastase ist der Unterschied der Plasmaspiegel hoch signifikant: In der Kontrollgruppe liegt der Median bei 74,22 ng/ml [IR: 50,46-85,8] bei den Herzinsuffizienten bei 215 ng/ml [IR: 136,9-355,46]. $p = 0,0002$. Elastase wird gemeinsam mit MPO in den azurophilen Granula von Neutrophilen Granulozyten gespeichert.

4.2.1.3 IL-6 Plasma Spiegel



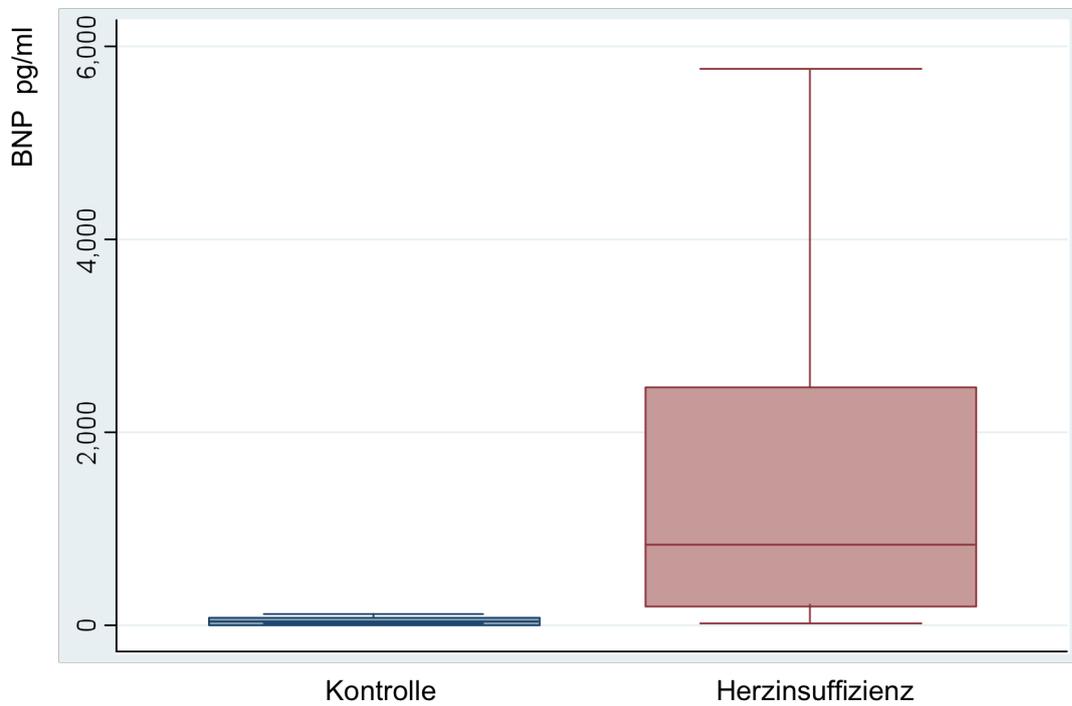
Für IL-6 zeigt sich keine Signifikanz beim Vergleich von Kontrollgruppe und Herzinsuffizienzgruppe. (3,22 pg/ml [IR: 2,57-3,78] vs. 3,91 [IR: 2,31-5,56] pg/ml, $p= 0,2747$)

4.2.1.4 hsCRP Plasma Spiegel



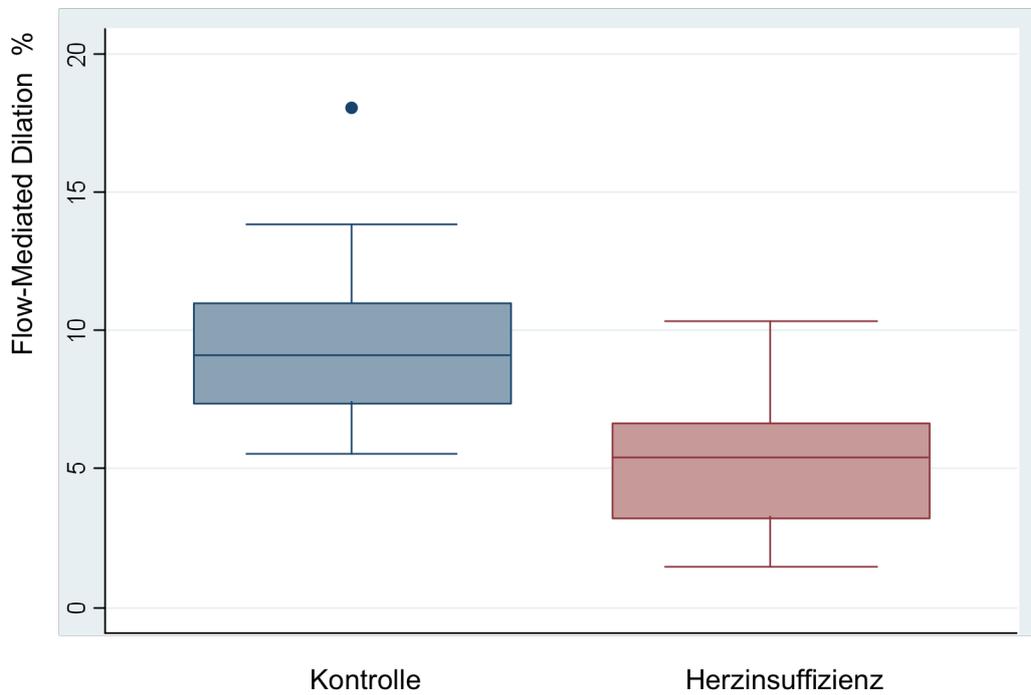
Auch beim hsCRP konnte keine Signifikanz der Plasmawerte zwischen gesunden und erkrankten Probanden festgestellt werden. (0,86 [IR: 0,48-1,52] mg/dl vs. 0,68 [IR: 0,2-4,0] mg/dl, $p=0,1215$)

4.2.1.5 BNP Plasma Spiegel



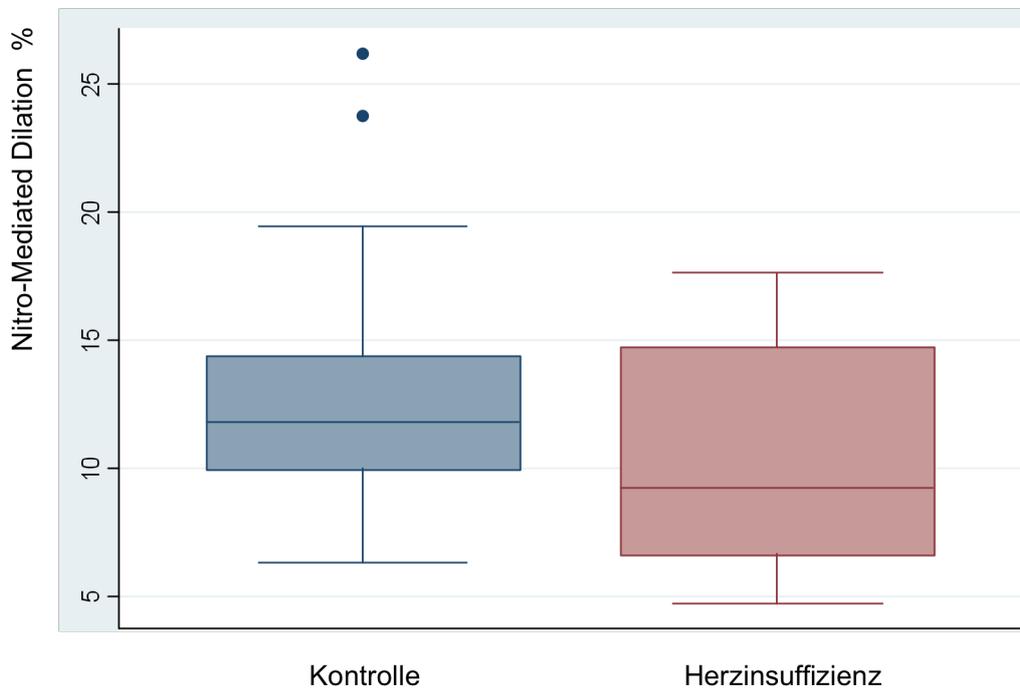
Wie zu erwarten sind die BNP-Spiegel bei Herzinsuffizienten mit im Mittel 832 [IR: 209,6-2465] pg/ml signifikant höher als bei den Gesunden (42,94 [IR: 20,44-64,26] pg/ml). $p = 0,0011$.

4.2.1.6 Endothelfunktion (Flussabhängige Dilatation)



Die Flow-mediated Dilation (FMD) in der Kontrollgruppe ist mit 9,07 [IR: 7,41-11,00] % signifikant besser als bei den Patienten mit Herzinsuffizienz mit 5,73 [IR: 3,29-6,65] %. Dies ist Ausdruck der eingeschränkten Endothelfunktion bei den chronisch Kranken. $p= 0,0001$.

4.2.1.7 Endothelunabhängige Gefäßdilatation

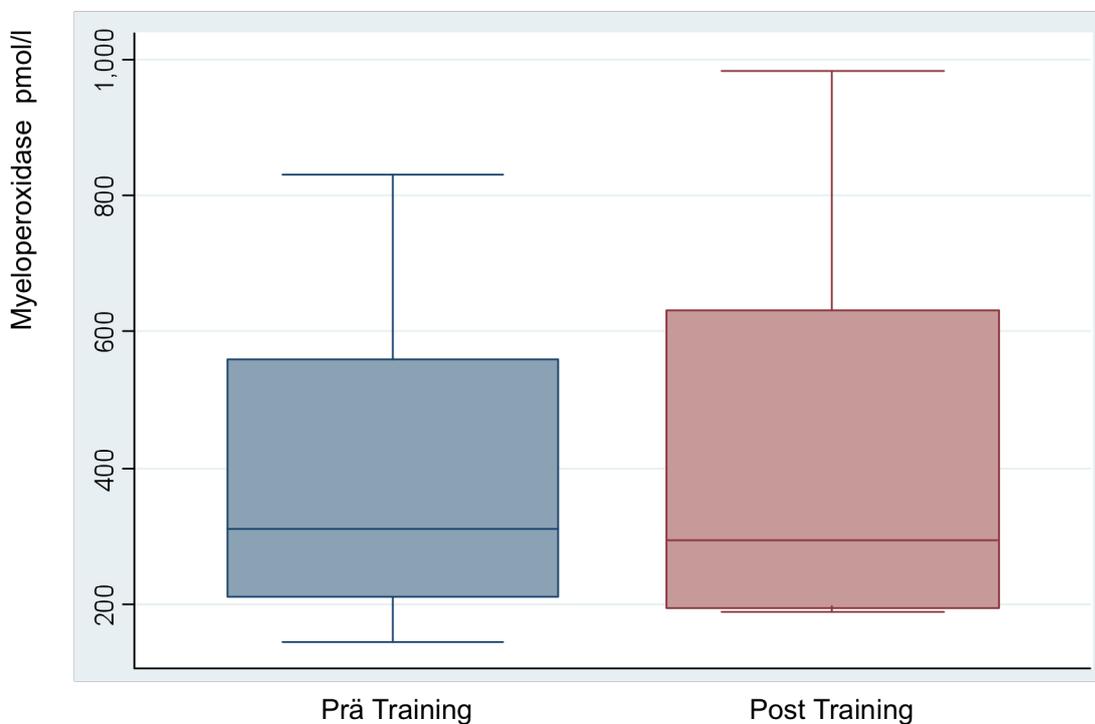


Im Gegensatz zur FMD unterscheidet sich die weitestgehend endothelunabhängige NMD nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen (11,83 [IR: 10,03-14,36] % vs. 9,29 [IR: 6,70-14,73] %, $p= 0,089$)

4.2.2 Vergleich Interventionsgruppe prä und post Herzkreislauf-Training

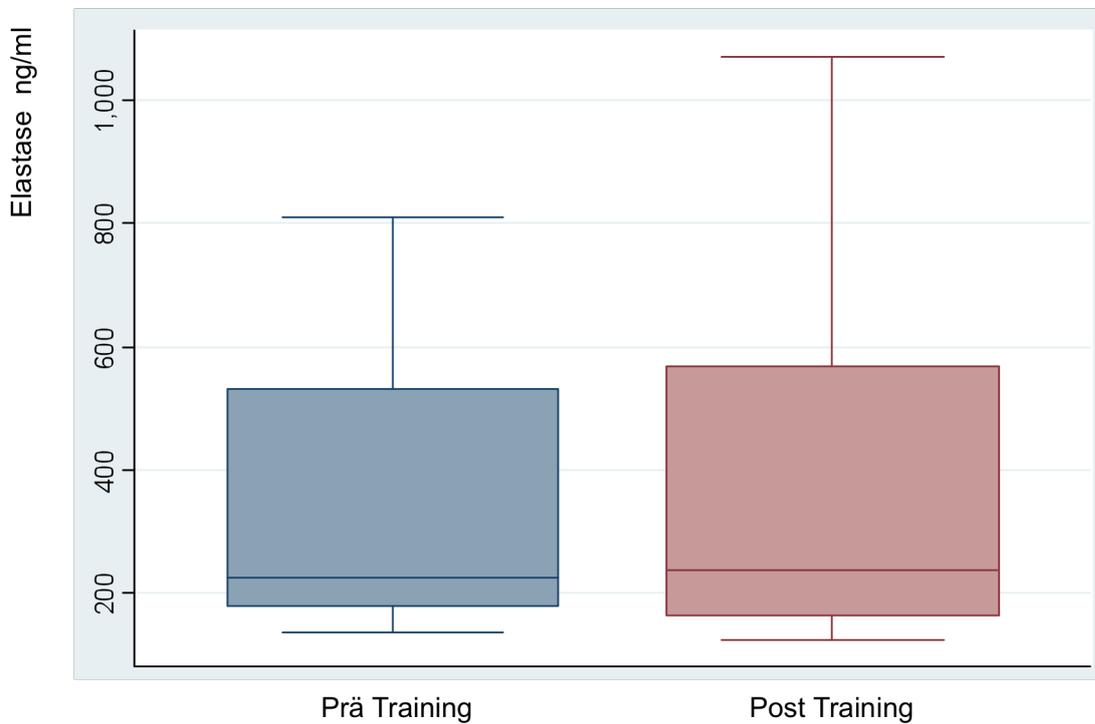
Verglichen wurden nur die Prä- und Posttrainings-Werte der Patienten mit Herzinsuffizienz, die an der Trainingsintervention teilgenommen und sie auch beendet haben, n= 9.

4.2.2.1 Myeloperoxidase Plasma Spiegel



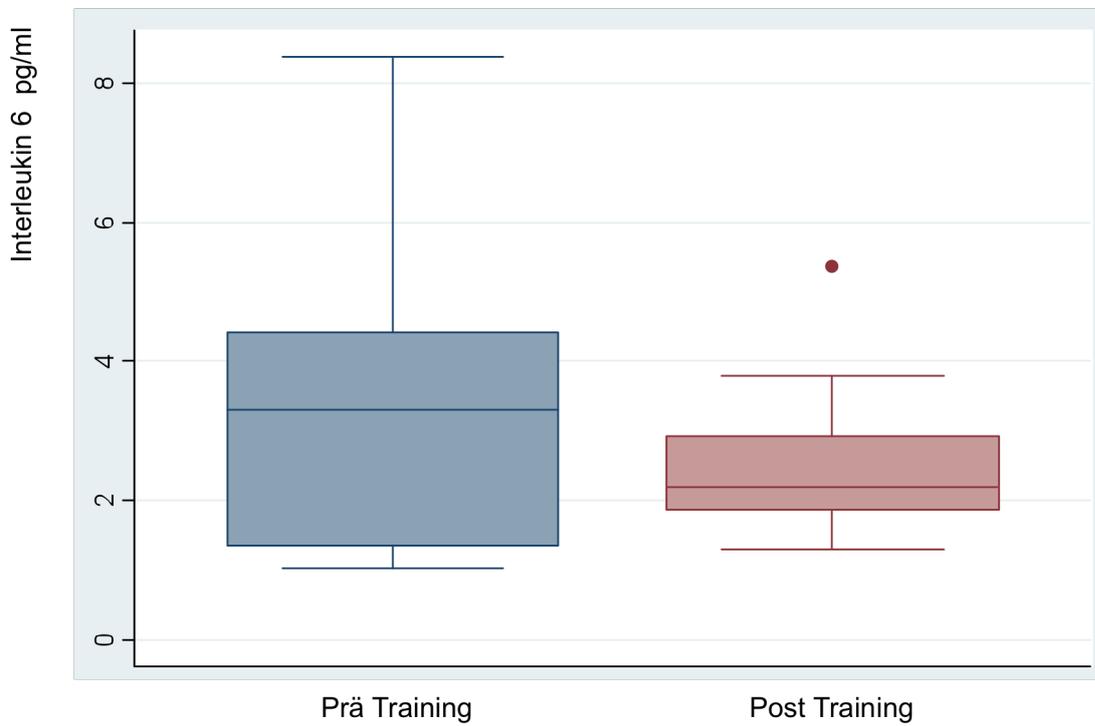
In der Interventionsgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied der MPO Plasma-Spiegel vor (blauer Balken) und nach (roter Balken) dreimonatigem Training. (310 [IR: 213-561] pmol/l vs. 295 [IR: 197-631] pmol/l, p= 0,589)

4.2.2.2 Elastase Plasma Spiegel



Auch die leichte Zunahme von gemessener Elastase nach Training ist nicht signifikant. (224,88 [IR: 180,86-530,6] ng/ml vs. 236,57 [IR: 165,4-569,65] ng/ml, $p=0,187$)

4.2.2.3 IL-6 Plasma Spiegel



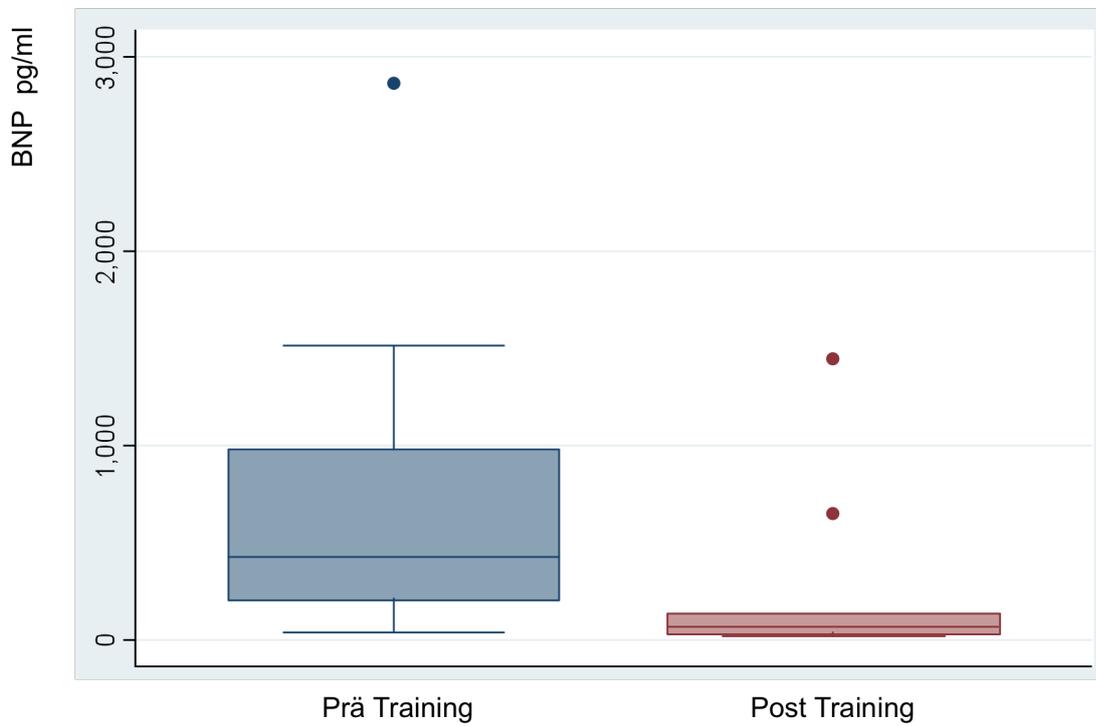
Eine Abnahme der IL-6 Spiegel nach Training von 3,3 [IR: 1,35-4,42] pg/ml auf 2,19 [IR: 1,88-2,93] pg/ml hat keine Signifikanz. $p= 0,1859$.

4.2.2.4 hsCRP Plasma Spiegel



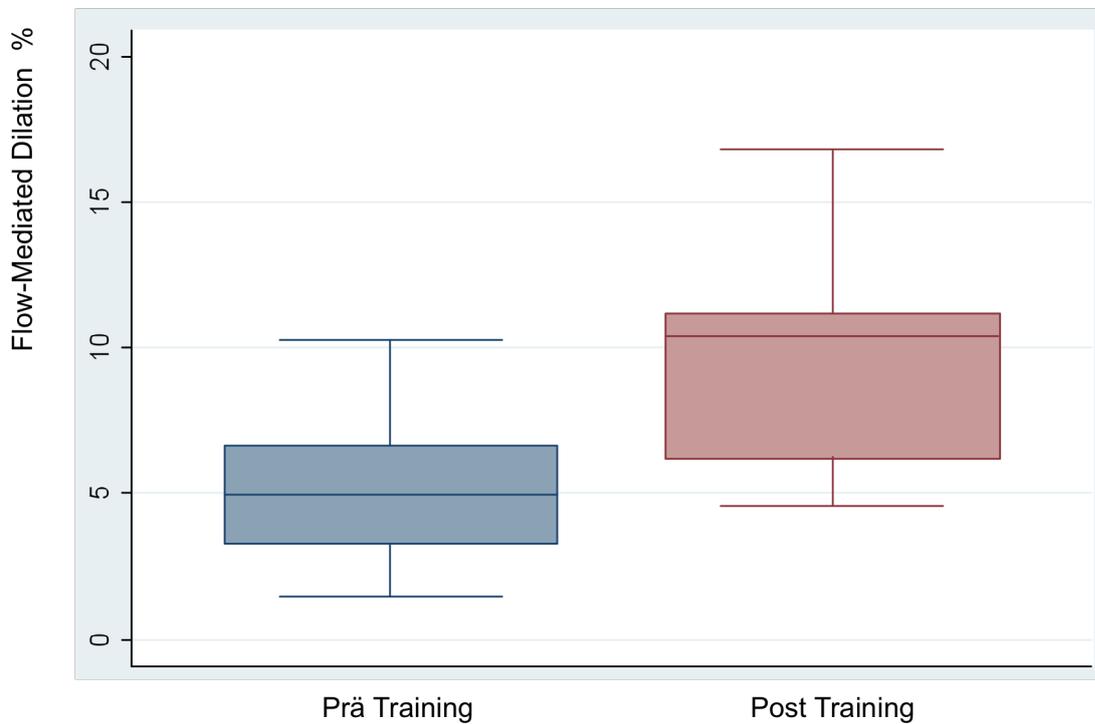
Das hsCRP zeigt nach Ablauf der 3 Monate keine statistisch relevante Änderung. (0,2 [IR: 0,12-0,44] mg/dl vs. 0,09 [IR: 0,08-0,27] mg/dl, $p= 0,2634$)

4.2.2.5 BNP Plasma Spiegel



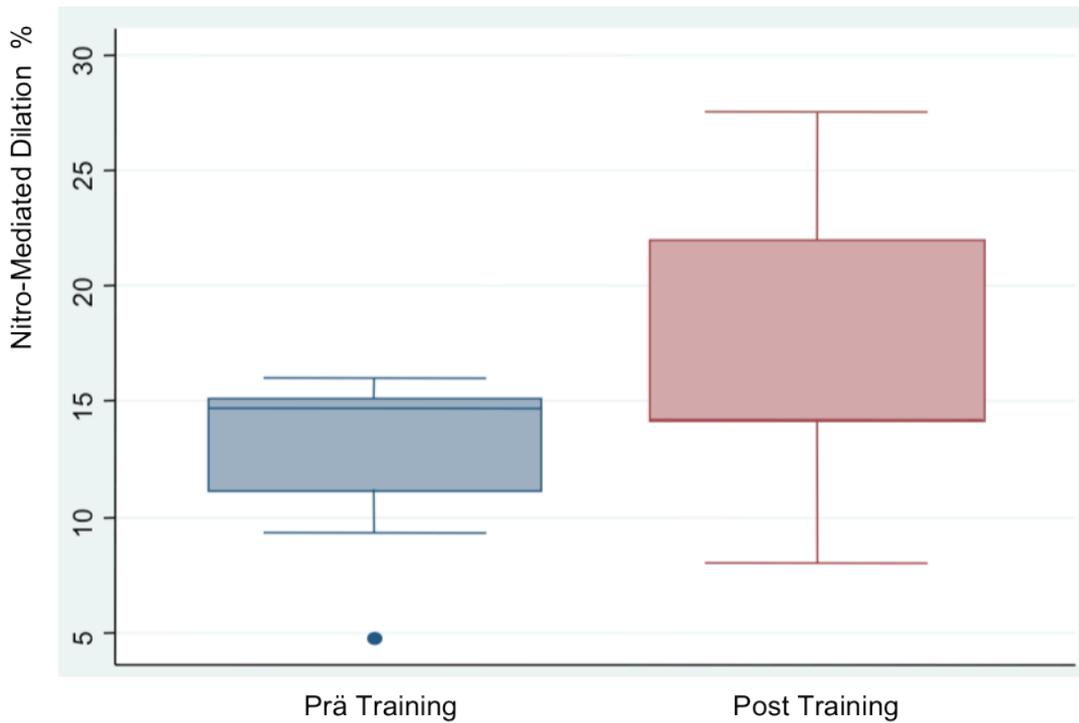
Die BNP Spiegel sanken von 425,8 [IR: 207-977,8] pg/ml auf 66,49 [IR: 36,82-135] pg/ml relativ deutlich aber nicht signifikant. $p= 0,127$.

4.2.2.6 Endothelfunktion (Flussabhängige Dilatation)



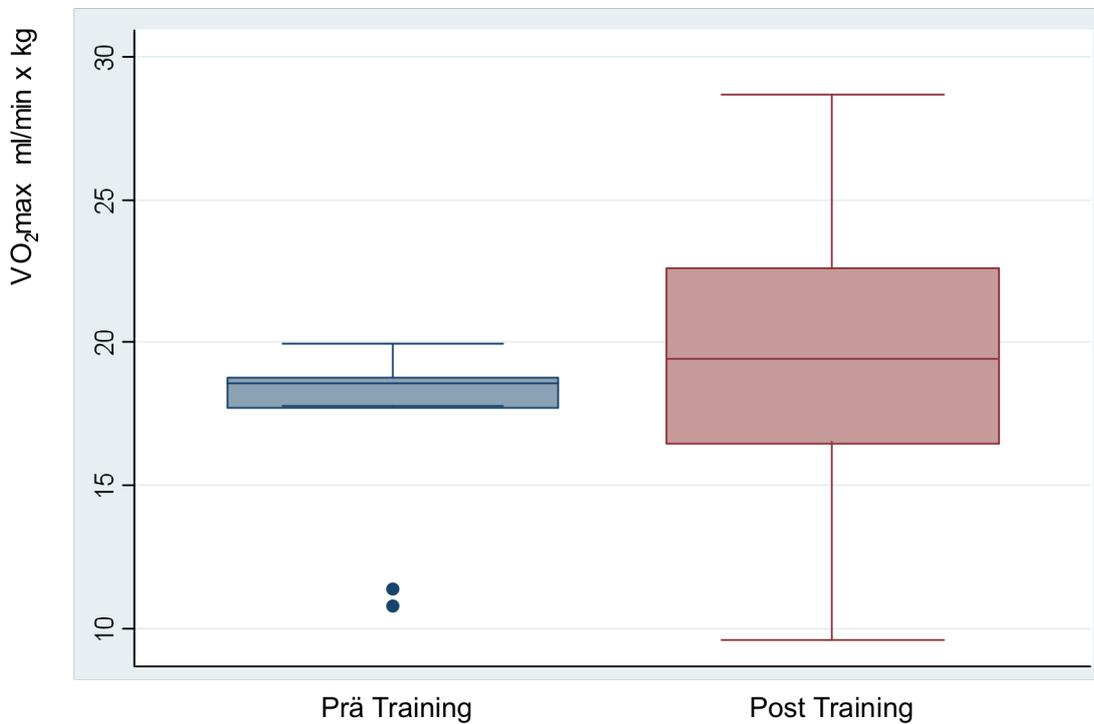
Durch das Training verbesserte sich die Endotheliale Funktion der Patienten von durchschnittlich 4,98 [IR: 3,30-6,65] % auf 10,42 [IR: 6,25-11,19] % und ist somit signifikant besser ($p= 0,0197$).

4.2.2.7 Endothelunabhängige Gefäßdilatation



Die durch Nitrogabe ausgelöste Gefäßdilatation unterschied sich nach der Trainingsphase mit 14,22 [IR: 14,19-21,99] % vs. 14,67 [IR: 11,16-15,11] % nicht, $p = 0,051$.

4.2.2.8 VO₂max



Die Veränderung der körperlichen Belastbarkeit gemessen durch eine Änderung der VO₂max von 18,6 [IR: 17,8-18,75] ml/min x kg auf 19,45 [IR: 16,55-22,6/] ml/min x kg ist statistisch nicht signifikant (p= 0,375). Die durchschnittliche Zunahme entspricht 8,5%.

4.3 Studien an Muskelproben

4.3.1 Western Blot

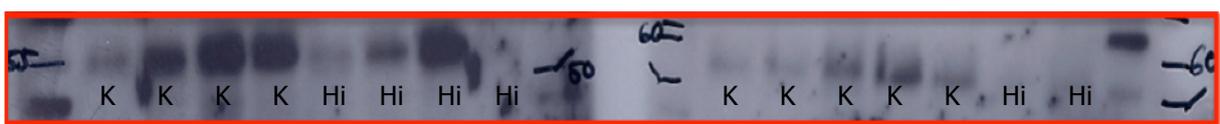
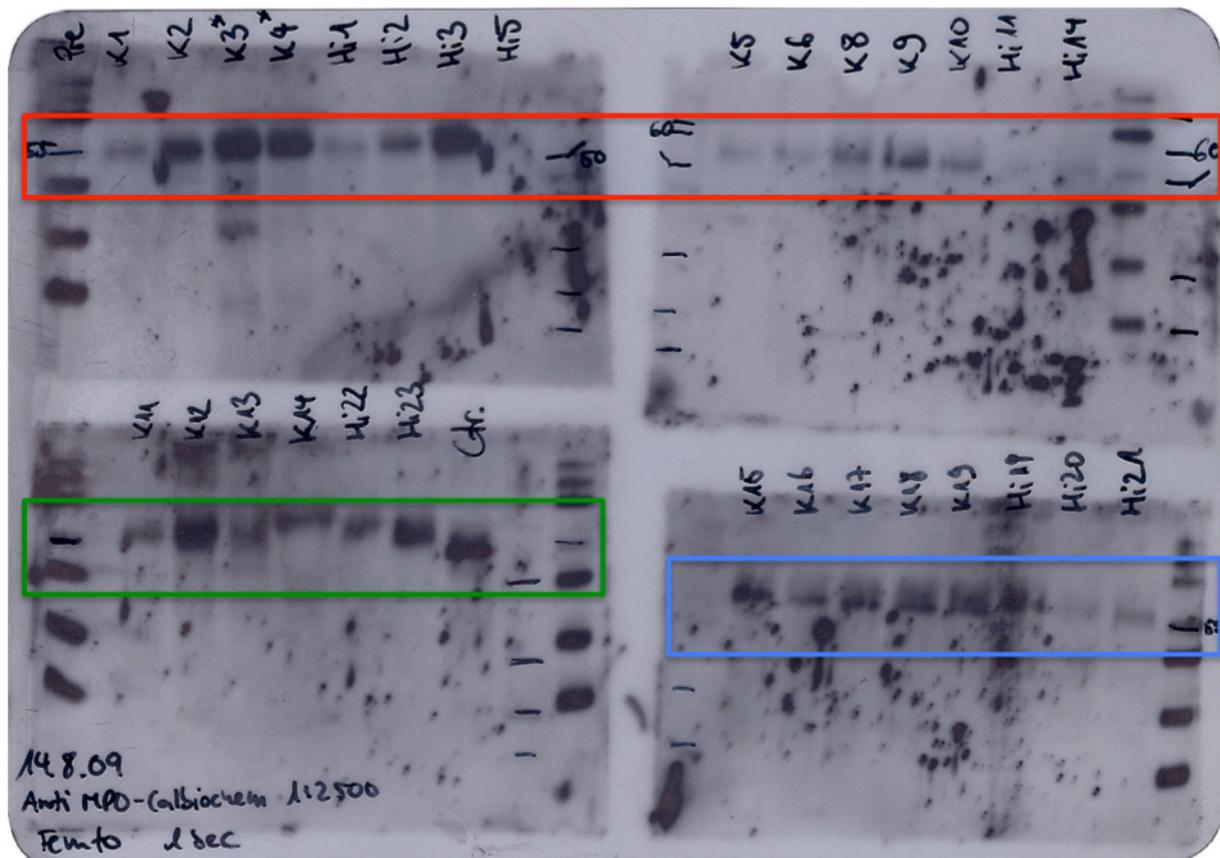


Abbildung 4-1: Western Blot der Immunpräzipitate gegen Myeloperoxidase. „K“ kennzeichnet die Proben aus gesunden Probanden; „Hi“ die der Herzinsuffizienten.

Sichtbar im Western Blot ist die schwere Unterheit der Myeloperoxidase die ein Molekulargewicht von 59 bis 64 kDa hat. Beim Vergleich der Banden aus den Biopsien der gesunden Kontrollen (K1 – K19) mit den Biopsien der herzinsuffizienten

Patienten (Hi1, 2, 3, 5, 11, 14, 19, 20, 21, 22, 23) stellt sich kein Unterschied zwischen den Gruppen dar.

5 Diskussion

Ziel der Studie war in erster Linie die Bedeutung von Myeloperoxidase in der Pathogenese der Herzinsuffizienz genauer zu beleuchten. Wir wollten insbesondere feststellen, ob körperliches Training, welches erwiesenermaßen die Belastbarkeit und Endothelfunktion betroffener Patienten verbessert^{51 52 53 54}, dieses möglicherweise über eine Reduktion der Myeloperoxidase - Spiegel vermittelt. Da es zahlreiche Hinweise gibt, dass die Skelettmuskulatur für die Belastungsfähigkeit von Herzinsuffizienten von großer Bedeutung ist⁴⁸, sollte dieses Gewebe auch auf das Vorhandensein von MPO untersucht werden.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer, durch die Trainingsintervention hervorgerufenen verbesserten Belastbarkeit herzinsuffizienter Patienten und veränderten Myeloperoxidase - Spiegel würde weitere Rückschlüsse auf die Rolle von MPO bei diesem Krankheitsbild erlauben und vielleicht einen Schritt zu besseren Behandlungsmöglichkeiten der Herzinsuffizienz machen.

Der Vergleich der Herzinsuffizienten mit gesunden Kontrollen ergab signifikant höhere MPO Spiegel bei den Herzinsuffizienten (227,1 pmol/l vs. 385,14 pmol/l, $p=0.0039$). Dies deckt sich mit Untersuchungen, die eine Korrelation zwischen zirkulierender Myeloperoxidase und New York Health Association class (NYHA) bzw. BNP und eine Assoziation von MPO und dem Vorhandensein einer Herzinsuffizienz finden konnten⁹⁶. Zudem scheint MPO auch Prognosemarker für das Auftreten und die Mortalität der Herzinsuffizienz zu sein^{97 98 99 100}.

Die Elastase-Werte, die ebenso bei Herzinsuffizienten signifikant höher waren (74,22 ng/ml vs 215 ng/ml, $p=0,0002$), legen nahe, dass der Ursprungsort der zirkulierenden Myeloperoxidase tatsächlich neutrophile Granulozyten sind, da MPO dort zusammen mit Elastase in azurophilen Granula gespeichert und von diesen auch ausgeschüttet wird.

Beim Vergleich der Entzündungsmarker Interleukin 6 und hochsensitivem C-reaktivem Protein (hs CRP) ergab sich zwar eine Tendenz zu höheren Werten bei Herzinsuffizienten, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass die untersuchten Marker relativ unspezifisch sind. Womöglich hätten sich bei größeren Stichproben deutlichere Unterschiede gezeigt, wie es auch andere Gruppen schon beschrieben haben^{10 11}. Unsere Ergebnisse unterstützen trotzdem die These, dass es sich bei der Herzinsuffizienz tatsächlich um ein entzündliches Krankheitsbild handelt.

Da MPO durch seine katalytische Aktivität die NO vermittelte Gefäßdilatation vermindert, erwarteten wir eine schlechtere Endothelfunktion (FMD) bei Herzinsuffizienten im Vergleich zu Gesunden. Dieser Zusammenhang ist schon gut untersucht^{30 31} und konnte von uns auch bestätigt werden: 9,68 % vs. 5,73; $p=0,0001$.

Wie schon eingangs gesagt, gibt es mehrere Untersuchungen, die belegen, dass sich die Endothelfunktion bei Herzinsuffizienz durch körperliches Training verbessern lässt^{51 52 53 54}. Auch wir kamen zu dem gleichen Ergebnis: Die FMD stieg von 4,98 % vor Intervention auf 10,42 % nach zwölfwöchigem Training, $p=0,0197$.

Zusammen mit der schon geschilderten Erkenntnis, dass Myeloperoxidase endotheliales NO oxidiert und inaktiviert und somit die Endothelfunktion stört, formulierten wir die Hypothese, dass im Umkehrschluss die verbesserte FMD durch körperliches Training mit reduzierten Myeloperoxidase Plasmaspiegeln einhergeht. Überraschenderweise kamen wir nicht zu diesem Ergebnis, sondern fanden im Gegenteil tendenziell erhöhte Spiegel von MPO im Plasma (310 pmol/l vs. 295 pmol/l, $p=0,589$). Der Unterschied ist nicht signifikant, was bei der geringen Fallzahl nicht erstaunlich ist, doch werden dadurch trotzdem neue Fragen aufgeworfen. Dieser Befund ist zudem auffällig in Anbetracht der Tatsache, dass sich aus allen anderen Werten, die vor und nach Intervention verglichen wurden eine (wenn auch nicht signifikante) Tendenz zur Verbesserung zeigt: Die Konzentrationen von IL-6 und hsCRP waren vermindert, auch beim BNP zeigte sich ein Trend zu niedrigeren Werten nach Training, was auf eine Verbesserung der kardialen Funktion hindeutet. Die festgestellte Verbesserung der $VO_2\max$ spiegelt die erhöhte Belastbarkeit der Patienten wider und deckt sich mit den Befunden anderer Studien⁴⁹.

Der scheinbare Widerspruch zwischen verbesserter Endothelfunktion und erhöhter Myeloperoxidase-Konzentration könnte bedeuten, dass die Verbesserung der Gefäßfunktion über einen anderen Mechanismus als die Verringerung der NO-Bioverfügbarkeit durch MPO zustande kommt. In diesem Kontext ist es interessant, dass sich die NMD, als die medikamentös hervorgerufene Gefäßdilatation durch sublinguales Nitro-Spray, nach Intervention nicht signifikant verändert hat (14,22 vs. 14,67 %; $p = 0,051$). Die Diskrepanz zwischen deutlich gesteigener FMD im Vergleich zur NMD deutet darauf hin, dass die Verbesserung der Gefäßfunktion mit vermehrter Bioverfügbarkeit von endothelial generiertem NO zusammenhängt.

Es wäre denkbar, dass sich die im Plasma gemessenen Myeloperoxidase - Spiegel stark von denen im Skelettmuskel unterscheiden und sich sogar gegenläufig zueinander verhalten. So könnte das im Blut detektierte zirkulierende MPO durch das Training aus dem Muskel freigesetzt worden sein und in Wirklichkeit mit erniedrigter MPO-Konzentration im subendothelialen Raum der Widerstandsgefäße der Muskulatur einhergehen, welcher womöglich für die Pathophysiologie der Erkrankung wichtig ist. Passend dazu gibt es Hinweise, dass es zumindest bei Gesunden durch körperliche Belastung zu einer Erhöhung von zirkulierenden Neutrophilen Granulozyten und MPO im Blut kommen kann¹⁰¹.

Neben der Untersuchung der peripheren Gefäßfunktion in diesem Kollektiv herzinsuffizienter Patienten sollte darüber hinaus auch die Deposition von MPO im Skelettmuskel untersucht werden. Eine mögliche Theorie zur Bedeutung der durch MPO alterierten Gefäßfunktion ist, dass der Körper in Anbetracht des erniedrigten Herz- Zeitvolumens, auf diesem Wege versucht die Blutversorgung der vital wichtigen Organe, wie Herz, Gehirn und Nieren auf Kosten von vital weniger bedeutenden Organen (in erster Linie der Skelettmuskulatur) zu gewährleisten. Die Skelettmuskulatur könnte in diesem Zusammenhang auch insofern von großer Bedeutung sein, da sie einen großen Teil der Masse des Körpers ausmacht (bei Männern 40 bis 50%, bei Frauen 30 bis 40% der Körpermasse) und zudem eine hohe Gefäßdichte besitzt. An diesen Widerstandsgefäßen könnten sich die Effekte des MPO manifestieren und wären somit ein günstiger Regulator des systemischen Blutdruckes und somit der kardialen Nachlast. Um diesen Mechanismus besser untersuchen zu können wurden Skelettmuskel-Biopsien gewonnen, um zu

untersuchen, ob in den im Muskelgewebe liegenden Gefäßen der Mikrozirkulation, bzw. genauer gesagt im subendothelialen Raum dieser Gefäße, eine Akkumulation von MPO nachzuweisen war. Wir nahmen bei allen Studienteilnehmern zu Beginn ein Biopsat und bei den Patienten der Interventionsgruppe auch nach dem Training eine Probe, um diese auf Unterschiede in der myozytären MPO Deposition untersuchen zu können.

In den immunhistochemischen Analysen ließ sich MPO nicht zuverlässig bzw. nicht in hoher Menge detektieren. Ebenso wenig gelang es uns, die myozytäre MPO-Fraktion mittels Western Blot in Muskelhomogenisaten zu quantifizieren. Dies könnte daran liegen, dass im Muskel keine erhöhten bzw. messbaren MPO-Depositionen vorliegen. Nachdem sich im Western Blot nach Homogenisierung und Proteinbestimmung keine zuverlässigen Nachweise für eine vermehrte Deposition von MPO erbringen ließen, versuchten wir durch Immunpräzipitation die Muskelhomogenate aufzureinigen. Allerdings führte auch das nicht zum sicheren Nachweis von MPO.

Ein Grund für unsere Schwierigkeiten bei der Analyse der Muskelproben könnte die Kontamination von Blut mit dem Muskel sein. Komplette Blutfreiheit ließ sich in den Biopsien nicht erreichen, dies ist möglicherweise entscheidend, da die mit isolierten Leukozyten einen hohen Gehalt an MPO haben, der unter Umständen deutlich höher sein kann, als MPO im subendothelialen Raum. So könnten Unterschiede der Konzentration im subendothelialen Raum durch die höheren Werte der leukozytären MPO kompensiert werden.

Eine weitere Schwierigkeit der Studie bestand darin, dass aufgrund der strengen Ausschlusskriterien für die Teilnahme der Herzinsuffizienten an der Studie nur kleine Probandenzahlen zustande kamen. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass keine Antikoagulanzen und Thrombozytenaggregationshemmer eingenommen werden durften, da diese das Blutungsrisiko bei der Biopsieentnahmen erhöht hätten, aber wegen erhöhtem Thrombose bzw. Infarkt Risiko auch nicht hätten pausiert werden dürfen. Somit schieden alle Patienten mit ischämischer Genese der Herzinsuffizienz aus. Bei geforderter linksventrikulärer Ejektionsfraktion von unter 35% war der Anteil der verbliebenen Patienten, die aufgrund von z.B. Vorhofflimmern oder echokardiographisch nachgewiesenem

„Sludge“ marcumarisiert wurden, so beträchtlich, dass nur noch wenige für unsere Studie in Frage kamen. Die nötige Bereitschaft und Fähigkeit dazu noch ein zwölfwöchiges Training konsequent durchzuhalten verringerte die Zahl zusätzlich. Mehrere der Patienten, die ausnahmslos in der Herzinsuffizienzambulanz des Universitären Herzzentrums Hamburg rekrutiert wurden, hatten weite Anfahrtswege, welches dann auch logistisch ein Problem war, da das Training nur unter unserer Aufsicht auf dem Gelände des Uniklinikums Eppendorf durchgeführt werden sollte. Somit hat unsere Studie besonders im Hinblick auf den Vergleich vor vs. nach Intervention eine geringe statistische Power, weil bei kleinen Stichproben der Unterschied der einzelnen Parameter groß hätte sein müssen um statistisch signifikant zu werden.

5.1 Limitationen

Die von uns gezeigten Unterschiede zwischen Gesunden und Erkrankten legen den Schluss nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen MPO, Herzinsuffizienz und Endothelfunktion gibt. Die Ergebnisse zeigen jedoch nur eine Korrelation, Aussagen über Kausalität sind auf deren Grundlage nicht möglich. Obwohl es mittlerweile zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Myeloperoxidase, Inflammation und Herzinsuffizienz gibt^{81 82 83 84 85 86 87}, ist die Frage danach, wie genau Inflammation durch Herzinsuffizienz ausgelöst wird, bzw. ob Inflammation Herzinsuffizienz (mit-)bedingt, noch nicht geklärt und bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

Von den Patienten, die nicht an der Intervention teilnahmen, wurden keine Follow-up- Untersuchungen durchgeführt; so lassen sich die Postinterventionswerte der Patienten, die an dem Training teilnahmen, nur unter der Annahme interpretieren, dass die einzelnen Parameter innerhalb von 3 Monaten weitestgehend konstant bleiben. Eine mögliche Veränderung der Spiegel im Rahmen des Progress der Erkrankung konnte nicht berücksichtigt werden.

5.2 Ausblick

Es erscheint sinnvoll der Fragestellung, wie weit und auf welchen Wegen Myeloperoxidase an der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz beteiligt ist, weiter nachzugehen. Obwohl wir bis jetzt keine Unterschiede zwischen den Kollektiven bei der Auswertung der Proben aus der Skelettmuskulatur feststellen konnten, erachten wir die weitere Verfolgung dieser Fährte als vielversprechend. Einiges spricht dafür, dass die peripheren Gewebe, allen voran die Muskulatur, als Schauplatz von Gefäßdysfunktion -und somit systemischer Nachlasterhöhung- und vermehrter Entzündungsreaktion, eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz spielen. Bessere, möglichst nicht invasive Nachweismethoden von MPO, die Bestimmung immobilisierter MPO in der Mikrozirkulation mittels moderner Bildgebung und nicht zuletzt Untersuchungen zur Assoziation genetischer Determinanten für die MPO Expression und dessen Effekt auf die Inzidenz von Herzinsuffizienz sollten zukünftige Projekte sein, die Bedeutung dieses Enzyms für die Entstehung und den Progress der Herzinsuffizienz zu charakterisieren.

6 Zusammenfassung

In jüngster Zeit wurde chronischer Entzündung und der damit verbundenen Aktivierung von Leukozyten eine immer größere Rolle bei der Pathogenese kardialer Erkrankungen beigemessen.

Myeloperoxidase, ein Protein, welches aus aktivierten neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird, beeinflusst über NO Degradation die Endothelfunktion. Seine Bedeutung bei der koronaren Herzkrankheit ist gut untersucht. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und Myeloperoxidase bereits bewiesen werden.

Wir haben in dieser Studie Blut und Muskelproben von Gesunden und Herzinsuffizienten auf Myeloperoxidase untersucht und konnten im Plasma bei Herzinsuffizienz signifikant höhere MPO - Spiegel feststellen. Auch der Unterschied der gemessenen Endothelfunktion in diesen beiden Gruppen war signifikant. Einen Teil der Herzinsuffizienten haben wir einem körperlichen Training zugeführt, zum Einen, um zu untersuchen, ob eine durch das Training vermittelte Verbesserung der Herzinsuffizienz mit erniedrigten MPO - Spiegeln einhergeht und zum Anderen, um die Bedeutung der Skelettmuskulatur, als möglicherweise wesentliches Organ der Regulation des systemischen Widerstands, besser beleuchten zu können. Anhand der aus diesem Experiment gewonnen Daten ließ sich kein eindeutiger Einfluss von körperlichem Training auf die Myeloperoxidase - Plasmaspiegel bzw. auf die lokale skelettmuskuläre Deposition von MPO bei Herzinsuffizienten feststellen.

Diese Arbeit kann die Frage, welche Rolle die Skelettmuskulatur bei der durch Myeloperoxidase vermittelten Nachlasterhöhung bei Herzinsuffizienz spielt, nicht beantworten.

7 Literaturverzeichnis

-
- ¹ Cowie, M. R., Wood, D. A., Coats, A. J., Thompson, S. G., Poole-Wilson, P. A., Suresh, V., et al. (1999). Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J*, 20(6), 421-8.
- ² McMurray, J. J., & Stewart, S. (2000). Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart*, 83(5), 596-602
- ³ Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, et al. The epidemiology of heart failure: The Framingham study. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:6A-13A.
- ⁴ Owan, T E, D O Hodge, R M Herges, S J Jacobsen, V L Roger, and M M Redfield. 2006. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction.
- ⁵ Felker, G.M., et al., Underl Modena, M.G., et al., Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am Heart J*, 2001. 141(1): p. 41-6. *Engl J Med*, 2000. 342(15): p. 1077-84.
- ⁶ Modena, M.G., et al., Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am Heart J*, 2001. 141(1): p. 41-6.
- ⁷ Lympelopoulos, Anastasios, Giuseppe Rengo, and Walter J Koch. 2007. Adrenal adrenoceptors in heart failure: Fine-Tuning cardiac stimulation. *Trends Mol Med* 13 (12): 503-11.
- ⁸ Cohn, J N, T B Levine, M T Olivari, V Garberg, D Lura, G S Francis, A B Simon, and T Rector. 1984. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311 (13): 819-23.
- ⁹ Patella, V, I Marinò, E Arbustini, B Lamparter-Schummert, L Verga, M Adt, and G Marone. 1998. Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 97 (10): 971-8.
- ¹⁰ Torre-Amione, G., S. Kapadia, et al. 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*, v.27, n.5, Apr, p.1201-6. 1996.
- ¹¹ Mann DL. Inflammatory Mediators and the Failing Heart: Past, Present, and the Foreseeable Future. *Circ Res*. 2002;91:988–998.
- ¹² Munger, M.A., et al., Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 1996. 77(9): p. 723-7.
- ¹³ Brasier, A R, M Jamaluddin, Y Han, C Patterson, and M S Runge. 2000. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (nf-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 212 (1-2): 155-69.
- ¹⁴ Bozkurt B, Kribbs S, Clubb FJ Jr, et al. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- promote progressive left ven- tricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*. 1998;97: 1382–1391.

-
- ¹⁵ Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res*. 1997;81:627–635.
- ¹⁶ Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer K, et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation*. 2001;2001:826–831.
- ¹⁷ Anker SD, Volterrani M, Egerer KR, Felton CV, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJS. TNF- α as predictor of peak leg blood flow on chronic heart failure. *QJ Med*. 1998;91:199-203.
- ¹⁸ Packer M, Chung E, Batra S, Lo KH, Kereiakes DJ, Willerson JT. Randomized placebo-controlled dose-ranging trial of infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor- α , in moderate to severe heart failure. Paper presented at: Annual Meeting of Heart Failure Society of America; September 25, 2002; Boca Raton; Fla.
- ¹⁹ Giordano F J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005. 115500–508.508.
- ²⁰ Berry C E, Hare J M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004. 555589–606.606
- ²¹ Verhaar M C, Westerweel P E, van Zonneveld A J. et al Free radical production by dysfunctional eNOS. *Heart* 2004. 90494–495.495.
- ²² Cave A C, Grieve D J, Johar S. et al NADPH oxidase derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos Trans R Soc* 2005. 3602327–2334.2334.
- ²³ Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S. et al Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 2001. 88529–535.535.
- ²⁴ Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res* 1998;82:482-495
- ²⁵ Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98:2572-2579
- ²⁶ Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J, et al. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation* 2001;104:134-136
- ²⁷ Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* 1990;81:518-527
- ²⁸ Celermajer, D.S., Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*, 1997. 30(2): p. 325-33.
- ²⁹ Forslund, T., H.M. Nilsson, and T. Sundqvist, Nitric oxide regulates the aggregation of stimulated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 274(2): p. 482-7.
- ³⁰ Katz SD, Biasucci L, Sabba C, Strom JA, Jondeau G, Galvao M, Solomon S, Nikolic SD, Forman R, LeJemtel TH. Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:918 –925.
- ³¹ Treasure CB, Vita JA, Cox DA, Fish RD, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, Sutton MGSJ, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P. Endothelium- dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1990;81:772–779.

-
- ³² Katz SD, Khan T, Zeballos GA, Mathew L, Potharlanka P, Knecht M, Whelan J. Decreased activity of the L-arginine–nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1999;99: 2113–2117.
- ³³ Bauersachs J, Bouloumie A, Fracarrolo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*. 1999;100:292–298.
- ³⁴ Katz SD, Krum H, Khan T, Knecht M. Exercise-induced vasodilation in forearm circulation of normal subjects and patients with congestive heart failure: role of endothelium-derived nitric oxide. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:585–590.
- ³⁵ Nakamura M, Ishikawa M, Funakoshi T, Hashimoto K, Chiba M, Hiramori K. Attenuated endothelium-dependent peripheral vasodilation and clinical characteristics in patients with chronic heart failure. *Am Heart J*. 1994;128:1164 –1169.
- ³⁶ Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, et al. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2005;111(3):310–314.
- ³⁷ Vantura-Clapier R, De Sousa E, Veksler V. Metabolic myopathy in HF. *N Physiol Sci*. 2002;17:191–196.
- ³⁸ Duscha B, Schulze PC, Robbins JL, Forman DE. Implications of chronic HF on peripheral vasculature and skeletal muscle before and after exercise training. *Heart Fail Rev*. 2008;13:21–37.
- ³⁹ Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in HF. *Circulation*. 1992;85: 1364–1373.
- ⁴⁰ Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic HF. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30: 1758–1764.
- ⁴¹ Schaufelberger M, Eriksson BO, Grimby G, Held P, Swedberg K. Skeletal muscle alterations in patients with chronic HF. *Eur Heart J*. 1997;18:971–980.
- ⁴² Duscha BD, Kraus WE, Keteyian SJ, Sullivan MJ, Green HJ, Schachat FH, Phippen AM, Brawner CA, Blank JM, Annex BH. Capillary density of skeletal muscle: a contributing mechanism for exercise intolerance in class II-III chronic HF independent of other peripheral alterations. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:1956 –1963.
- ⁴³ Libera LD, Sabbadini R, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, Angelini A, Vescovo G. Apoptosis in the skeletal muscle of rats with HF is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1871–1878.
- ⁴⁴ Larsen AI, Lindal S, Aukrust P, Toft I, Aarsland T, Dickstein K. Effect of exercise training on skeletal muscle fibre characteristics in men with chronic HF: correlation between skeletal muscle alterations, cytokines and exercise capacity. *Int J Cardiol*. 2002;83:25–32.
- ⁴⁵ Adams V, Jiang H, Yu J, Mobius-Winkler S, Fiehn E, Linke A, Weigl C, Schuler G, Hambrecht R. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic HF is associated with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:959 –965.
- ⁴⁶ Wilson et al. 1995 Dissociation between exertional symptoms and circulatory function in patients with heart failure. *Circulation* 92: 47-53.

-
- ⁴⁷ Clark et al. Exercise limitation in chronic heart failure: the central role of the periphery. *J Am Coll Cardiol* 1997; 28:1092-102.
- ⁴⁸ Coats et al. Symptoms and quality of life in heart failure: The muscle hypothesis. *Br Heart J* 1994; 72: S36-9.
- ⁴⁹ Nishi I, Noguchi T, Iwanaga Y, Furuichi S, Aihara N, Takaki H, et al. Effects of exercise training in patients with chronic heart failure and advanced left ventricular systolic dysfunction receiving β -blockers. *Circ J* 2011; 75: 1649 – 1655.
- ⁵⁰ Coats et al. Effects of physical training in chronic heart failure. *Lancet* 1990; 335: 63-6.
- ⁵¹ Horning et al. Physical training improves endothelial function with chronic heart failure. *Circulation* 1996; 93: 210-4.
- ⁵² Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; 98: 2709 – 2715.
- ⁵³ Hambrecht R, Gielen S, Linke A, Fiehn E, Yu J, Walther C, et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA* 2000; 283: 3095 – 3101.
- ⁵⁴ Hornig B, Maier V, Drexler H. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1996; 93: 210 – 214.
- ⁵⁵ Katz SD, Yuen J, Bijou R, LeJemtel TH. Training improves endothelium-dependent vasodilation in resistance vessels of patients with heart failure. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1488 – 1492.
- ⁵⁶ Linke A, Schoene N, Gielen S, Hofer J, Erbs S, Schuler G, et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Systemic effects of lower-limb exercise training. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 392 – 397.
- ⁵⁷ Hunt SA. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: e1 – e82.
- ⁵⁸ Li, H. and U. Forstermann, Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*, 2000. 190(3): p. 244-54.
- ⁵⁹ Szmítko, P.E., et al., New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*, 2003. 108(16): p. 1917-23.
- ⁶⁰ Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(11): p. 4651-5.
- ⁶¹ Davenpeck, K.L., T.W. Gauthier, and A.M. Lefer, Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology*, 1994. 107(4): p. 1050-8.
- ⁶² Zeiher, A.M., et al., Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 1991. 83(2): p. 391-401.

-
- ⁶³ Yudkin, J.S., et al., C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(4): p. 972-8.
- ⁶⁴ Suwaidi, J.A., et al., Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*, 2000. 101(9): p. 948-54.
- ⁶⁵ Heitzer, T., et al., Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(6): p. 1174-9.
- ⁶⁶ Brennan, M.L. and S.L. Hazen, Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Curr Opin Lipidol*, 2003. 14(4): p. 353-9.
- ⁶⁷ Baldus, S., et al., Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2003. 108(12): p. 1440-5.
- ⁶⁸ Mollnau, H., et al., Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(4): p. 615-21.
- ⁶⁹ Eiserich, J P, S Baldus, M L Brennan, W Ma, C Zhang, A Tousson, L Castro, et al. 2002. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 296 (5577): 2391-4.
- ⁷⁰ Klebanoff, S.J. (1999) Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 5: 383-9.
- ⁷¹ Nauseef, W.M. (1998) Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *J Mol Med*. 10: 661-8.
- ⁷² Winterbourn, C.C., M.C. Vissers, and A.J. Kettle. (2000) Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*. 1: 53-8.
- ⁷³ Akin, D.T. and J.M. Kinkade. (1986) Processing of a newly identified intermediate of human myeloperoxidase in isolated granules occurs at neutral pH. *J Biol Chem*. 8370-5.
- ⁷⁴ Koeffler, H.P., J. Ranyard, and M. Pertcheck. (1985) Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood*. 484-91.
- ⁷⁵ Zeng, J. and R.E. Fenna. (1992) X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol*. 185-207.
- ⁷⁶ Everse, J. (1998) The structure of heme proteins Compounds I and II: some misconceptions. *Free Radic Biol Med*. 7-8: 1338-46.
- ⁷⁷ Eiserich, J.P., M. Hristova, C.E. Cross et al. (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 6665: 393-7.
- ⁷⁸ Abu-Soud, H.M. and S.L. Hazen. (2000) Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem*. 48: 37524-32.
- ⁷⁹ Schmitt, D., Z. Shen, R. Zhang et al. (1999) Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry*. 51: 16904-15.
- ⁸⁰ Baldus, S., J.P. Eiserich, M.L. Brennan et al. (2002) Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*. 7: 1010.

-
- ⁸¹ Askari, A. T.; Brennan, M. L.; Zhou, X.; Drinko, J.; Morehead, A.; Thomas, J. D.; Topol, E. J.; Hazen, S. L.; Penn, M. S. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J. Exp. Med.* 197:615–624; 2003.
- ⁸² Heymans, S.; Lutun, A.; Nuyens, D.; Theilmeier, G.; Creemers, E.; Moons, L.; Dyspersin, G. D.; Cleutjens, J. P.; Shipley, M.; Angellilo, A.; Levi, M.; Nube, O.; Baker, A.; Keshet, E.; Lupu, F.; Herbert, J. M.; Smits, J. F.; Shapiro, S. D.; Baes, M.; Borgers, M.; Collen, D.; Daemen, M. J.; Carmeliet, P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat. Med.* 5:1135–1142; 1999.
- ⁸³ Vasilyev, N.; Williams, T.; Brennan, M. L.; Unzek, S.; Zhou, X.; Heinecke, J. W.; Spitz, D. R.; Topol, E. J.; Hazen, S. L.; Penn, M. S. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* 112: 2812–2820; 2005.
- ⁸⁴ Baldus, S.; Koster, R.; Chumley, P.; Heitzer, T.; Rudolph, V.; Ostad, M. A.; Warnholtz, A.; Staude, H. J.; Thuneke, F.; Koss, K.; Berger, J.; Meinertz, T.; Freeman, B. A.; Munzel, T. Oxypurinol improves coronary and peripheral endothelial function in patients with coronary artery disease. *Free Radic. Biol. Med.* 39:1184–1190; 2005.
- ⁸⁵ Baldus, S.; Mullerleile, K.; Chumley, P.; Steven, D.; Rudolph, V.; Lund, G. K.; Staude, H. J.; Stork, A.; Koster, R.; Kahler, J.; Weiss, C.; Munzel, T.; Meinertz, T.; Freeman, B. A.; Heitzer, T. Inhibition of xanthine oxidase improves myocardial contractility in patients with ischemic cardiomyopathy. *Free Radic. Biol. Med.* 41:1282–1288; 2006.
- ⁸⁶ Bauersachs, J.; Schafer, A. Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2: 115–124; 2004.
- ⁸⁷ Rudolph V., Rudolph T. K., Hennings J. C., Blankenberg S., Schnabel R., Steven D., Haddad M., Knittel K., Wende S., Wenzel J., Munzel T., Heitzer T., Meinertz T., Hübner C., Baldus S. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 1189–1196; 2007.
- ⁸⁸ Gaethgens, P., *Das Kreislaufsystem*, in *Lehrbuch der Physiologie*, R. Klinke and S. Silbernagl, Editors. 2001, Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York.
- ⁸⁹ McVeigh, G.E., G.M. Brennan, G.D. Johnston et al. (1992) Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 8: 771-6.
- ⁹⁰ Vita, J.A., C.B. Treasure, E.G. Nabel et al. (1990) Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 2: 491-7.
- ⁹¹ Zeiher, A.M., V. Schachinger, and J. Minners. (1995) Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation.* 5: 1094-10
- ⁹² Corretti, M.C., T.J. Anderson, E.J. Benjamin et al. (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2: 257-65.
- ⁹³ Corretti, M.C., G.D. Plotnick, and R.A. Vogel. (1995) Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol.* 4 Pt 2: H1397-404.
- ⁹⁴ Uehata, A., E.H. Lieberman, M.D. Gerhard et al. (1997) Noninvasive assessment of endothelium-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery. *Vasc Med.* 2: 87-92.

-
- ⁹⁵ J. P. Eiserich, M. Hristova, C. E. Cross, A. D. Jones, B. A. Freeman, B. Halliwell, and A. van der Vliet. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, 391(6665):393–397, 1998.
- ⁹⁶ Tang WH, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, Hazen SL. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2006;98:796–799. [PubMed: 16950188]
- ⁹⁷ Heitzer T, Baldus S, von Kodolitsch Y, Rudolph V, Meinertz T. Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1174–9.
- ⁹⁸ Tang WH, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, et al. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;49: 2364 –70.
- ⁹⁹ Tang WH, Katz R, Brennan ML, Aviles RJ, Tracy RP, Psaty BM, Hazen SL. Usefulness of myeloperoxidase levels in healthy elderly subjects to predict risk of developing heart failure. *Am J Cardiol* 2009;103:1269–74.
- ¹⁰⁰ Reichlin T, Socrates T, Egli P, Potocki M, Breidthardt T, Arenja N, et al. Use of myeloperoxidase for risk stratification in acute heart failure. *Clin Chem* 2010;56:944 –51.
- ¹⁰¹ The relationship between maximal exercise-induced increases in serum IL-6, MPO and MMP-9 concentrations. Reihmane D, Jurka A, Tretjakovs P. *Scand J Immunol*. 2012 May 17. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02720.

8 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
ASS	Acetylsalicylsäure
BNP	Brain Natriuretic Peptide
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid-Anion
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
ECL	Enhanced-chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunoassay
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FMD	Fluss-abhängige Vasodilatation
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Wasserstoff-Kation
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorit
hsCRP	Hochsensitives C-reaktives Protein
IU	Internationale Einheiten
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IL	Interleukin
IR	Interquartilsabstand
LV	linksventrikulär
LV-EF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
kgKG	Kilogramm-Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
MMPs	Metalloproteinasen
MPO	Myeloperoxidase
NMD	Nitroglyzerin-abhängige Vasodilatation
NO	Stickstoffmonoxid

NO ₂	Stickstoffdioxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₂ Tyr	Nitrotyrosin
NYHA	New York Health Association
O ₂ ⁻	Superoxid
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PMN	Neutrophilen Granulozyten
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
TEE	Transösophageale Echokardiographie
TNF-alpha	Tumornekrose Faktor- alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amniomethan
TTE	Transthorakale Echokardiographie
VO ₂ max	Maximale Sauerstoffaufnahme

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan Blankenberg dafür, dass er mir eine Dissertation in seiner Abteilung ermöglichte.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Stephan Baldus für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für die enthusiastische Betreuung, seine allzeit gewährte Unterstützung und für seine nicht endende und ansteckende Motivation.

Dr. Dorit Knappe danke ich für ihre engagierte Betreuung, ihre guten Ideen und vor allem dafür, dass sie mir über die gesamte Zeit und bei allen Schwierigkeiten immer hilfsbereit zur Seite stand.

Hartwig Wieboldt, Dr. Denise Lau und Dr. Anna Klinke möchte ich für die Geduld, die Hilfsbereitschaft, die tolle Zusammenarbeit und nicht zuletzt für die gute Stimmung im Labor danken.

Großer Dank gilt den zahlreichen Mitarbeitern des Universitären Herzzentrums, die diese Arbeit unterstützt haben. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Dr. Jens Brickwedel, Dr. Johannes Schirmer, Dr. Constantin Trepte und Dr. Dincer Aktürk für die Durchführung der Muskelbiopsien und Dr. Matti Adam, Dr. Loant Baholli und Dr. Sven Meyer für die Unterstützung bei der Rekrutierung und Betreuung der Patienten.

Bei meiner Mutter, Claudia Runte, möchte ich mich für ihr Verständnis, ihre Kraft und Liebe bedanken, die mich all die Jahre begleitet haben.

Spezieller Dank gilt meiner Lebensgefährtin Dr. Henriette Javorek, für die tatkräftige Unterstützung, die guten Ratschläge und vor allem für die andauernde Entlastung, die mir das Abschließen der Dissertation erst möglich machte.

Ich bedanke mich bei Rainer Risse und Christian Radermacher für das Lesen der Arbeit und die wertvollen Anregungen.

10 Lebenslauf

10.1 Persönliche Daten

Name: Hendrik Runte
Geburtsdatum: 24.03.1983
Geburtsort: Hagen (NRW)

10.2 Schulausbildung

1989 -1993 Grundschule Bömberg, Iserlohn
1993 -2002 Gymnasium an der Stenner, Iserlohn
1999 -2000 Rotary Youth Exchange nach Newcastle, Australien
2002 Abitur

10.3 Zivildienst

2002 -2003 Arbeit als Erzieher bei „Nuestros Pequeños Hermanos“, einem Straßen- /
Waisenkinderprojekt auf der Isla de Ometepe in Nicaragua

10.4 Hochschulausbildung

2003 -2010 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08/2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (nach alter ÄAppO)
11/2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (nach neuer ÄAppO)

10.4.1 Famulaturen

01/2007 – 02/2007 Dr. Le Metayer, Klinik für Kardiologie, Hôpital St André, Bordeaux, Frankreich
02/2007 – 03/2007 Prof. Dr. Ragnaud, Innere Medizin, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, Frankreich
08/2007 – 09/2007 Dr. Fritsch, Gemeinschaftspraxis für Chirurgie, Iserlohn
04/2008 – 05/2008 Prof. Dr. Willems, Klinik Für Kardiologie, Universitäres Herzzentrum Hamburg

10.4.2 Praktisches Jahr

08/2009 – 12/2009 Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
12/2009 – 03/2010 Zentrum für Operative Medizin, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
03/2010 – 07/2010 Klinik für Anästhesiologie, Marienkrankenhaus Hamburg

10.5 Berufliche Tätigkeit

Seit 2011 Assistenzarzt in Weiterbildung, Klinik für Anästhesiologie, Marienkrankenhaus
Hamburg

11 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.
