

Aus der Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin
- Direktor: Prof. Dr. med. N. Frey -
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**HYPERTROPHE KARDIOMYOPATHIE UND DER BIOMARKER OSTEOPONTIN:
KORRELATION MIT KLINISCH-DIAGNOSTISCHEN PARAMETERN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Sylvia Swierzewska
aus **Wuppertal**

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Langer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Mark Ellrichmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.04.2019

Gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)	1
1.1.1 Einführung – Definition, Genetik, Symptomatik und Therapie.....	1
1.1.2 Diagnostische Verfahren der HCM.....	2
1.2 Biologische Marker	4
1.2.1 Definition und Anwendungsgebiete.....	4
1.2.2 Biologische Marker bei HCM.....	4
1.3 Osteopontin.....	5
1.3.1 Definition, Struktur, Vorkommen und Einsatz als Biomarker.....	5
1.3.2 Potentieller Einfluss von Osteopontin auf HCM	7
1.4 Zielsetzung	9
2 Methoden	10
2.1 Studiendesign und Patientenkollektiv	10
2.2 Datenerhebung.....	11
2.3 Technische Untersuchungen.....	11
2.3.1 Transthorakale Echokardiographie (TTE)	11
2.3.2 Blutprobenanalyse.....	13
2.3.2.1 Blutprobengewinnung und -aufbewahrung	13
2.3.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	14
2.3.2.3 Auswertung der Plasmaproben.....	15
2.4 Erhobene Parameter.....	20
2.4.1 Biometrische Parameter	20
2.4.2 Risikostratifizierung bei HCM.....	20
2.4.3 NYHA Klassifikation und Stadieneinteilung.....	21
2.4.4 Vorhofflimmern	21
2.4.5 Echokardiographie-basierte Befunde	21

2.4.6 Osteopontinwert	22
2.5 Statistische Analyse	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs	24
3.2 Biometrische Parameter	24
3.3 Risikostratifizierung bei HCM	26
3.4 NYHA-Stadium und Vorhofflimmern	29
3.5 Echokardiographisch erhobene Befunde	31
3.5.1 Linksatrialer Diameter	31
3.5.2 LVEF	31
3.5.3 IVSd	32
3.5.4 LVEDD	32
3.5.5 LVPWd	32
3.5.6 LVMM und der Vergleich zum Normbereich	32
3.5.7 RWT	33
3.5.8 Maximale Wanddicke und Summe der LV-Dicke	33
3.5.9 LVOTG in Ruhe und unter Provokation	34
4 Diskussion	36
4.1 Tragweite der Zielsetzung	36
4.2 Ergebnisse	36
4.2.1 Biometrische Parameter	37
4.2.2 Risikostratifizierung	38
4.2.3 Vorhofflimmern und NYHA-Stadium	40
4.2.4 Echokardiographie-basierte Befunde	42
4.3 Plasmaproben	44
4.4 Limitationen der Studie	47
4.5 Ansatzpunkte für die Zukunft	48

5 Zusammenfassung	50
6 Literaturverzeichnis	52
7 Anhang.....	64
8 Danksagung	72

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Struktur von Osteopontin	6
Abb. 2 Aminosäuresequenz von Osteopontin	7
Abb. 3 2D-Bilder einer TTE bei HCM	12
Abb. 4 cw-Doppler bei HCM	13
Abb. 5 Solid phase double-antibody sandwich ELISA	14
Abb. 6 Bindungsstellen der spezifischen Antikörper innerhalb der OPN-Aminosäuresequenz	16
Abb. 7 ELISA anhand des Human Osteopontin Assay Kit (L) – IBL	16
Abb. 8 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht	25
Abb. 9 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlichem Patientenalter	25
Abb. 10 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlichem BMI	26
Abb. 11 Osteopontinplasmaspiegel bei einer positiven bzw. unauffälligen Familienanamnese	27
Abb. 12 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlicher Septumdicke	28
Abb. 13 Osteopontinplasmaspiegel bei variierender Anzahl von Risikofaktoren	28
Abb. 14 Osteopontinplasmaspiegel mit Bezug auf geringe vs. erhöhte NYHA-Stadien	29
Abb. 15 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von VHF	30
Abb. 16 Osteopontinplasmaspiegel mit Bezug auf die Art des VHF	30
Abb. 17 Osteopontinplasmaspiegel in Bezug auf LVEF	31
Abb. 18 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlicher LVMM	33
Abb. 19 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlichem LVOTG in Ruhe (mmHg)	35
Abb. 20 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlichem LVOTG u. Provokation (mmHg)	35

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Inhalt des Kits	17
Tab. 2 NYHA-Stadien modifiziert nach Leitlinien Herzinsuffizienz	64
Tab. 3 NYHA-Stadium anhand der gestiegenen Etagenanzahl	64
Tab. 4 Zusammenfassung studienrelevanter Parameter	66
Tab. 5 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht, Alter und BMI...67	
Tab. 6 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit vom systolischen und diastolischen RR.....	67
Tab. 7 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von der familiären Disposition für PHT, einem Blutdruckabfall unter Belastung und der Septumdicke.	68
Tab. 8 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von nsVTs und Synkopen in der Vorgeschichte.	68
Tab. 9 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von Risikofaktoren insgesamt.	69
Tab. 10 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von der NYHA-Stratifizierung und VHF zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme.	69
Tab. 11 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von LAD, LVEF, IVSd und LVEDD.....	70
Tab. 12 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von LVPWd, LVMM, normaler LVMM und RWT.....	70
Tab. 13 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von max. Wanddicke, Summe der LV Dicke, LVOTG in Ruhe und unter Provokation.	71

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Ang II	Angiotensin II
Biomarker	biologischer Marker
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Rinderalbumin
CMR	kardiale Magnetresonanztomographie
cw-Doppler	continuous wave-Doppler
DCM	dilatative Kardiomyopathie
Echobefunde	echokardiographische Befunde
EDV	enddiastolisches Volumen
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESC	European Society of Cardiology
ESV	endsystolisches Volumen
EZM	extrazelluläre Matrix
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HFpEF	heart failure with preserved ejection-fraction (diastolische Herzinsuffizienz)
HFrEF	heart failure with reduced ejection fraction (systolische Herzinsuffizienz)
HRP	horseradish peroxidase Enzym
ICD	implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
ICR	Interkostalraum

IVSd	diastolische interventrikuläre Septumdicke
LAD	linksatrialer Diameter
LV	linker Ventrikel bzw. linksventrikulär
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEF	linksventrikulären Ejektionsfraktion
LVEDVi	linksventrikulärer enddiastolischer Volumenindex
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVESVi	linksventrikulärer endsystolischer Volumenindex
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVMM	linksventrikuläre Muskelmasse
LVOT	linksventrikulärer Ausflusstrakt
LVOTG	Gradient des linksventrikulären Ausflusstraktes
LVPWd	diastolische Stärke der linksventrikulären Hinterwand
MD	Median
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MW	Mittelwert
nsVT	nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardie
NYHA	New York Heart Association
OPN	Osteopontin
PBS	phosphatgepuffte Salzlösung
PHT	plötzlicher Herztod
pw-Doppler	pulsed wave-Doppler
RR	Blutdruck
RVEF	rechtsventrikulären Ejektionsfraktion
RWT	relative Wanddicke
SD	Standardabweichung

TMB	Tetramethylbenzidine
TTE	transthorakale Echokardiographie
VHF	Vorhofflimmern
VT	ventrikuläre Tachykardie

1 Einleitung

1.1 Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

1.1.1 Einführung – Definition, Genetik, Symptomatik und Therapie

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die häufigste genetische Herzerkrankung, die morphologisch durch eine interindividuell variable Hypertrophie des linken Ventrikels (LV) gekennzeichnet ist. Verschiedene kardiale, aber auch Systemerkrankungen (z. B. die arterielle Hypertonie, Aortenklappenstenose bzw. Speichererkrankungen wie z. B. Amyloidose), können in ähnliche Phänotypen resultieren, i. S. einer sog. sekundären HCM. Die HCM weist einen überwiegend autosomal-dominanten Erbgang mit einer Prävalenz von 1:500 in der Allgemeinbevölkerung auf und gilt damit als häufigste genetische Herzerkrankung (1, 2). Dabei sind bereits über 900 Mutationen auf mehr als 27 verschiedenen Genen bekannt, die eine HCM herbeiführen können (3, 4). Bei 60-65% der Erkrankten betreffen diese Mutationen die Proteine des Sarkomers, womit den das Sarkomer kodierenden Genen die größte Relevanz zugesprochen wird (3). Die Mechanismen, die von der aufgetretenen Mutation zur morphologischen Ausprägung des Krankheitsbildes führen, gelten bis heute als weitgehend unklar. Die Beeinträchtigung der myofibrillären Kontraktionsfähigkeit, eine verminderte Calcium-Sensitivität des Sarkomers, eine vermehrte Fibrosierung des Myokards, eine gestörte biochemische Stress-Wahrnehmung und fehlerhafte Energieregulation des Herzens, sowie auch eine Dysfunktion auf mikrovaskulärer Ebene mit daraus resultierender Myokardischämie bilden Ansätze zur Klärung dieses Prozesses (2, 5).

Der Phänotyp dieser Erkrankung ist sehr variabel. Das Spektrum des klinischen Erscheinungsbildes reicht von einem asymptomatischen Verlauf mit normaler Lebenserwartung bis hin zu Säuglingen, die bei voll ausgeprägter HCM an einem akuten Herzversagen versterben können (6). Der plötzliche Herztod (PHT; v.a. bei jungen Patienten), Vorhofflimmern (VHF) mit einer Herzinsuffizienz als mögliche Folge und eine progrediente Herzinsuffizienz (v.a. bei älteren Patienten) stellen den Symptomverlauf dar, welchen die HCM nehmen kann (2). Die Mehrzahl der HCM-Patienten weist eine hämodynamische Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn (LVOT) mit folglich intrakavitär messbarem Gradienten unter Provokation (ergometrische Untersuchung oder Valsalva) oder bereits in Ruhe auf. Dieser Gradient bedingt die Mehrarbeit, die das Herz leisten muss, um den kardialen Blutfluss aufrecht zu erhalten. Gleichzeitig

liegt bei Betroffenen überwiegend eine unterschiedlich ausgeprägte diastolische linksventrikuläre Dysfunktion vor, die eine gestörte Ventrikelfüllung und folglich ein reduziertes Schlagvolumen bewirken kann. Das Zusammenspiel der diastolischen Dysfunktion, der Myokardischämie, der LVOT-Obstruktion und des VHF führt letztendlich zur Ausprägung der Leitsymptome der HCM in Form von Dyspnoe, Schwindel, (Prä-)Synkopen und Angina pectoris (2, 6, 7).

Die Therapie der HCM ist vielseitig und orientiert sich am jeweiligen Phänotyp. Dabei können zwei Ansatzpunkte unterschieden werden: die pharmakologische und die nicht-pharmakologische Therapie. Das Ziel der pharmakologischen Therapie führt über Symptomlinderung und Prävention von Komplikationen zu Prognoseverbesserung. Die eingesetzten Medikamente umfassen β -Blocker, Kalziumantagonisten, ACE-Hemmer, Antiarrhythmika und Angiotensinrezeptor-Blocker. Die nicht-pharmakologische Therapie ist indiziert, wenn – bei Obstruktion i. B. d. linksventrikulären Ausflusstraktes - die alleinige pharmakologische Therapie nicht ausreichend ist. Differenzialtherapeutisch möglich sind die perkutane transluminale Septumablation mit Ethanol oder die operative Myektomie. Beide Maßnahmen zielen auf eine Reduktion der LVH insbesondere i. B. d. LVOTs ab. Darüber hinaus zu erwähnen ist die Anlage eines implantierbaren Kardioverter-Defibrillators (ICD) zur Prävention des PHT (2, 7, 8).

1.1.2 Diagnostische Verfahren der HCM

Eine umfassende Diagnostik ist bei einer Diagnosestellung der HCM unentbehrlich. Durch eine akkurate Diagnostik ist es erst möglich, potentielle Differenzialdiagnosen auszuschließen und den Patienten leitliniengerecht zu behandeln. Des Weiteren besteht die Notwendigkeit für eine Risikostratifizierung zur Identifizierung von Individuen, bei denen auf dem Boden einer HCM das Risiko besteht, an einem PHT zu versterben. Mit Hinblick darauf besteht zu Beginn eine detaillierte Anamneseerhebung, die vermag eine etwaige Beschwerdesymptomatik zu beschreiben und eine mögliche familiäre Disposition für HCM (PHT bei erstgradigen Verwandten) offenzulegen. Im Rahmen der körperlichen Untersuchung kann die Auskultation mit einem spindelförmigen Systolikum auf eine LVOT-Obstruktion hinweisend sein bzw. mit einem holosystolischen Decrescendo auf eine vorliegende Mitralklappeninsuffizienz (2, 7, 9).

Die instrumentelle Diagnostik umfasst eine 12-Kanal-Elektrokardiographie (EKG), eine transthorakale Echokardiographie (TTE), ggf. ergänzt durch eine Stress-Echokardiographie, eine (Spiro-) Ergometrie, das (Langzeit-) EKG, eine kardiale Magnetresonanztomographie (CMR)

sowie i. R. einer Herzkatheteruntersuchung eine invasive Koronar- und LV-Angiographie inkl. Hämodynamik und ggf. mit Herzmuskelbiopsie.

Da $\geq 75\%$ der HCM-Patienten ein auffälliges EKG aufweisen, versteht sich dieses i. S. eines – initialen – Screenings (2, 10). Ein positiver Sokolow-Lyon-Index für linksventrikuläre Hypertrophie (LVH), verbreiterte Q-Zacken, ST-Streckenveränderungen, negative T-Wellen und Schenkelblockkonfigurationen stellen andere mögliche EKG-Auffälligkeiten dar (2, 8).

Die TTE gewährleistet die Diagnosestellung sowie die Beurteilung des Krankheitsverlaufes (in Ruhe oder unter Valsalva-Maneuver). Sie liefert zusätzliche wertvolle Informationen über die – ganz überwiegend septal betonte – Hypertrophie, eine dadurch verursachte LVOT-Obstruktion, eine Mitralklappeninsuffizienz und das dabei mögliche Vorliegen eines „systolic anterior movement“, dem sog. SAM-Phänomen.

Die (Spiro-) Ergometrie ermöglicht zum einen die Beurteilung der kardiopulmonalen Leistungsfähigkeit, zum anderen den Hinweis auf eine koinzidente kardiale Belastungsischämie (2, 11).

Für den Nachweis relevanter Herzrhythmusstörungen (z. B. erhöhte ventr. Extrasystolie mit (nicht) anhaltenden ventrikulären Tachykardien (VT) und VHF) sehen aktuelle Leitlinien – bei suboptimaler diagnostischer Genauigkeit daher gerne ein zu wiederholendes - Langzeit-EKG vor (2, 8).

Nicht nur bei eingeschränktem akustischen Fenster und mittels TTE unzureichend beurteilbarer hypertropher Wandabschnitte, sondern auch zur Darstellung intramyokardialer Fibrose (sog. Late-Gadolinium-Enhancement) und Papillarmuskelanordnung kommt die CMR in Betracht. Diese kann helfen primäre und sekundäre HCM zu differenzieren und nicht zuletzt den Koronarstatus zu erheben. Darüber hinaus bietet sie die Möglichkeit einer Herzmuskelbiopsie mit anschließend histologischer Befundung (8, 9).

1.2 Biologische Marker

1.2.1 Definition und Anwendungsgebiete

Biologische Marker (Biomarker) finden schon lange Anwendung in verschiedenen Bereichen der Medizin. „Biomarker“ dienen einerseits als Indikatoren für biologische oder pathologische Prozesse im Körper, andererseits geben sie Auskunft über die Auswirkung therapeutischer Eingriffe i. S. einer Therapiekontrolle (12, 13). Diese Merkmale können auf molekularer Ebene (z.B. durch Analyse des Genoms), laborchemisch (z.B. durch Nachweis von Proteinen), mittels Bildgebung (z.B. durch Nachweis definierter Morphologien) oder bei einer körperlichen Untersuchung (z.B. Nachweis charakteristischer Symptomausprägung) erhoben werden, müssen dabei jedoch stets objektiv und zugleich reproduzierbar sein (12, 14).

Biomarker können anhand ihrer verschiedenen Anwendungsbereiche kategorisiert werden. Ein diagnostischer Biomarker kann zum einen eine prognostische Funktion annehmen, wodurch dieser eine Krankheit diagnostizieren, ihren Progress beurteilen und eine Stadieneinteilung ermöglichen kann, zum anderen kann dieser eine prädiktive Funktion ausüben und folglich die Wahl der Therapie bestimmen. Biomarker der Krankheitsaktivität ermöglichen den Schweregrad einer Erkrankung zu bestimmen und gleichzeitig das Ansprechen auf eine Therapie zu beurteilen. Biomarker der Arzneimittelwirkung befassen sich mit der Wirkungsweise von Medikamenten und verhelfen u.a. zur Bestimmung eines therapeutischen Wirkungsbereiches oder auch einer Maximaldosis, um unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu minimieren. Die letzte Gruppe der Biomarker beschäftigt sich mit dem kinetischen Hintergrund der Arzneimittel und untersucht die Auswirkung der Kinetik auf die Wirksamkeit der Medikamente (13, 14). Die aufgeführten Anwendungsbereiche zeigen, dass Biomarker sowohl im klinischen Alltag als auch in klinischen Studien und in der Pharmaindustrie zum Einsatz kommen. Im klinischen Alltag sind vor allem die diagnostischen Biomarker von Bedeutung. Ein Biomarker kann in mehreren Gebieten zugleich, z. B. zur Diagnosestellung, Schweregradeinteilung, zum Monitoring von Krankheitsprogress und Therapieverlauf, eingesetzt werden.

1.2.2 Biologische Marker bei HCM

Das Potential, das Biomarker hinsichtlich der diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Auswirkung auf Krankheiten bieten, motiviert Forschungsgruppen seit geraumer Zeit

neue Ansätze für die Entdeckung und Validierung neuer Marker der HCM zu finden (15, 16). Genetische Biomarker sind Merkmale, die überwiegend pathologische Proteine des Sarkomers sind und als Resultat aus einer nachgewiesenen Mutation hervorgehen. Mithilfe dieser Biomarker möchte man einerseits Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der HCM ziehen, andererseits wird versucht eine Aussage über den zu erwartenden Phänotypen der gegebenen Mutation zu machen. Dies gelang beispielsweise bei der Mutation im MYBPC3-Gen, welche mit einer Spätmanifestation (> 65 Jahre) und einem milden Verlauf assoziiert wurde, und bei der Mutation im TNNT2-Gen, welche mit einer erhöhten Inzidenz an PHT korreliert wurde. Im klinischen Alltag dienen genetische Biomarker der sicheren Differenzierung einer primären von einer sekundären HCM und ermöglichen ein Screening der Angehörigen einer betroffenen Person (16). Pathologische Prozesse, die charakteristisch für die HCM sind, können u.a. mittels hormoneller, Protein-, und Peptid-Biomarker nachgewiesen und zum Teil auch evaluiert werden. So konnte Elmas et al. eine signifikante Korrelation zwischen MR-proANP (stabile Vorläufersubstanz des atrialen natriuretischen Peptid) und einer im CMR mittels Late-Gadolinium-Enhancement nachgewiesenen Myokardfibrose feststellen. Demnach könnte MR-proANP als potentieller Indikator für eine Myokardfibrose bei HCM-Patienten dienen (17). Jüngste Studien zeigen, dass erhöhte Werte des Proteins Galectin-3 mit der Wandstärke des Septums und der Hinterwand und dem daraus resultierenden linksventrikulären Muskelmassen-Index korreliert. Folglich wird Galectin-3 für den Einsatz als Biomarker für die LVH bei HCM diskutiert (18). Trotz zahlreicher und umfangreicher Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der HCM, stehen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine validierten Biomarker, die routinemäßig für die HCM eingesetzt werden könnten, zur Verfügung.

1.3 Osteopontin

1.3.1 Definition, Struktur, Vorkommen und Einsatz als Biomarker

Osteopontin (OPN) ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, welches auf dem Chromosom 4 kodiert wird und der Familie der small integrin binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING) angehört (19, 20). Das humane OPN-Volllängenprotein besteht aus 314 Aminosäuren und wird mit einer Molmasse von 32 kDa exprimiert. Durch posttranslationale Modifikationen in Form von Phosphorylierung und Glykosylierung, deren Grad vom sezernierendem Zelltyp abhängt, erhöht sich die Molekularmasse auf 44-75 kDa (21–23). Der Nachweis von OPN gelingt in

Körperzellen und Körperflüssigkeiten (einschließlich Milch) (19). Die Struktur des OPN (s. Abb. 1) beinhaltet mehrere Domänen, u. a. RGD, SVVYGLR und ELVTDFPTDLPAT, die Bindungsstellen für unterschiedliche Zelloberflächenintegrine darstellen und somit der Zelladhäsion dienen (24). Die Aktivität von OPN kann durch proteolytische Prozesse beeinflusst werden. Diesbezüglich konnte die Spaltung mittels Thrombin und Matrix-Metalloproteasen (z.B. MMP-2, -3, -7 und -9) belegt werden (25, 26). Während Thrombin eine Spaltstelle (Arg₁₆₈-Ser₁₆₉) aufweist, konnten für MMPs bereits drei Spaltstellen (Gly₁₆₆-Leu₁₆₇, Ala₂₀₁-Tyr₂₀₂ und Asp₂₁₀-Leu₂₁₁) definiert werden (s. Abb. 2) (24, 25).

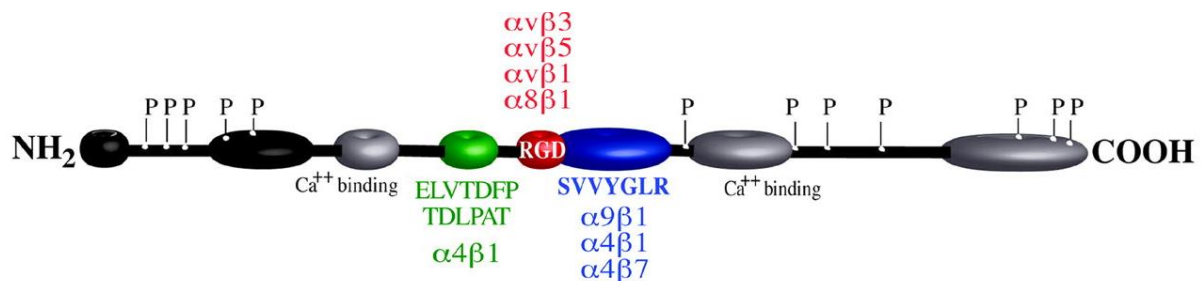


Abb. 1 Struktur von Osteopontin

Abgebildet sind die einzelnen strukturellen Bestandteile von OPN. Die Farben Grün, Rot und Blau stellen Domänen und deren dazugehörige Rezeptoren dar, die Zelladhäsion vermitteln. Bindungsstellen für Kalzium sind in Grau dargestellt, während die Bindungsstellen anderweitiger Matrixbestandteile in Schwarz abgebildet sind. Abbildung von Scatena et al. (24).


```

MRIA VICFLLGITCAIPVKQADSGSSEEKQNAV
SSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDMDEDD
DHVDSQDSIDSNDSDDVDDTDDSHQSDEHHS
ESDELVTDFPTDLPATEVFTPVVPTVDTYDGRG
DSVVYG166↓LR168↓SKSKKFRRPDIQYPDATDED
ITSHMESEELNGA201↓YKAIPVAQD202↓LNAPSD
WDSRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQSRLYKR
KANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFSHS
EDMLVVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN

```

Abb. 2 Aminosäuresequenz von Osteopontin

Abgebildet ist die genaue Aminosäuresequenz des humanen OPN. Die Farben Grün, Rot und Blau stellen Domänen dar, die Zelladhäsion vermitteln. Die Spaltstelle mit genauer Position von Thrombin ist mit einem grauen und die Spaltstellen von MMPs mit einem orangenen Pfeil dargestellt. Umgezeichnet nach Scatena et al. (24).

Erste Berichte über OPN stammen von Heinegard et al. und beschreiben dessen Vorkommen in Osteoblasten und den Einfluss auf die Knochenbildung (27). Seither konnte die Expression von OPN durch eine Vielzahl von Zelltypen, u.a. durch Epithelzellen, Hepatozyten, Makrophagen, Lymphozyten, glatte Gefäßmuskulatur und Myoblasten der Skelettmuskulatur, nachgewiesen werden. Auch die Beteiligung von OPN an biologischen Prozessen ist sehr vielseitig. Forschungen zeigen, dass OPN bei der Biomineralisation, der Tumorgenese, der Wundheilung, bei kardiovaskulären Erkrankungen, Entzündungsprozessen, Geweberemodelling und bei Adipositas eine Rolle spielt (19, 21).

Bautista et al. entwickelten für ihre Studien erstmals ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Verfahren, um OPN routinemäßig im Blut und Urin messen zu können. Dies geschah auch mit der Absicht, OPN künftig als Biomarker für verschiedenartige Erkrankungen und Pathogenesen zu nutzen. Seither wurde OPN bereits bei zahlreichen Krankheitsbildern, u.a. Atherosklerose, Rezidiverkennung bei Ovarialkarzinom, bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und bei kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation, als diagnostischer Biomarker vorgeschlagen (28–31).

1.3.2 Potentieller Einfluss von Osteopontin auf HCM

Bereits 1997 gelang es Graf et al. in ihrer Studie eine Korrelation zwischen OPN und LVH nachzuweisen. Erstmals wurde die Expression von OPN durch Kardiomyozyten in

Abwesenheit von Entzündungsprozessen und Makrophagen dokumentiert. Die Studie untersuchte Herzen, die aufgrund von idiopathischer Kardiomyopathie und ischämischer Herzerkrankung explantiert werden mussten. Der Nachweis von OPN innerhalb der hypertrophierten Ventrikel, die sowohl eine ausgedehnte Fibrose als auch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten aufwiesen, erfolgte mittels Immunofärbung. Beide Herzerkrankungen zeigten eine positive Korrelation hinsichtlich LVH und OPN (32, 33).

Hervorzuheben sind die Einflüsse von OPN auf die Differenzierung von Myofibroblasten, die Indizierung einer erhöhten Kollagensynthese und die Inhibition von MMP-Sekretion und -Aktivität. Das Zusammenspiel dieser Faktoren führt zur Entstehung von Myokardfibrose, welche letztendlich die Narbenbildung nach Myokardinfarkt darstellt (34).

Die Studie von Stawowy et al. lieferte erstmals den Beweis, dass eine starke Korrelation zwischen der durch myokardiale Dysfunktion beeinträchtigten Hämodynamik und erhöhter OPN-Expression besteht. Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie wurden hinsichtlich ihrer linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), rechtsventrikulären Ejektionsfraktion (RVEF), linksventrikulären endsystolischen (LVESVi) und enddiastolischen (LVEDVi) Volumenindex, als auch ihres linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) untersucht. Die pathologischen Werte dieser hämodynamischen Parameter wurden positiv mit OPN korreliert (35).

Diese Korrelationen verdeutlichen die Relevanz des vorliegenden Projektes, bedenkt man, dass LVH, Myokardfibrosierung und eine eingeschränkte myokardiale Hämodynamik (u. a. pathologische LVEF-, E- und A-Werte, sowie abnormaler Gradient im linksventrikulären Ausflustrakt (LVOTG) in Ruhe und unter Provokation) Pathomechanismen darstellen, die insbesondere bei HCM vorzufinden sind. Zusätzlich stellten die diastolische Herzinsuffizienz mit erhaltener EF („heart failure with preserved ejection-fraction“ [HFpEF]) und bei 3-10% der Patienten die systolische Herzinsuffizienz („heart failure with reduced ejection-fraction“ [HFrEF]) allgemein bekannte Folgen der HCM dar (2). Durch diese Gegebenheiten ist es naheliegend die Vermutung aufzustellen, dass die OPN-Expression auch bei HCM-Patienten erhöht sein könnte. Diese Schlussfolgerung initiierte die Durchführung dieser Pilotstudie, deren Ziel der Beweis dieser Hypothese ist.

1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Studie war Zusammenhänge zwischen der HCM und dem Biomarker OPN zu untersuchen. Es galt zu prüfen, ob die in zuvor veröffentlichten Studien nachgewiesene Korrelation von OPN und einer LVH auch bei diesem Krankheitsbild besteht. Daraus resultierte die Hypothese, dass erhöhte OPN-Plasmaspiegel bei HCM-Patienten zu erwarten sind und diese mit anderen diagnostischen Parametern korrelieren könnten. Im Rahmen dieser Studie wurden OPN-Plasmaspiegel mit diversen klinisch-diagnostischen Parametern der HCM in Bezug gesetzt. Dabei wurden echokardiographisch erhobene Werte, biometrische Parameter, Kriterien zur Risikostratifizierung für PHT, Stadien der Herzinsuffizienz und VHF erfasst. Mit Prüfung dieser Hypothese sollte i. R. der vorliegenden Arbeit i. S. eines Pilotprojekts die künftige Einsetzbarkeit von OPN als diagnostischer und prognostischer Marker für die Diagnosestellung, Schweregradbestimmung und Prädiktion der Krankheitsprogression bei HCM untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) am Campus Kiel in Kooperation mit der Kardiologischen Klinik am Herz- und Diabeteszentrum NRW (HDZ NRW) in Bad Oeynhausen durchgeführt. Zuvor waren von Seiten der lokalen Ethik-Kommissionen beider Institute das entsprechende Ethikvotum ergangen (Kieler Aktenzeichen: B234/15).

Die Erstellung des Patientenkollektivs, die Gewinnung und Aufbewahrung der Plasmaproben und die Datenerhebung erfolgten in Bad Oeynhausen, während die Auswertung der Plasmaproben in Kiel erfolgte.

Als Einschlusskriterien für die Studie wurden a) die im Wesentlichen echokardiographisch diagnostizierte primäre HCM und b) eine Einverständniserklärung des Patienten, die die Klinik zur Datenerhebung und Auswertung der abgegebenen Blutproben bevollmächtigt, definiert. Als Ausschlusskriterium galt a) das Nichtvorhandensein einer Plasmaprobe, b) das Fehlen einer Einverständniserklärung am HDZ NRW und c) das Vorliegen einer sekundär bedingten Myokardhypertrophie – wie z. B. bedingt durch eine arterielle Hypertonie, Aortenklappenstenose, Speicherkrankheiten (z.B. Amyloidose, M. Fabry und M. Danon), Hyperparathyreoidismus und tumoröse Infiltrationen des Septums.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden alle Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen im Zeitraum vom 08.08.2002 bis zum 10.10.2007 eine Blutprobengewinnung am HDZ NRW erfolgt war.

Die biometrische Analyse dieses Projektes musste letztlich ohne Bezug auf eine adäquate Kontrollgruppe durchgeführt werden, da die Referenz-Blutproben - gewonnen im selben Zeitraum wie die HCM-Proben - zum Zeitpunkt der Projektanalyse nicht mehr auffindbar waren.

Das Alter der Patienten Plasmaproben und der Zeitraum, in dem sich diese im gefrorenen Zustand befanden, begründeten den Verzicht für die Verwendung von frischen Blutproben einer neuen Kontrollgruppe. Es war nicht möglich eine geeignete Kontrollgruppe, nach Vorgaben der vorhandenen Plasmaproben des Patientenkollektivs, zu erstellen.

2.2 Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte retrospektiv. Hauptgegenstand der Studie ist der Osteopontinwert, welcher aus einer venösen Blutprobe (Plasma) der Probanden ermittelt wurde. Zur Bestimmung aller weiteren Parameter wurden anamnestische und transthorakale Echokardiographiedaten berücksichtigt. Dies geschah initial - d.h. zum Zeitpunkt der individuellen Blutprobenentnahme des jeweiligen Patienten.

2.3 Technische Untersuchungen

2.3.1 Transthorakale Echokardiographie (TTE)

Die TTE diente i. R. dieses Projekts primär der Diagnosestellung der HCM sowie der Bestimmung ihres Phänotyps zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme.

Die TTE erfolgte gemäß den Empfehlungen der European Society of Cardiology (ESC) zur volumetrischen Evaluation. Die Untersuchung wurde im ersten Schritt im 2D gesteuerten M-Mode durchgeführt, welches ein eindimensionales Schnittbild erzeugt, das eine hohe Auflösung, eine hohe Bildrate und eine umfangreiche angesammelte Datenlage bietet. Daher erfolgte die Anwendung dieses Modus nach präziser Achseneinstellung. Die hohe Interobserver- und Intertest-Variabilität wurde durch den Einsatz eines – insbesondere dem Gebiet der HCM - sehr erfahrenen Untersuchers minimiert (4, 36).

Bei der HCM waren für die Erhebung der notwendigen Parameter das parasternale (etwa 3.-5. ICR, medioklavikulär in Rückenlage) und das apikale (etwa 5. ICR in vorderer Axillarlinie, in Linksseitenlage) Schallfenster relevant. Leitliniengemäß erfolgte die Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters (LVEDD), der diastolischen Septumdicke (IVSd), der diastolischen Wandstärke der Hinterwand (LVPWd) und des linksatrialen Diameters (LAD) in der parasternalen Längsachse (36, 37).

Das apikale Schallfenster bietet mittels der kurzen Achse einen Zweikammer- und Vierkammerblick. Diese Einstellung wurde für die Errechnung der LVEF verwendet. Zunächst erfolgte die Berechnung der enddiastolischen (EDV) und endsystolischen (ESV) Volumina des LV unter Anwendung der Scheibchensummationsmethode nach Simpson. Anschließend wurde für die Berechnung der LVEF folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{LVEF} = (\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV}.$$

Im Rahmen der TTE erfolgten Messungen mittels continuous wave (cw)-Doppler zur Bestimmung des LVOTG in Ruhe und unter Provokation (38–40).

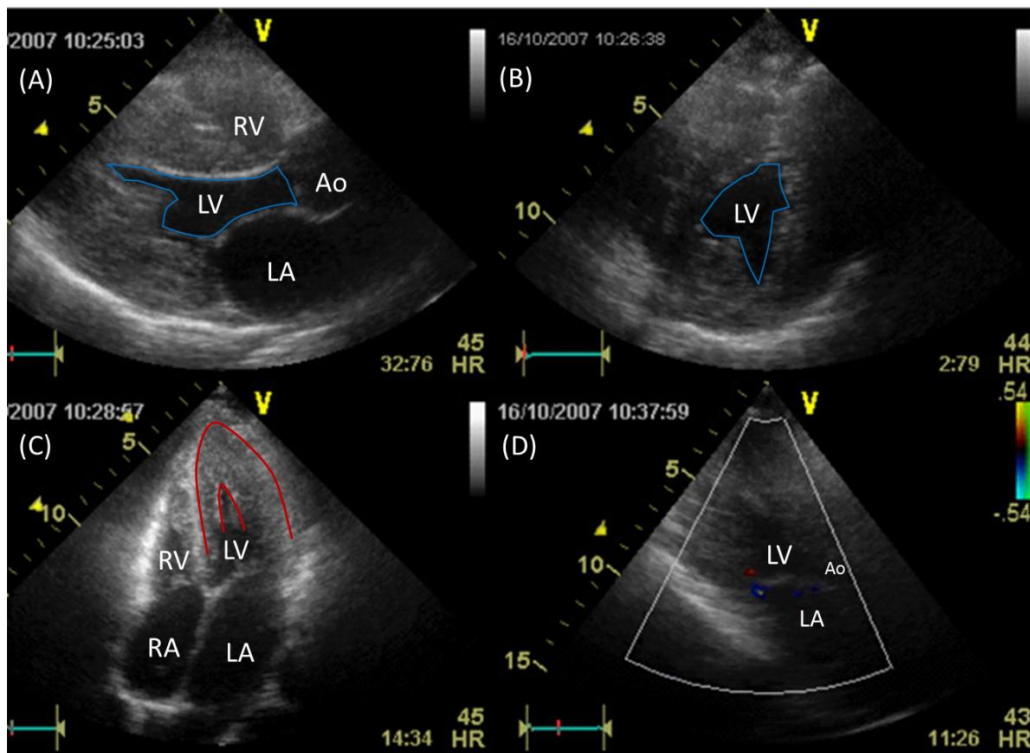


Abb. 3 2D-Bilder einer TTE bei HCM

Diese Abbildung zeigt verschiedene TTE-Standardprojektionen am Beispiel eines Patienten mit hochgradig ausgeprägter HCM. Mit Rot verdeutlicht ist die Hypertrophie des LV. Mit Blau gekennzeichnet ist das entsprechend eingengte und asymmetrische LV-Cavum. (A) Parasternale Längsachse. (B) Parasternale Kurzachse. (C) Apikaler Vierkammerblick. (D) Apikaler Dreikammerblick. Abkürzungen: LA: li. Vorhof; LV: li. Ventrikel; RA: re. Vorhof; RV: re. Ventrikel; Ao: Aortenwurzel.

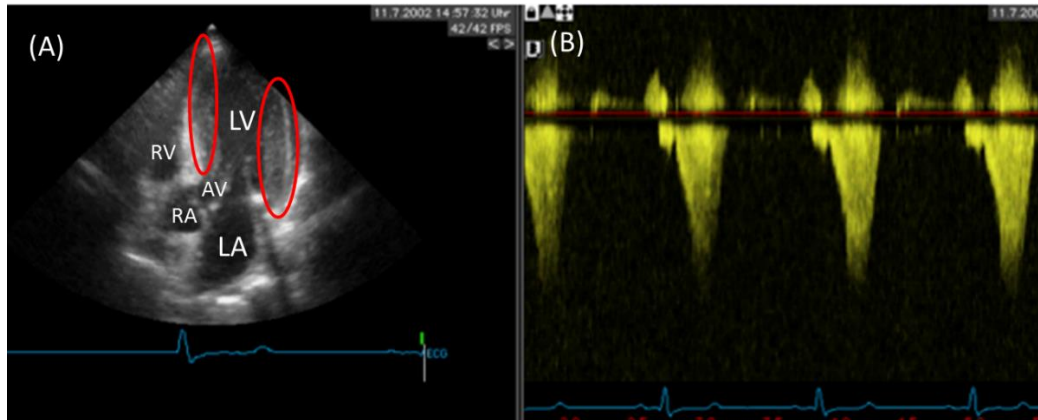


Abb. 4 cw-Doppler bei HCM

Diese Abbildung zeigt eine cw-Doppler-Messung bei einem Patienten mit HCM. (A) Apikaler Fünfkammerblick. (B) Messung des LVOTG im apikalen Fünfkammerblick mittels cw-Doppler. Mit Rot ist die Hypertrophie des LV gekennzeichnet. Abkürzungen: LA: li. Vorhof; LV: li. Ventrikel; RA: re. Vorhof; RV: re. Ventrikel; AV: Aortenklappe.

2.3.2 Blutprobenanalyse

2.3.2.1 Blutprobengewinnung und -aufbewahrung

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte am HDZ NRW. Nach dem Desinfizieren der Punktionsstelle wurde mittels einer Einmalkanüle venöses Blut in eine EDTA Plasma-Monovette (4ml) gespritzt. Alle Proben wurden innerhalb der ersten Stunde nach Gewinnung für zehn Minuten zentrifugiert - bei einer Temperatur von 4°C und einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 2300g. Aus jeder Blutprobe wurden jeweils eine Leukozytenprobe (buffy coat) und bis zu vier EDTA-Plasma-Proben generiert. Unmittelbar danach wurden alle Proben bei einer Temperatur von -80°C eingefroren. Die Zeitspanne zwischen der Blutprobenentnahme und der Verbringung in den Kühlschrank betrug maximal zwei Stunden. Bis zum Zeitpunkt der Probenanalyse fand kein Auftauprozess statt. Der Transport zum UKSH Kiel, wo die Proben ausgewertet wurden, fand auf Trockeneis im gefrorenen Zustand statt.

2.3.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immundiagnostisches Verfahren (Assay), das den quantitativen Nachweis von Molekülen (Analyten), z.B. Proteinen, Viren und Hormonen, in einer flüssigen Materialprobe ermöglicht (41, 42). Das Grundprinzip dieses Verfahrens besteht in der Anwendung spezifischer, enzymgekoppelter Antigene oder Antikörper, die an den Analyten binden und mit diesem einen Komplex bilden. Im Falle eines Proteins binden die spezifischen Antikörper an Antigene, die an der Oberfläche des Proteins exprimiert sind. Nach der Inkubation ist ein Waschvorgang notwendig, um alle nicht gebundenen Bestandteile zu entfernen. Die anschließende Zugabe eines passenden Substrates (Chromogen) erlaubt es, den Komplex und somit das gesuchte Molekül mittels farblicher Darstellung nachzuweisen. Dies geschieht durch die Reaktion, die das Substrat mit dem Enzym eingeht. Das Ergebnis kann dann visuell mit bloßem Auge oder mittels Photometer abgelesen werden. Die Intensität der Farbreaktion ist dabei einerseits von der Konzentration des Analyten, andererseits von der Art des verwendeten Assay abhängig (23, 41–43).

Das double-antibody sandwich ELISA (z.Dt. Sandwich ELISA, mit Verwendung von zwei Antikörpern, s. Abb. 1) dient dem Nachweis von Antigenen und wurde in die vorliegende Studie zur Ermittlung der Osteopontinmesswerte eingesetzt (41). Die genaue Durchführung des Verfahrens wird im Folgenden anhand des dafür angewendeten Human Osteopontin Assay Kit erklärt.

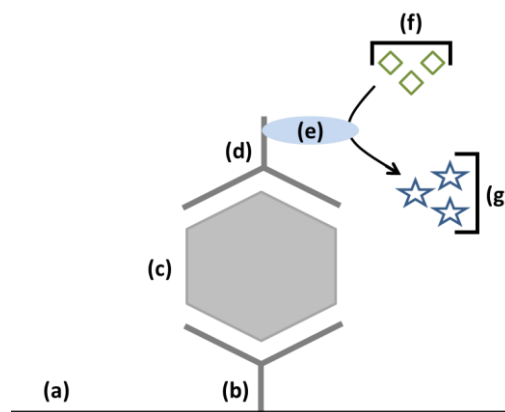


Abb. 5 Solid phase double-antibody sandwich ELISA

Dargestellt ist das solid phase double-antibody sandwich ELISA Assay. Die Mikroplatte (a) ist bereits mit dem coating Antikörper (b), an den das Antigen (c) bindet, beschichtet. An eine andere Bindungsstelle des Antigens (c) bindet der labeled Antikörper (d), welcher bereits mit einem Enzym (e) gekoppelt ist. Anschließend wird das Chromogen (f) hinzugefügt, welches mittels der degradierenden Wirkung des Enzyms (e) eine Farbreaktion (g) hervorruft. Die Farbreaktion kann mit bloßem Auge oder mithilfe eines Photometers abgelesen werden. Angepasst, nach Cowther, J. R. (44).

2.3.2.3 Auswertung der Plasmaproben

Für die Auswertung der Plasmaproben wurde das Human Osteopontin Assay Kit (L) - IBL (Code Nr. 27158; IBL International GmbH; Hamburg, Deutschland) verwendet¹. Das Kit erlaubt die Messung von nativem und rekombinantem humanem OPN im Urin, in Zellkulturen und im Plasma EDTA. Osteopontin, welches durch Thrombin gespalten wurde, wird von diesem Assay nicht erfasst. Die Spezifität dieses Kits für das humane OPN beträgt 100,0%, während die Sensitivität bei 3,33 ng/mL liegt. Lege artis wurden alle Reagenzien bei einer Temperatur zwischen 2°C und 8°C gelagert und 30 Minuten vor Anwendung auf Zimmertemperatur angehoben.

Das Kit ist ein solid phase (z. Dt. Festphase) Sandwich ELISA, welches zwei spezifische Antikörper benutzt. Der Ausdruck solid phase beschreibt, dass eine bereits mit einem Antikörper (coating Antikörper) beschichtete Platte eingesetzt wird. Die hier verwendete Platte ist eine 96-Well-Mikroplatte und ist mit dem Antikörper Anti-Human OPN (O-17) Rabbit IgG Affinity Purify beschichtet. Dieser bindet an Sequenz IPVKQADSGSSEEKQ des OPN (s. Abb. 4) Der zweite verwendete spezifische Antikörper (labeled Antikörper) ist das Anti-Human OPN (10A16) Mouse IgG MoAb Fab' und bindet an die Sequenz KSKKFRRPDIQYPDATDE des OPN. Der labeled Antikörper ist bereits mit dem Enzym horseradish peroxidase (HRP) gekoppelt. Diese Anordnung des Analyten, d.h. zwischen den zwei Antikörpern, ist namensgebend für das Assay (s. Abb. 5) (42).

¹ Als Quelle des Subkapitels 2.3.2.3 diente die mit dem Human Osteopontin Assay Kit (L) - IBL (Code Nr. 27158) mitgelieferte Bedienungsanleitung

```

MRIA VICFCLLGITCAIPVKQADSGSSEEKQNAV
SSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDMDEDD
DHVDSQDSIDSNDSDDDVDDTDDSHQSDEHHS
EDELVTDFTPDLPATEVFTPVVPTVDTYDGRG
DSVVYG166↓LR168↓SKSKKFRRPDIQYPDATDE
ITSHMESEELNGA201↓YKAIPVAQD202↓LNAPSD
WDSRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQSRLYKR
KANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFSHS
EDMLVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN

```

Abb. 6 Bindungsstellen der spezifischen Antikörper innerhalb der OPN-Aminosäuresequenz

Abgebildet ist die Aminosäuresequenz des humanen OPN. Mit Rot ist die Bindungsstelle des im Human Osteopontin Assay Kit (L) – IBL verwendeten coating Antikörper Anti-Human OPN (O-17) Rabbit IgG Affinity Purify gekennzeichnet. Mit Lila ist die Bindungsstelle des labeled Antikörper Anti-Human OPN (10A16) Mouse IgG MoAb Fab' dargestellt. Der Abbildung sind zusätzlich die genauen Spaltstellen von Thrombin (grau) und MMPs (orange) zu entnehmen. Umgezeichnet nach Scatena et al. (24).

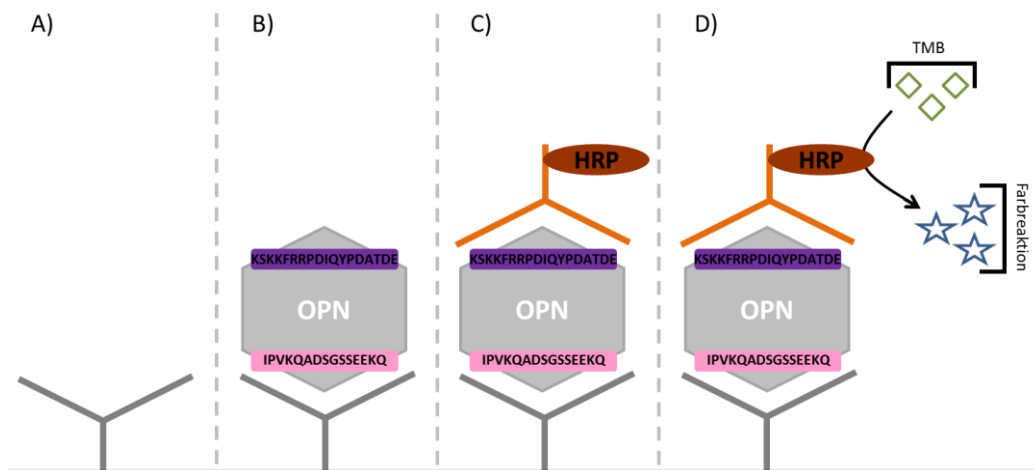


Abb. 7 ELISA anhand des Human Osteopontin Assay Kit (L) – IBL

Dargestellt ist das ELISA Verfahren anhand des im vorliegenden Projekt verwendeten Human Osteopontin Assay Kit (L) – IBL. A) Zu sehen ist die mit dem coating Antikörper Anti-Human OPN (O-17) Rabbit IgG Affinity Purify (grau) beschichtete 96-Well-Mikroplatte (schwarz). B) Nun wird der Analyt OPN hinzugefügt, welcher über die Bindungsstelle IPVKQADSGSSEEKQ an den coating Antikörper bindet. C) Der mit dem Enzym HRP (braun) gekoppelte labeled Antikörper Anti-Human OPN (10A16) Mouse IgG MoAb Fab' (orange) bindet über KSKKFRRPDIQYPDATDE an OPN. D) Das hinzugefügte Chromogen TMB (grün) wird durch das Enzym HRP (braun) degradiert und erzeugt eine Farbreaktion (blau), anhand welcher die Osteopontinwerte abgeleitet werden. Angepasst, nach Cowther, J. R. (44).

Bezeichnung	Erläuterung	Menge
Precoated plate	96-Well-Mikroplatte beschichtet mit Anti-Human OPN (O-17) Rabbit IgG Affinity Purify	1x
Labeled Antibody Conc.	Anti-Human OPN(10A16)Mouse IgG Fab' MoAb gekoppelt mit HRP in 30-facher Konzentration	1x0,4mL
Standard	Rekombinantes humanes OPN	2x0,5mL
EIA Buffer	1% Rinderalbumin (BSA), 0.05% Tween 20 in phosphat-gepuffter Salzlösung (PBS)	1x30mL
Solution for labeled Antibody	1% BSA, 0.05% Tween 20 in PBS	1x12mL
Chromogen	Tetramethylbenzidine Lösung (TMB)	1x15mL
Stop solution	1N Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	1x12mL
Wash buffer Conc.	0,05% Tween 20 in Phosphatpuffer	1x50mL

Tab. 1 Inhalt des Kits

Der Tabelle sind der beigefügte Inhalt des Kits, die genaue Erläuterung und Mengenangabe zu entnehmen.

Zusätzlich benötigte Materialien

1. Mikroplattenleser (450nm)
2. Mikropipetten und Pipettenspitzen
3. Messzylinder und -becher
4. destilliertes Wasser
5. Inkubator (37±1°C)
6. Kühlschrank (4°C)
7. Millimeterpapier (log/log)
8. Papiertücher
9. Waschflasche zur Mikroplattenreinigung
10. PBS
11. Reagenzglas zur Verdünnung von Standard
12. Jeweils ein Teströhrchen für den enzymgekoppelten Antikörper und das Chromogen

Vorbereitungen

1. Herstellung der Waschlösung

Zur Herstellung der Waschlösung wurde der Wash buffer Conc. (50mL) mit 1950mL destilliertem Wasser vermischt. Diese Waschlösung kam für sämtliche Waschvorgänge während des Assays zum Einsatz.

2. Aufbereitung des enzymgekoppelten Antikörpers

Hierbei wurde das Labeled antibody Conc. mit Solution for labeled Antibody um das 30-fache, unter Berücksichtigung der benötigten Lösungsmenge, verdünnt.

3. Verdünnung der Plasmaproben

In der vorliegenden Studie erfolgte die Verdünnung der Plasmaproben um das 10-fache mittels EIA Buffer.

4. Aufbereitung von Standard

Die Aufbereitung von Standard erfolgte durch das Vermischen von Standard und 0,5 mL destilliertem Wasser. Die daraus resultierende Stocklösung besaß eine OPN-Konzentration von 640ng/mL.

5. Verdünnung von Standard

Für diesen Arbeitsschritt wurde die unter Punkt 5 hergestellte Stocklösung verwendet. Zunächst erfolgte die Befüllung von acht Reagenzgläsern mit jeweils 230 mL EIA Buffer. Die Beschriftung sah wie folgt aus:

Reagenzglas 1 - 320 ng/mL	Reagenzglas 2 - 160 ng/mL
Reagenzglas 2 - 80 ng/mL	Reagenzglas 4 - 40 ng/mL
Reagenzglas 5 - 20 ng/mL	Reagenzglas 6 - 10 ng/mL
Reagenzglas 7 - 5 ng/mL	Reagenzglas 8 - 0 ng/mL (Leerwertprobe)

Anschließend wurde 230 mL Stocklösung in Reagenzglas 1 gefüllt und vorsichtig vermischt. Im nächsten Schritt erfolgte die Hinzugabe von 230 mL der in Reagenzglas 1 entstandenen Lösung in das Reagenzglas 2. Dieser Vorgang wurde bis einschließlich Reagenzglas 7 fortgesetzt, wodurch die Reagenzgläser eine den Beschriftungen entsprechende Konzentration von OPN enthielten. Reagenzglas 8 stellte eine Leerwertprobe dar, d.h. in diesem Reagenzglas war kein Analyt enthalten.

Durchführung der Messung

1. Zunächst wurden jeweils 100µL EIA Buffer in die für die Reagenzienleerprobe vorgesehenen Vertiefungen (wells) der Mikroplatte gefüllt.
2. Als nächstes erfolgte die Hinzugabe von jeweils 100µL der Materialprobe, dem verdünnten Standard (Reagenzglas 1-7) und der Leerwertprobe (Reagenzglas 8) in die jeweils dafür vorgesehenen wells der Mikroplatte.

3. Nach Abdeckung der Mikroplatte, musste diese für eine Stunde bei 37°C inkubiert werden.
4. Die im Anschluss an die Inkubation gründlich mittels Waschlösung und Waschflasche ausgewaschenen wells, wurden anschließend mit der Waschlösung befüllt und für 15 bis 30 Sekunden zum Ruhen stehen gelassen. Nach vollständigem Entfernen der Waschlösung mittels Ausklopfen, musste diese Prozedur mindestens sieben Mal wiederholt werden. Im letzten Durchgang erfolgte ein Ausklopfen an einem Papiertuch, um die vollständige Entfernung der Waschlösung zu gewährleisten.
5. Jeweils 100µL des aufbereiteten enzymgekoppelten Antikörpers wurden im nächsten Schritt in die wells der Materialprobe, des verdünnten Standards (Reagenzglas 1-7) und der Leerwertprobe (Reagenzglas 8) aufgetragen.
6. Es erfolgte erneut ein Inkubationszyklus der abgedeckten Mikroplatte, diesmal für 30 Minuten bei 4°C.
7. Nach der Inkubation wurde der Waschvorgang aus Schritt 4 mindestens neun Mal wiederholt.
8. Um Verunreinigungen zu vermeiden, musste die benötigte Menge vom Chromogen in ein gesondertes Teströhrchen gefüllt und erst anschließend in die wells übertragen werden. Die jeweilige Menge betrug 100µL.
9. Die Mikroplatte wurde im Dunkeln bei Zimmertemperatur für 30 Minuten erneut inkubiert. Eine Blaufärbung der Lösungen war zu beobachten.
10. Nach der Inkubation erfolgte die Hinzugabe von jeweils 100µL stop solution in die wells. Durch das anschließende Vermischen war eine Gelbfärbung des Inhaltes zu beobachten.
11. Im letzten Schritt wurde die Mikroplatte zunächst von möglichem Schmutz und überschüssigen Wassertropfen gesäubert und anschließend musste eine Blasenbildung an der Oberfläche der well-Inhalte ausgeschlossen werden. Die anschließenden Messungen mittels Mikroplattenleser bei 450 nm erfolgten vorschriftsmäßig innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der stop solution. Der Mikroplattenleser ermittelte die Absorptionswerte der einzelnen Lösungen (Materialprobe, verdünnter Standard und Leerwertprobe).

Auswertung

Für die Auswertung der Proben musste zunächst der Absorptionsgrad der Leerwertprobe von den Absorptionswerten der Standards (Reagenzglas 1-7) und der Materialprobe subtrahiert werden. Im Anschluss wurde mit Hilfe von Excel (für Windows) und der linearen Regression eine

Standardkurve ermittelt, anhand welcher die Ablesung der OPN-Plasmaspiegel der Materialprobe stattfand. Die Standardkurve musste für jedes neu verwendete Human Osteopontin Assay Kit neu angefertigt werden.

2.4 Erhobene Parameter

2.4.1 Biometrische Parameter

Zu den studienrelevanten, biometrischen Parametern zählen das Geschlecht, das Alter, die Größe, das Gewicht und der Blutdruck. Die Angabe des Alters erfolgte in Jahren, die der Größe in Meter (m) und die des Körpergewichts in Kilogramm (kg). Beim Blutdruck wurde der systolische und diastolische Wert ermittelt und in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) angegeben.

2.4.2 Risikostratifizierung bei HCM

Die Risikostratifizierung erfolgte i. S. der heute fünf etablierten (klassischen) Risikofaktoren der HCM. Dazu zählen: eine familiäre Disposition für PHT, ein Blutdruckabfall unter Belastung, langzeitechokardiographisch erfasste nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardie (nsVT), eine Synkope in der Vorgeschichte und der Nachweis einer Septumhypertrophie.

Die Familienanamnese galt als positiv, wenn ein Verwandter 1. Grades des Patienten einen plötzlichen Herztod erlitten hat.

Der Blutdruckabfall unter Belastung wurde wie folgt definiert: systolischer Blutdruckabfall von mehr als 10 mmHg oder unzureichender Blutdruckanstieg bei sportlicher Aktivität. Für die Ermittlung dieses Parameters wurde eine durchgeführte Ergometrie bzw. Spiroergometrie herangezogen.

Die Septumdicke galt als Risikofaktor, wenn diese echokardiographisch ≥ 30 mm betrug.

Die Probanden hatten angeben müssen, ob sie bis zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme eine Synkope erlitten hatten.

Abschließend wurde bei jedem Probanden die Anzahl der Risikofaktoren für die HCM zusammengefasst, dieser konnte einen Wert zwischen null und fünf annehmen.

2.4.3 NYHA Klassifikation und Stadieneinteilung

Die NYHA-Klassifikation wurde erstmals von der New York Heart Association verfasst und dient als funktionelle Klassifikation für die Herzinsuffizienz, welche eine der Folgen der HCM darstellt (45). Anhand ihrer körperlichen Belastbarkeit und dem Auftreten einer Beschwerdesymptomatik (Erschöpfung, Luftnot, Rhythmusstörungen oder pectanginöses Leiden) werden die Betroffenen in eines der vier Stadien dieser Klassifikation eingeteilt (s. Tabelle 2) (9). Eine weitere Möglichkeit die NYHA-Einteilung vorzunehmen ist anhand der Etagenanzahl, die der Betroffene, ohne das Auftreten von Dyspnoe, bewältigen kann. Die Einteilung erfolgt nach der Anzahl der gestiegenen Etagen (s. Tabelle 3).

Die Stadieneinteilung der Probanden erfolgte nach den entsprechenden Kriterien. Für die statistische Auswertung wurden NYHA I und II, als auch NYHA III und IV zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst.

2.4.4 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern gehört zu den supraventrikulären Herzrhythmusstörungen und stellt mit einer Prävalenz von ca. 20% die am häufigsten auftretende Herzrhythmusstörung bei Patienten mit HCM dar (46, 47). Bei Probanden dieser Studie wurde erfasst, ob zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme ein VHF bestand. Gleichzeitig erfolgte die Dokumentation der Art des VHF (paroxysmal, persistierend oder permanent).

2.4.5 Echokardiographie-basierte Befunde

Sämtliche echokardiographischen Befunde (Echobefunde) wurden von nur einem sehr erfahrenen Untersucher (L. F., Bad Oeynhausen) mittels Vivid E7, einem kardiovaskulären Ultraschallsystem von der Firma GE Healthcare, erhoben und ausgewertet. Die Werte für den LVEDD, die IVSd und die LVPWd wurden mittels M-Mode in der parasternalen Längsachse bestimmt, während der LAD als Querschnitt im Vierkammerblick ermittelt wurde (36). Die Angabe dieser Werte erfolgte in Millimeter (mm).

Die LVEF wurde anhand der Scheibchensummationsmethode nach Simpson errechnet und in Prozent (%) angegeben.

Die Berechnung der linksventrikulären Muskelmasse (LVMM) erfolgte mit der Penn Konvention-Formel:

$$LVMM = 1,04 * (LVEDD + LVPWd + IVSd)^3 - LVEDD^3 - 13,6,$$

mit Angaben in Gramm (g). Im Anschluss wurde ermittelt, ob die Ergebnisse der LVMM sich innerhalb des Normbereiches für das jeweilige Geschlecht befinden. Dabei wurde der Normbereich für Männer mit 176 ± 45 g und der für Frauen mit 121 ± 40 g definiert (40, 48).

Für die relative linksventrikuläre Wanddicke (RWT) wurde folgende Gleichung eingesetzt:

$$(2 \times LVPWd) / LVEDD.$$

Die Summe der linksventrikulären Wanddicke wurde mittels folgender Gleichung ermittelt:

$$IVSTd + PWTd.$$

Für die maximale linksventrikuläre Wanddicke wurden IVSd und LVPWd miteinander verglichen und der größere der beiden Werte notiert (49, 50). Alle Angaben erfolgten in mm.

Der LVOTG wurde mittels cw-Doppler sowohl in Ruhe als auch unter Provokation unter Valsalva ermittelt. Dabei galt der Wert von ≥ 30 mmHg in Ruhe als Nachweisgrenze für eine Obstruktion (38).

2.4.6 Osteopontinwert

Die Osteopontinwerte wurden am UKSH in Kiel mittels Human Osteopontin Assay Kit (L) - IBL (Code Nr. 27158, s.o.) ermittelt. Alle Messungen wurden von einer Person im Zeitraum vom 09.02.2015 bis 16.03.2015 durchgeführt. Für die Auswertung von 137 Plasmaproben wurden insgesamt fünf 96-Well-Mikroplatten verwendet.

2.5 Statistische Analyse

Die Planung und Durchführung der statistischen Analyse erfolgte unter eingehender biometrischer Beratung durch die Clinical Research. Zur Auswertung und Erstellung der Grafiken wurde das Programm SPSS für Windows, Version 24.0 (SPSS Inc., U.S.A.) herangezogen.

Zunächst wurde die Normalverteilung des OPN mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests geprüft. Das OPN erwies sich hierbei als nicht normalverteilt, woraufhin nichtparametrische Tests für nicht-normalverteilte Stichproben angewendet wurden. Aufgrund einer nicht vorhandenen Kontrollgruppe und somit fehlenden Voraussetzungen für einen t-Test, wurde für den Vergleich von zwei nicht normalverteilten und gleichzeitig unabhängigen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Der Vergleich von mehr als zwei nicht normalverteilten, jedoch unabhängigen Stichproben erfolgte mittels H-Test (Kruskal-Wallis-Test). Die Darstellung der metrischen Variablen erfolgte in Form von Mittelwerten und Medianen. Die Streumaße wurden als Standardabweichungen und Quartile angegeben und mittels Boxplots dargestellt. Bei der Boxplot-Darstellung führten die Boxen den Median und die 25. - 75. Perzentile auf, während die T-Balken den kleinsten und größten Wert darlegten. Davon abzugrenzen waren die Ausreißer und Extremwerte. Die Ausreißer wurden als $1\frac{1}{2}$ - 3 Boxlängen außerhalb der Box liegende Werte definiert und mittels Kreisen symbolisiert. Extremwerte lagen hingegen 3 Boxlängen außerhalb der Box und deren Darstellung erfolgte mittels Kreuzen. Die Angabe der nominalen Parameter erfolgte als absolute bzw. relative Häufigkeit. Bei der zweiseitigen Signifikanzüberprüfung aller Tests wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Nach Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden $n = 137$ Patienten eingeschlossen. Das Patientenkollektiv wies ein mittleres Alter von $50,07 \pm 15,48$ (MD = 51) und einen Männeranteil von 68,61% ($n = 94$) auf. Die körperbezogenen Maße zeigten eine mittlere Körpergröße von $1,73 \pm 0,10$ m, ein mittleres Gewicht von $81,92 \pm 15,96$ kg und einen durchschnittlichen BMI von $27,35 \pm 4,23$ kg/m² auf. Der OPN-MD aller analysierten Plasmaproben betrug 197,88 ng/mL. Sämtliche in dieser Studie erhobenen Parameter sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Dabei beschreibt der Wert (n) die Anzahl der Probanden, deren Daten in die Analyse der jeweiligen Parameter, einbezogen wurden.

3.2 Biometrische Parameter

Im Folgenden wurde OPN in Korrelation zu den biometrischen Parametern, d.h. Geschlecht, Alter, systolischer und diastolischer RR, gesetzt. Die Männer zeigten einen OPN-MD = 186,35 ng/mL und die Frauen einen OPN-MD = 221,83 ng/mL. Das Alter der Patienten hatte einen MD von 51 Jahren. Patienten mit ≤ 51 Jahre brachten einen OPN-MD = 175,47 ng/mL und die mit einem Alter > 51 Jahre einen OPN-MD = 203,61 ng/mL hervor. Bei dem BMI wurde ein OPN-MD = 26,72 kg/m² ermittelt. Dabei zeigten Patienten mit einem BMI $\leq 26,72$ kg/m² einen OPN-MD = 212,01 ng/mL und Patienten mit einem höheren BMI ($> 26,72$ kg/m²) einen OPN-MD = 186,80 ng/mL. Bei dem systolischen RR wurde ein MD = 129 mmHg ermittelt. Bei einem RR ≤ 129 mmHg konnte ein OPN-MD = 178,34 ng/mL und bei einem RR > 129 mmHg ein OPN-MD = 208,14 ng/mL ermittelt werden. Der diastolische Blutdruck ergab einen MD = 75 mmHg. Die Gruppe mit einem RR ≤ 75 mmHg zeigte einen OPN-MD = 197,88 ng/mL und die mit einem RR > 75 mmHg einen OPN-MD = 200,43 ng/mL. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile der jeweiligen Parameter sind den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen. Bis auf den erniedrigten BMI ($p = 0,032$), zeigte kein weiterer Parameter eine signifikante Korrelation mit OPN (Geschlecht: $p = 0,095$; Alter: $p = 0,144$; systolischer RR: $p = 0,426$; diastolischer RR: $p = 0,412$).

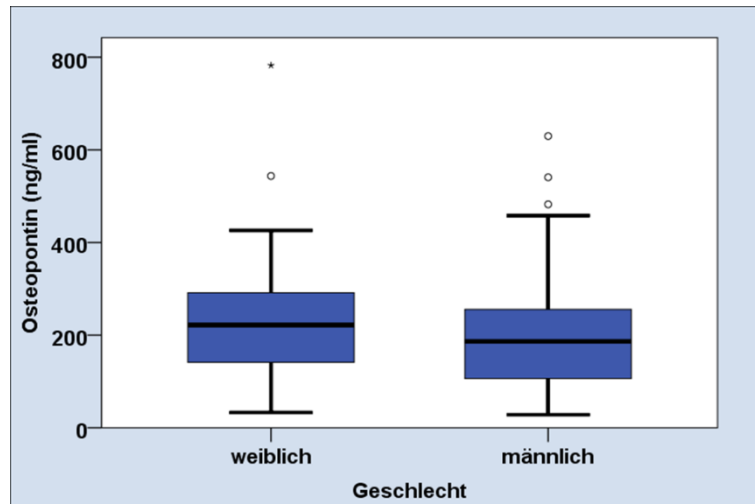


Abb. 8 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht

Die Boxplot-Darstellung zeigt den OPN-Plasmaspiegel bei weiblichen und männlichen Probanden. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

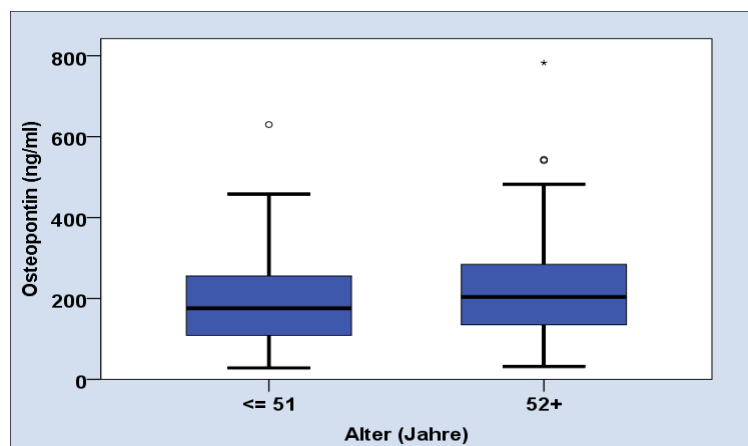


Abb. 9 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlichem Patientenalter

Die Boxplot-Darstellung zeigt den OPN-Plasmaspiegel bei Probanden im Alter ≤ 51 Jahre und Alter > 51 Jahre. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

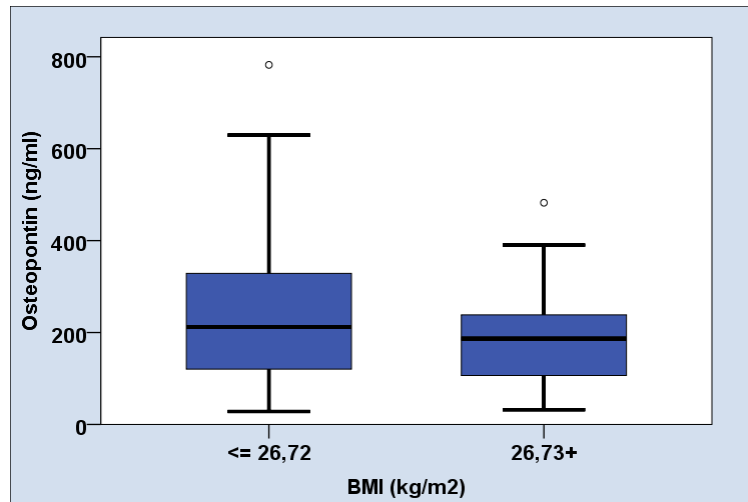


Abb. 10 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlichem BMI

Die Boxplot-Darstellung zeigt den OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit einem BMI $\leq 26,72$ kg/m² und einem BMI $> 26,72$ kg/m². Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert und Ausreißer (Kreis) zu entnehmen.

3.3 Risikostratifizierung bei HCM

Bei der Risikostratifizierung wurden familiäre Disposition für PHT, der Blutdruckabfall unter Belastung, die Septumdicke, nsVTs, Synkopen in der Vorgeschichte und anschließend die Risikofaktoren insgesamt evaluiert. Lediglich 13,87% (n = 19) der Patienten hatte eine familiäre Disposition für PHT und zeigte einen OPN-MD = 118,35 ng/mL. Patienten ohne Disposition (86,13%; n = 118) zeigten dagegen einen OPN-MD = 205,92 ng/mL. Der Anteil der Probanden, die einen Blutdruckabfall unter Belastung hervorbrachten, betrug 17,52% (n = 24) und hatten einen OPN-MD = 21531 ng/mL. Die Probanden ohne Blutdruckabfall (82,48%; n = 113) zeigten einen OPN-MD = 195,21 ng/mL. Lediglich 9,49% (n = 13) der Patienten hatten eine Septumdicke ≥ 30 mm vorzuweisen. Dabei wurde bei diesem Parameter ein MD = 30 mm ermittelt. Die Gruppe mit einem Septum < 30 mm erwies einen OPN-MD = 201,10 ng/mL und die mit einem Septum ≥ 30 mm einen OPN-MD = 116,16 ng/mL. Bei 45,26% (n = 62) der Probanden konnten nsVT nachgewiesen und ein OPN-MD = 190,19 ng/mL ermittelt werden. Die Mehrzahl der Probanden (54,74%; n = 75) hatte jedoch keine dokumentierten nsVTs und zeigte einen OPN-MD = 200,43 ng/mL. Der Anteil der Patienten, die eine Synkope in der Vorgeschichte vorzuweisen hatte, betrug 33,58% (n = 46) und bot einen OPN-MD = 168,42 ng/mL. Patienten ohne Synkopen in der Vorgeschichte (66,42%; n = 91) zeigten einen OPN-MD = 199,17 ng/mL.

Bei Betrachtung der Gesamtzahl der Risikofaktoren bei allen Patienten hatten 29,93% (n = 41) keinen Risikofaktor, 29,93% (n = 41) einen, 32,85% (n = 45) zwei, 5,84% (n = 8) drei und 1,46% (n = 2) Risikofaktoren vorzuweisen. Bei überhaupt nicht eruierbaren Risikofaktoren konnte ein OPN-MD = 200,43 ng/mL, bei einem Risikofaktor ein OPN-MD = 220,00 ng/mL, bei zwei ein OPN-MD = 136,98 ng/mL, bei drei ein OPN-MD = 147,09 ng/mL und bei vier ein OPN-MD = 208,14 ng/mL bestimmt werden. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile der jeweiligen Parameter sind der Tabelle 7, 8 und 9 zu entnehmen. Bei dem Blutdruckabfall unter Belastung (p = 0,630), der Septumdicke (p = 0,223), den nsVTs (p = 0,983) und der Synkopenanamnese (p = 0,215) konnte keine signifikante Korrelation zum OPN festgestellt werden. Die familiäre Disposition zeigte eine signifikante Korrelation (p = 0,033) zu OPN, während sich bei der Anzahl der Risikofaktoren ein Trend („grenzwertige Signifikanz“; p = 0,061) abzeichnete.

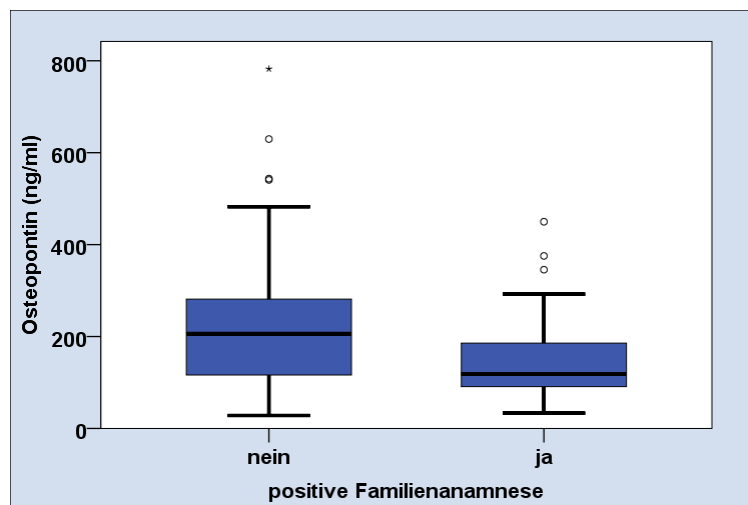


Abb. 11 Osteopontinplasmaspiegel bei einer positiven bzw. unauffälligen Familienanamnese

Die Boxplot-Darstellung zeigt den OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit und ohne positive Familienanamnese hinsichtlich PHT. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

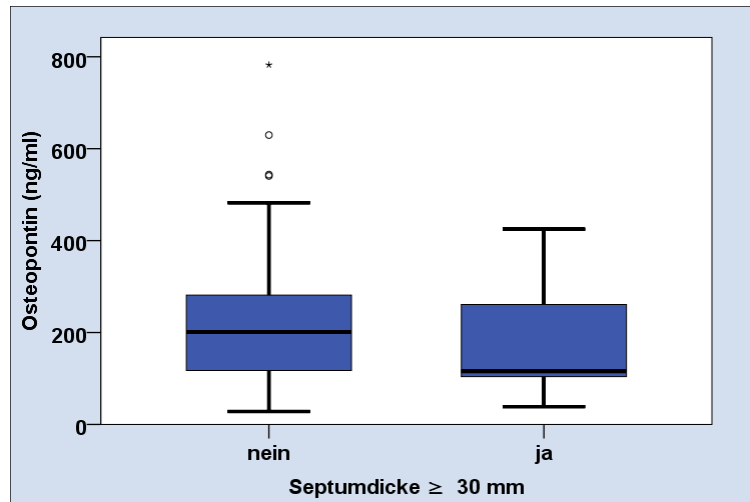


Abb. 12 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlicher Septumdicke

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit einer Septumdicke < 30 mm und einer Septumdicke ≥ 30 mm. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

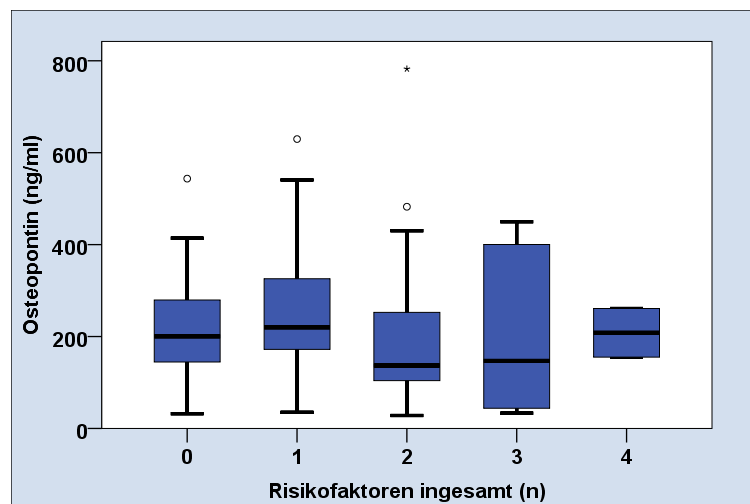


Abb. 13 Osteopontinplasmaspiegel bei variierender Anzahl von Risikofaktoren

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit keinem bis insgesamt fünf Risikofaktoren. Im vorliegenden Projekt hatte keiner der Patienten insgesamt fünf der fünf möglichen Risikofaktoren. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

3.4 NYHA-Stadium und Vorhofflimmern

Im Folgenden wurden die NYHA-Stadien und VHF zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme mit OPN korreliert. Zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme konnten 60,29% (n = 82) der Patienten dem Stadium I oder II zugeordnet werden und zeigten einen OPN-MD = 190,19 ng/mL. Die übrigen 39,71% (n = 54) hatten ein NYHA-Stadium III oder IV und zeigten eine OPN-MD = 202,94 ng/mL. Zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme bestand bei 13,14% (n = 18) der Probanden die Diagnose eines VHF. Dabei konnte ein OPN-MD = 198,04 ng/mL ermittelt werden. Von diesen Probanden konnte bei 61,11% (n = 11) ein paroxysmales, bei 16,67% (n = 3) ein persistierendes und bei 22,22% (n = 4) ein permanentes VHF dokumentiert werden. Patienten ohne VHF (86,86%; n = 119) zeigten einen OPN-MD = 197,88 ng/mL. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile der jeweiligen Parameter sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Weder die NYHA-Stadien (p = 0,130), noch das Bestehen eines VHF zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme (p = 0,769) konnte mit dem OPN positiv korreliert werden. Trotz fehlender Signifikanz bei der Art des VHF (p = 0,807), zeichnete sich ein Trend zu erhöhten Werten bei permanentem VHF ab (paroxysmales VHF OPN-MD = 169,75 ng/mL vs. persistierendes VHF OPN-MD = 215,35 ng/mL vs. permanentes VHF OPN-MD = 289,12 ng/mL).

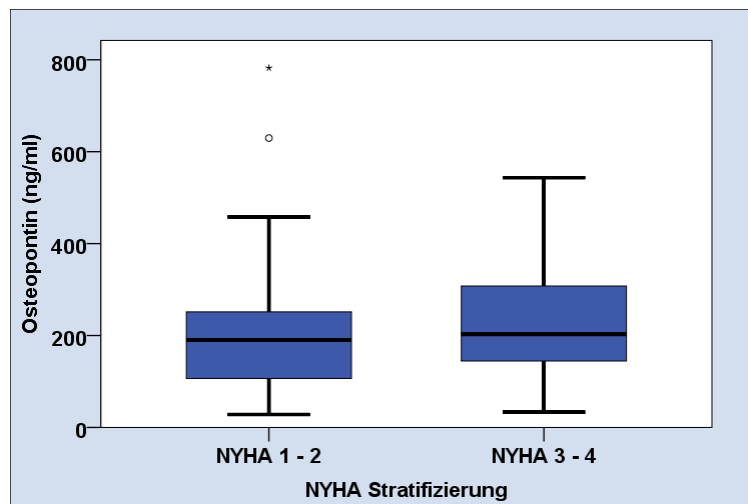


Abb. 14 Osteopontinplasmaspiegel mit Bezug auf geringe vs. erhöhte NYHA-Stadien

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit NYHA-Stadium 1 bis 2 und NYHA-Stadium 3 bis 4. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

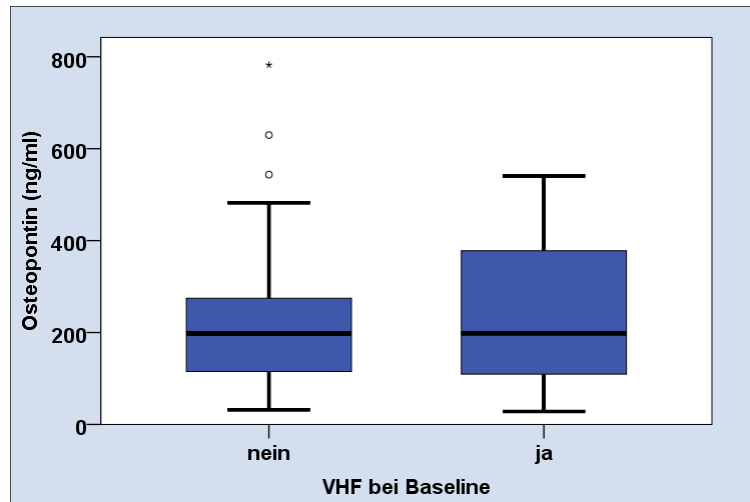


Abb. 15 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von VHF

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit und ohne diagnostizierten VHF. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

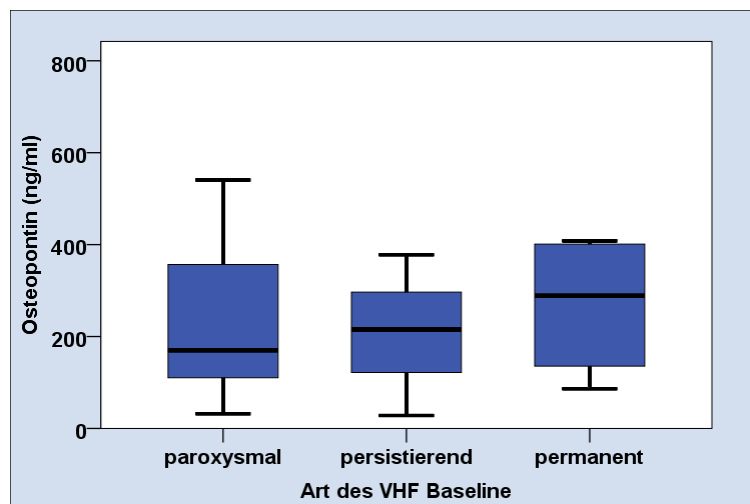


Abb. 16 Osteopontinplasmaspiegel mit Bezug auf die Art des VHF

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit paroxysmalem, persistierendem und permanentem VHF. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte und der kleinste Wert zu entnehmen.

3.5 Echokardiographisch erhobene Befunde

3.5.1 Linksatrialer Diameter

Das Patientenkollektiv zeigte bei dem LAD einen MD von 47 mm. Die Gruppe mit einem LAD > 47 mm lieferte einen OPN-MD = 184,05 ng/mL, die Gruppe mit LAD ≤ 47 dagegen einen OPN-MD = 210,17 ng/mL. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem LAD und dem OPN ($p = 0,993$).

3.5.2 LVEF

Der ermittelte MD betrug bei der LVEF 55%. Die Probanden mit einer LVEF $> 55\%$ zeigten einen OPN-MD = 144,70 ng/mL und die Probanden mit einer LVEF $\leq 55\%$ einen OPN-MD = 208,14 ng/mL. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Es konnte eine signifikante Korrelation von OPN zu LVEF ($p = 0,011$) nachgewiesen werden.

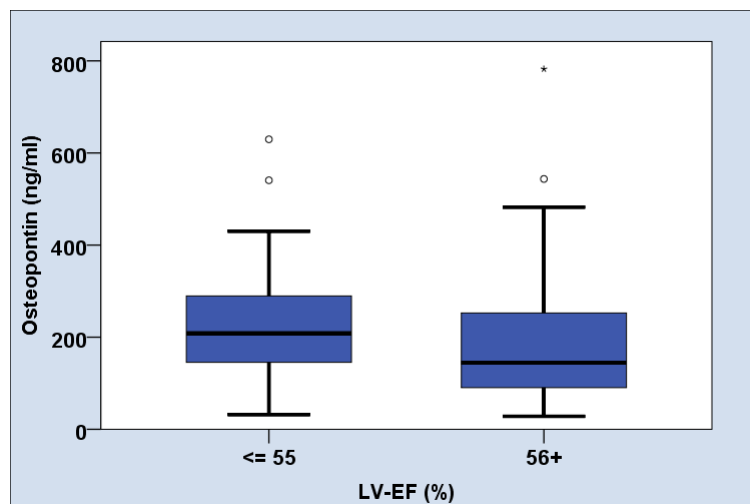


Abb. 17 Osteopontinplasmaspiegel in Bezug auf LVEF

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit LVEF $\leq 55\%$ und LVEF $> 55\%$. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

3.5.3 IVSd

Die Auswertung des IVSd ergab einen MD von 18 mm. Patienten mit einem IVSd ≤ 18 mm präsentierten einen OPN-MD = 200,47 ng/mL, während Patienten > 18 mm einen OPN-MD = 184,97 ng/mL aufwiesen. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Bei einem p-Wert = 0,875 konnte keine Signifikanz von OPN in Bezug auf IVSd nachgewiesen werden.

3.5.4 LVEDD

Der Median bei dem LVEDD betrug 46 mm. Daraus wurde bei der Gruppe mit LVEDD ≤ 46 ein OPN-MD = 205,44 ng/mL und bei der Gruppe mit LVEDD > 46 mm einen OPN-MD = 193,57 ng/mL ermittelt. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Eine Korrelation zwischen OPN und LVEDD ($p = 0,394$) konnte nicht hergestellt werden.

3.5.5 LVPWd

Bei der LVPWd wurde ein MD von 13 mm ermittelt. Probanden mit einem LVPWd ≤ 13 mm zeigten einen OPN-MD = 204,98 ng/mL, während Probanden mit einem LVPWd > 13 mm einen OPN-MD = 185,66 ng/mL aufwiesen. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Auch bei der LVPWd konnte keine Korrelation zu OPN hergestellt werden ($p = 0,993$).

3.5.6 LVMM und der Vergleich zum Normbereich

Der ermittelte MD betrug für die LVMM 357,75 g. Patienten mit einer LVMM $\leq 357,75$ g wiesen einen OPN-MD = 204,98 ng/mL und Patienten mit einer LVMM $> 357,75$ g einen OPN-MD = 193,57 ng/mL auf. Bei lediglich 4,44% der Patienten ($n = 6$) lag der LVMM im Normbereich. Diese Gruppe zeigte einen OPN-MD = 128,94 ng/mL. Bei der Mehrzahl der Patienten (95,56%; $n = 129$) lag der LVMM außerhalb des Normbereiches und ergab einen OPN-MD = 200,43 ng/mL. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 12 zu

entnehmen. Weder bei der LVMM ($p = 0,850$) noch bei dem Vergleich mit dem Normbereich ($p = 0,321$) konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden.

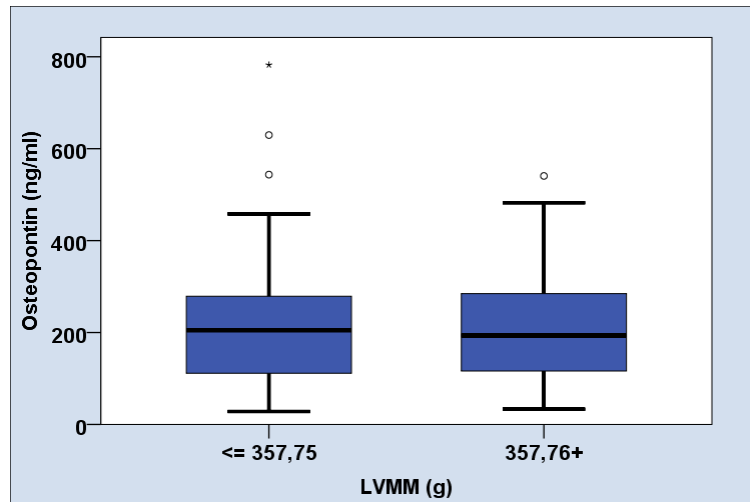


Abb. 18 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlicher LVMM

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN-Plasmaspiegel bei Probanden mit $LVMM \leq 357,75$ g und $LVMM > 357,75$ g. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

3.5.7 RWT

Der initial bestimmte MD betrug bei der RWT 0,55. Die Gruppe mit $RWT \leq 0,55$ präsentierte einen OPN-MD = 186,80 ng/mL und die Gruppe mit $RWT > 0,55$ einen OPN-MD = 207,94 ng/mL. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Bei der Auswertung konnte keine Korrelation ($p = 0,110$) zu OPN gezeigt werden.

3.5.8 Maximale Wanddicke und Summe der LV-Dicke

Im Folgenden wurden die maximale Wanddicke und die Summe der LV-Dicke mit OPN korreliert. Die maximale Wanddicke ergab einen MD von 18 mm und die der Summe der LV-Dicke einen MD von 31 mm. Patienten mit einer maximalen Wanddicke ≤ 18 zeigten eine OPN-MD = 200,47 ng/mL, während die mit einer maximalen Wanddicke von > 18 mm einen

OPN-MD = 185,89 ng/mL zeigten. Bei einer Summe der LV-Dicke ≤ 31 mm konnte ein OPN-MD = 193,57 ng/mL und bei einer Summe der LV-Dicke > 31 mm ein OPN-MD = 202,94 ng/mL ermittelt werden. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Keiner der Parameter konnte mit OPN signifikant korreliert werden (maximale Wanddicke $p=0,804$ und Summe der LV-Dicke $p=0,292$).

3.5.9 LVOTG in Ruhe und unter Provokation

Im Folgenden wurden LVOTG in Ruhe und unter Provokation mit OPN korreliert. In Ruhe ergab sich ein LVOTG-MD = 20 mmHg und unter Provokation ein LVOTG = 74 mmHg. Probanden mit einem LVOTG in Ruhe ≤ 20 mmHg zeigten einen OPN-MD = 170,86 ng/mL, während die Probanden einem LVOTG in Ruhe > 20 einen OPN-MD = 216,98 ng/mL zeigten. Unter Provokation erwiesen Patienten mit einem LVOTG ≤ 74 mmHg einen OPN-MD = 169,75 ng/mL und bei einem LVOTG > 74 mmHg einen OPN-MD = 211,48 ng/mL. Der MW, die SD und die entsprechenden Perzentile sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Weder der LVOTG in Ruhe ($p = 0,062$), noch der LVOTG unter Provokation ($p = 0,055$) konnten mit OPN signifikant korreliert werden. Bei Betrachtung dieser Werte lässt sich ein Trend („grenzwertige Signifikanz“) beobachten. Dieser benötigt eine größere Fallzahl, um eine mögliche Signifikanz nachweisen zu können.

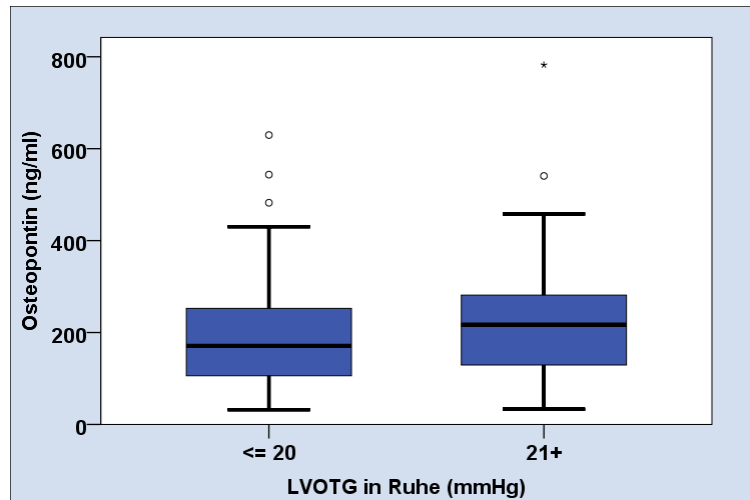


Abb. 19 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlichem LVOTG in Ruhe (mmHg)

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN- Plasmaspiegel bei Probanden mit LVOTG in Ruhe ≤ 20 mmHg und LVOTG in Ruhe > 20 mmHg präsentieren. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

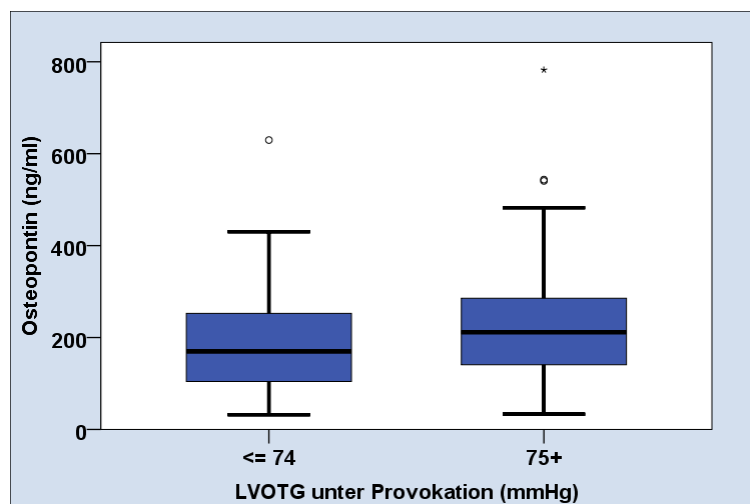


Abb. 20 Osteopontinplasmaspiegel bei unterschiedlichem LVOTG u. Provokation (mmHg)

Die Boxplot-Darstellung zeigt die OPN- Plasmaspiegel bei Probanden mit LVOTG unter Provokation ≤ 74 mmHg und LVOTG unter Provokation > 74 mmHg. Der Grafik sind neben dem MD, der 25. und 75. Perzentile, auch der größte Wert, der kleinste Wert, Ausreißer (Kreis) und Extremwerte (Kreuz) zu entnehmen.

4 Diskussion

4.1 Tragweite der Zielsetzung

Die hypertrophe Kardiomyopathie ist eine global verbreitete Erkrankung. Trotz intensiver Forschung konnten lediglich Hypothesen über die Pathomechanismen, die zur Ausprägung des typischen Phänotyps führen, aufgestellt werden (5). Auch die Bereiche der Diagnostik und Therapie sind von den Grundlagen der Pathomechanismen abhängig. Ein vollständiges Verständnis der pathologischen Vorgänge würde innerhalb der diagnostischen und therapeutischen Verfahren neue Ansatzpunkte bieten. Die Diagnosestellung der HCM erfolgt über eine Reihe überwiegend nicht-invasiver, aber auch invasiver Untersuchungen. Initial werden eine ausführliche Anamneseerhebung und die TTE, einschließlich Stressechokardiographie, zur Diagnostizierung einer HCM herangezogen. Bieten diese Methoden keine ausreichende Aussagekraft oder werden zusätzliche Informationen, insbesondere hinsichtlich der intramyokardialen Fibrose, benötigt, so wird ergänzend ein CMR durchgeführt. All diese Methoden sind mit einem erhöhten zeitlichen und technischen Aufwand verbunden und erfordern ein hohes Maß an Erfahrung der diagnostizierenden Ärzte. Bei der treffsicheren Abgrenzung der HCM von einer Reihe an Differenzialdiagnosen könnte ein routinemäßig einzusetzender Biomarker hilfreich sein. Durch eine möglichst hohe Beständigkeit eines Biomarkers wäre nicht nur eine eindeutige Diagnosestellung wahrscheinlich, sondern auch die genauere Bestimmung des Schweregrades sowie der prognostischen Einschätzung bei HCM denkbar. Ein Biomarker stellt eine Bereicherung innerhalb der Diagnostik dar. Da es bislang keine validierten Biomarker für die HCM gibt, werden potentielle Marker in neuen Studien thematisiert. Osteopontin stellt als Fibrosemarker dabei einen Ansatz dar, dem diese Studie erstmalig nachgeht. Eine positive Korrelation von OPN und den HCM bezogenen Parametern könnte einen neuen Grundstein im diagnostischen Verfahren darstellen, was die Tragweite der Zielsetzung verdeutlicht.

4.2 Ergebnisse

Die vorgelegte Studie bietet erstmalig eine Korrelation von dem Biomarker Osteopontin mit klinisch-diagnostischen Parametern in einem größeren Kollektiv von HCM-Patienten. Demzufolge könnten die erhobenen Ergebnisse neue Grundlagen für künftiges diagnostisches Vorgehen oder Folgestudien darstellen. Eine signifikante Korrelation konnte zwischen OPN und

einem niedrigen BMI, einer fehlenden familiären Disposition für PHT und einer erniedrigten LVEF ermittelt werden. Formal nur ein Trend wurde mit Hinblick auf weibliches Geschlecht, Alter, auf Art des VHF, der Anzahl klassischer HCM-Risikofaktoren und hinsichtlich des LVOTG in Ruhe sowie unter Provokation beobachtet. Dieser Trend könnte bei einer größeren Fallzahl an Signifikanz gewinnen. Im Folgenden werden alle Ergebnisse diskutiert.

4.2.1 Biometrische Parameter

Die i. R. dieses Projektes erhobenen biometrischen Parameter umfassen das Geschlecht, Alter, den BMI und Blutdruck.

Obwohl das hier untersuchte HCM-Patientenkollektiv keine signifikante Korrelation zwischen dem Geschlecht und OPN zeigte, zeichnete sich ein Trend von höheren OPN-Plasmaspiegeln bei Frauen ab. Diese Beobachtung konnte durch andere Studien jedoch nicht belegt werden. Ärnlov et al. untersuchten die Hypothese, dass OPN-Plasmaspiegel im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren, Klappensklerose, Dilatation des LV und LVH stehen könnten. Zusätzlich wurde der Einfluss des Geschlechts auf die erhobenen OPN-Messwerte ermittelt. Dabei konnten erhöhte OPN-Spiegel für die männliche Subgruppen nachgewiesen werden (51). Im weiteren Verlauf untersuchten Abdalrhim et al. den potentiellen Einfluss von OPN auf ungünstige kardiovaskuläre Ereignisse bei Individuen mit einer stabilen koronaren Herzkrankheit (KHK) und erhaltener EF (PEACE Trial; n = 3567 Patienten). Auch i. R. dieser Studie stellten sie einen starken Zusammenhang von OPN zum männlichen Geschlecht fest (52). Überraschenderweise wurde im vorliegenden Projekt eine Tendenz von erhöhten OPN-Werten bei den weiblichen Probanden festgestellt. Dies widerspricht nicht nur anderen Studien i. W., sondern wird durch die Annahme, dass Östrogen die OPN-Expression in der glatten Muskulatur hemme, widerlegt (53).

Sowohl die Studien um Ärnlov et al. als auch der PEACE Trial konnten ebenfalls eine starke Korrelation von OPN zum Alter der Probanden feststellen, indem höhere OPN-Plasmaspiegel mit steigendem Alter beobachtet werden konnten. Ein altersabhängiges Remodeling des kardiovaskulären Systems, Osteoporose und altersbedingte Entzündungsprozesse werden als Erklärungsansätze für die erhöhte OPN-Expression geliefert (52, 54, 55). Miller et al. untersuchten in ihrer Studie den Einfluss des Alters auf vaskuläre Pathologien. Dabei konnten sie eine erhöhte OPN-Sekretion feststellen, die durch eine altersbedingte Erhöhung von oxidativem Stress

in Gefäßen begründet sein könnte (56). Obwohl die vorliegende Studie keine Signifikanz zu Alter aufstellen konnte, so zeichnete sich bei der Betrachtung der altersabhängigen Werte ein Trend ab.

Betrachtet man die Datenlage der Beziehung von OPN zu BMI, so sind die Ergebnisse von Gómez-Ambrosi et al. signifikant. Erstmals konnten erhöhte OPN-Plasmaspiegel bei übergewichtigen/präadipösen ($\text{BMI} = 25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$) und adipösen ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) Menschen ermittelt werden. Während bereits bei Präadipositas ($\text{MD-BMI} = 26,8 \pm 1,6 \text{ kg/m}^2$) eine signifikante OPN-Erhöhung nachzuweisen ist, führt im Gegenzug eine Gewichtsreduktion zu einer Senkung der OPN-Plasmaspiegel. Die Verfasser der Studie vermuten, dass dies den Grund für das verbesserte kardiovaskuläre Profil nach einer Gewichtsreduktion darstellt (57). Entgegen dieser Erkenntnisse und einem durchschnittlich präadipösen BMI des Patientenkollektivs ($\text{MW-BMI} = 27,35 \pm 4,23 \text{ kg/m}^2$), konnte eine Korrelation von OPN zu einem niedrigeren BMI ($p = 0,032$) nachgewiesen werden.

Ein Zusammenhang zwischen OPN und dem Blutdruck wurde schon in zahlreichen Studien beforscht und nachgewiesen. Während Caesar et al. eine Hypertonie bei Mäusen mittels Angiotensin II (Ang II) und Norepinephrine induzierten, setzten Seo et al. die Aorten in Mäusemodellen mechanischem Stress aus. Beide Studien untersuchten anschließend die Sekretion von OPN durch die glatte Muskulatur der Aorta. Es wurde ein signifikanter Anstieg der OPN-Produktion nachgewiesen, was eine Korrelation von OPN zum Bluthochdruck herstellt und auch eine Interaktion mit Mediatoren für Hypertonie, v. a. Ang II, suggeriert (58, 59). Im vorliegenden Projekt konnte eine Korrelation zum Blutdruck nicht bestätigt werden.

4.2.2 Risikostratifizierung

Der plötzliche Herztod stellt mit einer jährlichen Inzidenzrate von $< 1\text{-}2 \%$ eine gefürchtete Folge der HCM dar (7, 60). Bereits 1964 werden erste Assoziationen des PHT zu HCM hergestellt und bewegen Forscher seitdem, eine geeignete Methode zur Risikoeinschätzung für das Eintreten dieses Ereignisses zu ermitteln (61). Es wurden fünf Faktoren definiert, die mit einem erhöhten Risiko für PHT vergesellschaftet sind: familiäre Disposition für PHT, ein Blutdruckabfall unter Belastung, nsVT, eine Synkope in der Vorgeschichte, und der Nachweis einer Septumhypertrophie. Diese sollen der Identifizierung von Hochrisikopatienten für einen PHT dienen, die von einem ICD profitieren könnten. Diese Art der Stratifizierung weist jedoch auch

einige Limitationen auf. So errechnet diese Methode eine relative Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines PHT, jedoch nicht eine patientenbezogene und individuell erhobene Risikoeinschätzung. Zusätzlich werden alle genannten Faktoren gleichgestellt und eine nachgewiesene Risikoerhöhung durch das Voranschreiten bestimmter Risikofaktoren, v.a. der Septumhypertrophie, außer Acht gelassen (7, 62, 63). O'Mahony et al. führten kürzlich eine umfangreiche Studie an 3756 HCM-Patienten durch, bei welcher sie die Anzahl der stattgefundenen PHT festhielten und anhand dieser ein neues Modell der Risikostratifizierung, welches zusätzlich das Alter, die fraktionelle Faserverkürzung, LAD und den maximalen LVOTG berücksichtigt, untersuchten. Im Rahmen dieser Studie wurden auch Prävalenzen der einzelnen Risikofaktoren in Bezug auf den PHT ermittelt. Demnach wiesen ca. 37% der Patienten eine positive Familienanamnese hinsichtlich des PHT bei erstgradigen Verwandten auf. Dimitrow et al. überprüften die Prädiktivität der einzelnen Faktoren für PHT, indem sie diese nach klassischer Art, d.h. bei Erstvorstellung des Patienten in der Klinik, und ab Geburt an bestimmten und anschließend miteinander verglichen. Ungefähr 21% dieser Probanden hatten eine positive Familienanamnese (64). Im Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit wiesen hingegen nur 13,87 % diesen Risikofaktor auf. Überraschenderweise wurde eine signifikante Korrelation zwischen OPN und den Patienten ohne positive Familienanamnese ermittelt ($p = 0,033$). Diese Feststellung lässt sich durch anderweitige Studienergebnisse jedoch nicht belegen. Ein Blutdruckabfall oder unzureichender Blutdruckanstieg unter Belastung wird bei 1/3 der HCM-Patienten beobachtet (7, 64, 65, 65, 66). Dieser Faktor konnte bei lediglich 17,52% der Patienten dieses Projektes ermittelt werden und zeigte gleichzeitig keine Korrelation zum OPN ($p = 0,630$). Bereits 1986 konnte ein häufigeres Vorkommen von nsVTs bei HCM dokumentiert werden (67). Je nach Literaturquelle liegt die Prävalenz von nsVTs bei HCM-Patienten zwischen 17% und 32% (7, 64, 68). Patienten dieser Arbeit zeigten eine erhöhte Prävalenz für das Vorkommen von nsVTs (45,26%). Während Dimitrow et al. eine Prävalenz von 28% für das Auftreten einer Synkope ermittelten, zeigten sich i. R. dieser Studie vergleichbare Werte (33,58%) (64). Dennoch konnte für beide letztere Parameter innerhalb dieser Arbeit keine Korrelation zu OPN nachgewiesen werden (nsVT: $p = 0,983$ und Synkope: $p = 0,215$). Den letzten und wohl einflussreichsten Risikofaktor stellt die Septumhypertrophie ≥ 30 mm dar. Die Angaben bezüglich der Prävalenz variieren je nach Studie zwischen 10% und 18% (64, 69, 70). Trotz vergleichbarem Vorkommen von 9,49% konnte keine Korrelation zu den gemessenen OPN-Werten hergestellt werden ($p = 0,223$).

Betrachtet man die Gesamtzahl der Risikofaktoren, so konnte im vorliegenden Patientenkollektiv ein Trend zur Übereinstimmung mit den OPN-Messwerten ermittelt werden. Dieser zeigt sich vor allem bei Gegenüberstellung der Patienten ohne erruierbare Risikofaktoren mit den Patienten, die lediglich einen Risikofaktor aufweisen. Dieser Trend lässt sich nur bedingt auf die weiteren Gruppen (zwei, drei und vier Risikofaktoren) übertragen. Dies kann einerseits an dem eher gering gehaltenen Patientenkollektiv liegen, andererseits an dem Alter der Plasmaproben. Der potentielle Einfluss, den das Alter der Plasmaproben auf die erhobenen Osteopontinwerte ausüben könnte, wird im entsprechenden Kapitel diskutiert.

Trotz leicht abweichender Prävalenzen kann das Patientenkollektiv dieser Studie als stimmig und hinsichtlich der Risikostratifizierung bei HCM als repräsentativ gewertet werden. Bisher wurde keine vergleichbare Studie durchgeführt, die explizit die individuellen Risikofaktoren für PHT in Bezug zum OPN stellt. Daher liefert das vorliegende Projekt erstmalig solche Ergebnisse und kann zu keinen Vergleichswerten in Bezug gestellt werden.

4.2.3 Vorhofflimmern und NYHA-Stadium

Vorhofflimmern stellt die häufigste Form der Herzrhythmusstörung bei HCM dar (Prävalenz 20%) (46). Obwohl die grundlegenden Signalwege und Mechanismen von VHF noch nicht gänzlich geklärt sind, konnte ein strukturelles Remodeling der betroffenen Herzen festgestellt werden. Das Remodeling ist durch einen fibrotischen Umbau gekennzeichnet, welcher vornehmlich in den Vorhöfen stattfindet (71–73). Xu et al. untersuchten in ihrer Studie das Ausmaß des Remodelings in Abhängigkeit des vorliegenden VHF-Typs (paroxysmal, persistierend und permanent). Anhand explantierter Herzen (bedingt durch eine dilatative Kardiomyopathie [DCM] und Herzinsuffizienz) konnten sie eine vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix (EZM) bei länger anhaltendem VHF nachweisen (74). Eine vermehrte EZM stellt - zusammen mit einer Fibroblastenhyperproliferation und der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten - einen Pathomechanismus als Antwort auf eine Organschädigung dar und resultiert in einer Fibrose (75, 76). Es ist deshalb naheliegend, dass OPN, ein identifizierter Fibrosemarker, für die Forscher des VHF von Interesse ist. J. B. Grammer et al. untersuchten in zwei Studien den Zusammenhang von OPN und VHF. Im ersten Schritt stellten sie fest, dass Patienten mit permanenten VHF erhöhte OPN-Expression im Vergleich zu Patienten mit blander VHF-Anamnese aufweisen. Ein fibrotischer Umbau als Folge des permanenten VHF liefert

dafür eine mögliche Erklärung (77, 78). Eine ihrer Folgestudien befasste sich mit dem Auftreten von postoperativem VHF und der damit verbundenen - Fibrose assoziierten - Genexpression. Patienten mit unauffälliger Anamnese in Bezug auf paroxysmales und permanentes VHF wurden postoperativ (nach Bypassoperation oder Aortenklappenersatz) beobachtet. Bei Auftreten von VHF wurden die betroffenen Patienten mittels Fibrosemarker, u. a. OPN, auf das Entstehen von atrialer Fibrose untersucht. Im Rahmen dessen blieben sowohl OPN als auch die anderen Fibroseparameter unverändert (78).

In dem vorliegenden Patientenkollektiv hatten insgesamt 18 Patienten (13,14%) zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme ein diagnostiziertes VHF. Dabei war bei 61,11% (n = 11) der Patienten ein paroxysmales, bei 16,67% (n = 3) ein persistierendes und bei 22,22% (n = 4) ein permanentes VHF zu verzeichnen. Es konnte weder eine Korrelation von OPN zum VHF ($p = 0,769$) noch eine zu der Art des VHF ($p = 0,807$) hergestellt werden. Während die Literatur eine Korrelation von OPN und permanentem VHF beschreibt, zeigen die betroffenen Patienten i. R. dieses Projektes mehrheitlich ein paroxysmales VHF (77). Dies könnte die fehlende Korrelation zum VHF erklären. Da ein paroxysmales VHF ein sporadisches, kurzzeitiges und selbstlimitierendes Verhalten aufweist (Sistieren meist innerhalb von 48 Stunden), könnte dieses mit dem postoperativen Auftreten von VHF verglichen werden (79). Aufgrund der fehlenden Fibrosierung wurden postoperativ keine erhöhten OPN-Werte gemessen (78). Dies ist auch bei den Patienten mit einem paroxysmalen VHF zu vermuten. Obwohl keine Korrelation von OPN zu der Art des VHF hergestellt werden konnte, so deuten die OPN-MD der einzelnen Gruppen auf tendenziell höhere Werte bei permanentem VHF (paroxysmales VHF OPN-MD = 169,75 ng/mL vs. persistierendes VHF OPN-MD = 215,35 ng/mL vs. permanentes VHF OPN-MD = 289,12 ng/mL) hin, was mit den anderweitigen Studienergebnissen einhergeht. Die Größe des Patientenkollektivs könnte auch in diesem Fall die fehlende Korrelation bedingen.

Auch die Herzinsuffizienz ist durch einen fibrotischen Umbau geprägt. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen bewirken zunächst eine Aufrechterhaltung der LVEF (HFpEF), doch durch eine zunehmende Ablagerung von EZM und der steigenden Expression von sowohl Adhäsionsmolekülen und -proteinen als auch Integrinrezeptoren, kommt es im Verlauf zum Voranschreiten der Herzinsuffizienz und zur Reduktion der LVEF (HFrfEF) (35, 80). Nachdem Singh et al. bereits eine erhöhte Expression von OPN bei herzinsuffizienten Ratten feststellen konnten, prüften P. Stawowy et al., ob diese Erkenntnis auch beim Menschen zutreffen könnte (35, 81). Anhand von 19 an DCM erkrankten Herzen demonstrierten sie, dass eine Korrelation zwischen OPN und dem Schweregrad der Herzinsuffizienz besteht (35). Rosenberg et al. führten eine

umfassende Untersuchung (n = 420) mit der Fragestellung, ob erhöhte OPN-Plasmaspiegel bei chronisch herzinsuffizienten Patienten festzustellen sind und ob diese womöglich eine prognostische Aussagekraft haben könnten, durch (30). Die Probanden litten an einer DCM oder einer ischämischen Herzinsuffizienz und wiesen eine deutlich reduzierte LVEF (< 40%) auf. Eine der zentralen Feststellungen der Studie bestand im Nachweis erhöhter OPN-Plasmaspiegel der an chronischer Herzinsuffizienz - unabhängig der Ätiologie - erkrankten Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Des Weiteren erfolgte eine Zuordnung der Patienten zum entsprechenden NYHA-Stadium, wobei zwei Kohorten gebildet wurden (NYHA 1-2 und NYHA 3-4). Die anschließende Auswertung zeigte, verglichen mit NYHA-Stadium 1 und 2, erhöhte OPN-Werte im NYHA-Stadium 3 und 4. Zusätzlich ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den OPN-Plasmaspiegeln im NYHA Stadium 3 und 4 beweisen, womit eine Korrelation von OPN zum Schweregrad der Herzinsuffizienz erstellt wurde (30). M. Behnes et al. analysierten den diagnostischen und prognostischen Wert von OPN bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (82). Insgesamt 401 Probanden wurden hinsichtlich ihrer systolischen und diastolischen LV-Funktion untersucht. Dabei war festzustellen, dass einerseits Betroffene mit einer systolischen Dysfunktion (LVEF<55%) deutlich höhere OPN-Werte als Patienten mit erhaltener systolischer LV-Funktion aufweisen, und andererseits eine positive Korrelation zu einem höheren NYHA-Stadium besteht (82).

Diese Erkenntnisse liefern Erklärungsansätze, weshalb die vorliegende Studie keine Signifikanz zwischen OPN und dem NYHA-Stadium herstellen konnte (p = 0,130). Während sowohl Rosenberg et al. als auch M. Behnes et al. eine positive Korrelation von OPN zu Parametern, u.a. NYHA-Stadium, bei Patienten mit HFrEF aufweisen, konnte M. Behnes et al. zusätzlich eine Korrelation zur systolischen Dysfunktion herstellen. Im vorliegenden Patientenkollektiv weisen lediglich 3,68% (n=5) eine vergleichbar herabgesetzte LV-Funktion (LVEF<50%) auf. Demnach scheint die Art der Herzinsuffizienz, HFpEF oder HFrEF, ausschlaggebend für die positive Korrelation zu sein.

4.2.4 Echokardiographie-basierte Befunde

Die TTE stellt zum jetzigen Zeitpunkt das Mittel der Wahl zur Diagnostizierung und zum Monitoring von HCM-Patienten dar. Dieses Diagnoseverfahren erlaubt sowohl die Registrierung morphologischer Ausprägungen des Myokards (z. B. LVH) als auch die Beurteilung

hämodynamischer Funktion des Herzens. Überraschenderweise konnte die auf aktueller Datengrundlage basierende Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen LVH und OPN bei HCM-Patienten bestehen könnte, innerhalb dieser Studie nicht bestätigt werden. Parameter, die auf den Grad der LVH hinweisen – LVMM, RWT, Summe der LV-Wanddicke und maximale Wanddicke – zeigten bei erhöhten Werten keine signifikante Korrelation zum OPN. Umso interessanter ist es, dass der LVOTG, welcher durch eine LVH bedingt ist, sowohl in Ruhe ($p = 0,062$) als auch unter Provokation ($p = 0,055$) einen signifikanten Trend aufwies. Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Korrelation zu erniedrigten LVEF ($p = 0,011$). Hingegen konnte für LAD, LVEDD, LVPWd und IVSd keine Signifikanz nachgewiesen werden. Es scheint, dass die volumetrischen und hämodynamischen Parameter – LVEF, LVOTG in Ruhe und unter Provokation – eine signifikante Bedeutung haben. Dies wird durch Stawowy et al. unterstützt, die ihre Studie an herzinsuffizienten Patienten durchgeführt haben und es ihnen dabei – wie bereits in der Einleitung geschildert – gelang, die hämodynamischen Parameter (u.a. LVEF, LVEDVi und LVEDP) positiv mit OPN zu korrelieren. Ärnlov et al. prüften anhand eines präselektierten Patientenkollektivs der Framingham Offspring Studie, ob sich OPN als Screening-Methode zur Detektierung kardiovaskulärer Pathologien (Risikofaktoren, Klappenkalzifizierung, Dilatierung des LV und LVH) eignet (51, 83). Die Auswertungen ergaben eine positive Korrelation zum LVEDD, jedoch nicht zur erhöhten RWT. Dies steht im Widerspruch zu den Annahmen, dass erhöhte OPN-Spiegel zum einen eine LV Dilatation verringern, zum anderen eine vermehrte Ang II-Aktivität und somit eine vermehrte RWT bedingen könnten (51, 84). Die Autoren suggestieren dafür zwei Erklärungsansätze: einerseits könnten die erhöhten OPN-Messwerte eine Reaktion auf einen hämodynamischen Reiz und somit ein Marker – nicht Ursache – für die erhöhten Werte sein, andererseits ist es vorstellbar, dass die OPN induzierte MMP-Aktivierung eine LV-Dilatation begünstigt (51, 85). Obwohl der Erklärungsansatz des hämodynamischen Reizes in Bezug zum LVEDD ausgesprochen wurde, so kann doch übereinstimmend angenommen werden, dass die Hämodynamik eine Auswirkung auf den OPN-Spiegel hat. Die bereits diskutierte Studie von Rosenberg et al. konnte signifikant erhöhte OPN-Werte bei Patienten mit einer eingeschränkten LVEF (HF_rEF) nachweisen. Diese Ergebnisse werden von Behnes et al. unterstützen, die in ihrer – hier bereits erwähnten - Untersuchung einen signifikanten Zusammenhang sowohl zu LVEF als auch zu LVEDD und E/A-Verhältnis herstellen konnten (30, 82). B. López et al. untersuchten bei Patienten mit hypertensiv bedingter Herzinsuffizienz zum einen den potentiellen Zusammenhang von OPN und dem bei der Kollagen Typ 1-Synthese involvierten Enzym procollagen C-proteinase, und zum anderen die Beziehung von

OPN zur Bildung von unlöslichem Kollagen. Sie korrelierten dabei OPN mit diversen, auch in dieser Studie erhobenen, echokardiographischen Parametern. Während sich eine Signifikanz zwischen LVEF und dem im Myokard exprimierten OPN beobachten ließ, konnte keinerlei Korrelation zwischen dem OPN-Plasmaspiegel und den echokardiographischen Parametern (u.a. LVEDD, LVMi und LVEF) bewiesen werden (86).

Obwohl die erwähnten Studien, dieses Projekt miteingeschlossen, sich allesamt an den gleichen echokardiographischen Befunden orientieren und auch den Großteil erhoben haben, weisen die Ergebnisse doch Unterschiede auf. Eine mögliche Erklärung dafür stellt die Art der Untersuchung – die TTE – dar. Wie bereits beschrieben, ist die TTE nicht nur von den Schallbedingungen des Patienten, sondern auch von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Obwohl die Interobserver-Variabilität - wie im vorliegenden Projekt - durch den Einsatz von nur einem Untersucher minimiert werden kann, fällt diese nie gänzlich weg. Diese Variabilität bleibt bei Vergleichen verschiedener Studienergebnisse automatisch bestehen. Mehrere Studien untersuchten die Reproduzierbarkeit der mittels TTE erhobenen Parameter, wobei zum Vergleich der Intraklassen-Korrelationskoeffizient (ICC) herangezogen wurde (87). Palmieri et al. konnten in ihrer PRESERVE (Prospective Randomized Enalapril Study Evaluating Regression of Ventricular Enlargement) Studie eine hohe Reproduzierbarkeit von LVEDD (ICC = 0,87), IVS (ICC = 0,85) und LVPWT (ICC = 0,83) ermitteln (88). Dem gegenüber steht der Vergleich von Lipshultz et al, welche die Zuverlässigkeit der echokardiographischen Untersuchung bei Kindern untersucht haben. Unter Einbezug von 735 Probanden, wurden Messungen an zehn verschiedenen Zentren durchgeführt und anschließend evaluiert. Dabei konnte einerseits eine hohe Reproduzierbarkeit von LVEDD (ICC = 0,97), andererseits eine deutlich niedrigere Reproduzierbarkeit für LVPWT (ICC= 0,65) und IVS (ICC = 0,50) festgestellt werden (89). Diese Beobachtung könnte die Unterschiede in den Studienergebnissen und auch die fehlende Korrelation zur LVH in der vorliegenden Studie erklären.

4.3 Plasmaproben

Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte im Zeitraum vom 08.08.2002 bis 10.10.2007, während die Auswertung zwischen dem 09.02.2015 und dem 16.03.2015 stattfand. Das Alter der Plasmaproben lag somit zwischen ca. 7,5 und 12,5 Jahren. Aufgrund der sicher einwandfreien Blutprobengewinnung und anschließenden Lagerung wurden diese Plasmaproben für das

vorliegende Projekt verwendet. Nach Analyse der Plasmaproben fielen auffällig niedrige OPN-Plasmaspiegel auf, wodurch erstmals der Verdacht auf einen – unter Kryopräservierung - stattgehabten Proteinabbaus aufkam. Somit stellte das Alter der gewonnenen Plasmaproben eine erst im Verlauf deutlich werdende Limitation dieser Studie dar. Im Folgenden werden alle Aspekte dieser Limitation diskutiert.

Um die Stabilität von OPN über diesen Zeitraum gänzlich beurteilen zu können, müssen zunächst die präanalytischen Gegebenheiten evaluiert werden. So kann bereits die Wahl der zu untersuchenden Blutfraktion (Plasma oder Serum, im Falle der hier vorgelegten Arbeit Plasma) die Zeitspanne von der Blutprobenentnahme bis zur Generierung der erforderlichen Probenart mittels Zentrifugierens und die anschließende Lagerungsdauer und -temperatur (z. B. Kurz- oder Langzeitlagerung bei Raumtemperatur, 4°C oder -80°C) bis zur Auswertung oder Kryopräservierung die Osteopontinspiegel beeinflussen.

Osteopontin kann sowohl im Serum als auch, wie bei den uns zur Verfügung gestandenen Proben, im Plasma nachgewiesen werden. Diverse Studien konnten bzgl. OPN eine höhere Stabilität im Plasma als im Serum feststellen. Diesem Umstand wird eine im Serum höhere Thrombinaktivität zugrunde gelegt, die eine Spaltung von OPN initiiert (90–92). Daraus folgt die Empfehlung Plasmaproben für die Messungen von OPN zu verwenden.

Sowohl die Arbeitsgruppen um Boyanton und Blick als auch S.-Y. Hsieh et al konnten in ihrer Studie nachweisen, dass eine Zeitspanne von mehr als 24 Stunden zwischen Blutprobenentnahme und Zentrifugieren einen signifikanten Einfluss auf Proteinkonzentrationen haben kann (93, 94). Lanteri et al. untersuchten umfassend das Verhalten der OPN-Plasma- und Serumspiegel gesunder Personen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aufbewahrung und bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. Innerhalb der Studie wurden die Proben nach 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden bei -80°C eingefroren. Dabei erfolgte die Lagerung der Proben bis zum Einfrieren sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C. Der anschließende Vergleich mit frischen Plasma- und Serumproben zeigte geringe, jedoch nicht signifikante Veränderungen der OPN-Konzentration. Daraus leitet sich eine Stabilität von OPN bei Raumtemperatur und 4°C über einen Zeitraum von 48 Stunden ab und bietet eine ausreichende Zeitspanne zwischen Zentrifugieren und Weiterverarbeitung (91). J. Creaney et al. untersuchten in ihrer Studie u.a. das Verhalten der OPN-Spiegel in gefrorenem Zustand (-80°C) und die Auswirkung wiederholter Frost-Tau-Zyklen. Es zeigten sich trotz zehn durchgeführter Zyklen keine signifikanten Unterschiede im OPN-Spiegel (95).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das präanalytische Vorgehen bei OPN noch nicht ausreichend validiert ist, wird vorwiegend auf die allgemein ausgesprochenen Empfehlungen zum Umgang mit Blutproben zurückgegriffen. Demnach sollten das Zentrifugieren zeitnah zur Blutentnahme und die Kryopräservierung innerhalb von 24 Stunden stattfinden. Durch abweichende Aussagen verschiedener Studien bezüglich des Einflusses von Frost-Tau-Zyklen auf die Proteinkonzentration in einer Plasmaprobe wird empfohlen die Anzahl der Zyklen so gering wie möglich zu halten (96–98). All diese Empfehlungen wurden i. R. dieser Studie umgesetzt, womit ein Einfluss jener Faktoren auf die OPN-Plasmaspiegel weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Die letzte offene Variable, die zu veränderten OPN-Plasmaspiegel beitragen könnte, ist die Dauer der Kryopräservierung. In dem vorliegenden Projekt handelt es sich um eine Langzeitaufbewahrung bei -80°C . Aktuell gibt es zur Stabilität von OPN bei einer Langzeitaufbewahrung keine eindeutige Datenlage. Unter Berücksichtigung der Literatur zur Langzeitaufbewahrung von Proteinen stellt sich eine Notwendigkeit einer Lagerungstemperatur von mindestens -80°C heraus, um eine Stabilität zu gewährleisten (97, 99). Unter diesen Konditionen konnte innerhalb einer Studie die Stabilität von u.a. Albumin, apolipoprotein A-1, apolipoprotein B und des Gesamtproteins für bis zu sechs Jahre nachgewiesen werden (96). Dem gegenüber steht die Forschung von S. Enroth et al., welche eine Langzeitbeobachtung von insgesamt 108 Proteinen über einen Zeitraum von bis zu 30 Jahren durchführten. Von den 108 Proteinen erwiesen 18 (u.a. MMP-7, CA-125 und IL-13) eine Abweichung von 4,9% bis 34,9% zur anfänglichen Plasmakonzentration. Ob es sich dabei um einen Anstieg oder Abbau handelt, ist vom jeweiligen Protein abhängig (100); Osteopontin und seine diesbezüglichen Eigenschaften wurden von Enroth und Kollegen nicht untersucht.

Beurteilt man die OPN-Plasmaspiegel der vorliegenden Studie unter Beachtung dieser Erkenntnisse, so lässt sich ein OPN-Abbau während der langjährigen Kryopräservierung (7,5 bis 12,5 Jahre) vermuten. Diese Annahme könnte durch einen gezielten Vergleich dieser OPN-Plasmaspiegel bei HCM mit denen einer geeigneten Kontrollgruppe untersucht werden. Zum Vergleich wird die gesunde Kontrollgruppe aus der Studie von Rosenberg et al. herangezogen (30). Gegenüberstellungen von OPN-Messwerten innerhalb der Literatur sind allerdings nur bedingt möglich und daher kritisch vorzunehmen. Die Verwendung unterschiedlicher Assays (ELISA Kits) kann zu voneinander abweichenden Ergebnissen führen (101). Die Kontrollgruppe von Rosenberg et al. bietet jedoch neben einem vergleichbaren mittleren Alter (MD=59) auch ein vergleichbares zur OPN-Auswertung verwendetes Assay (gleicher Hersteller mit Benutzung

entsprechender Antikörper). Vergleicht man nun die OPN-Werte des Patientenkollektivs aus dieser Studie mit den Werten der benannten Kontrollgruppe, so zeigen sich innerhalb des an HCM erkrankten Patientenkollektivs deutlich niedrigere Werte (MD=197,88 ng/mL vs. MD=382 ng/mL).

In Anbetracht aller aufgeführten Aspekte muss von einem OPN-Abbau innerhalb der vorliegenden Plasmaproben ausgegangen werden. Diese Tatsache muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, da nicht abgeschätzt werden kann, zu welchem Zeitpunkt der Abbau einsetzt und wie schnell dieser voranschreitet.

4.4 Limitationen der Studie

Neben Alter der Plasmaproben müssen weitere Limitationen dieser Studie berücksichtigt werden.

Auswahl des Patientenkollektivs

Die Auswahl des Patientenkollektivs fand nach den geschilderten Ein- und Ausschluss-kriterien statt. Obwohl zahlreiche Krankheitsbilder bereits positiv mit erhöhten OPN-Spiegeln korreliert wurden, fanden diese keine Berücksichtigung bei den Ausschlusskriterien. Osteoporose, Atherosklerose einschließlich KHK, rheumatoide Arthritis, Karzinome (u.a. ovariales Karzinom, Lungen- und Magenkarzinom), Nierenerkrankungen (u.a. Glomerulonephritis und chronische Niereninsuffizienz), Diabetes Mellitus und Lebererkrankungen (u.a. Hepatitis, hepatische Fibrose und Zirrhose) stellen nur einen Teil dieser Erkrankungen dar (55, 107–115). Das Inkludieren von Patienten mit den aufgeführten Krankheitsleiden könnte zu verfälschten Ergebnissen bei den durchgeführten Korrelationen geführt haben.

Studiendesign und Fallzahl

Die retrospektive Art der Datenerhebung führte partiell zu lückenhaften Angaben individueller Patienten. Nicht alle Probanden konnten Angaben zu allen erhobenen Parametern vorweisen, was zu unterschiedlichen Fallzahlen bei den einzelnen Parametern führte. Diese Tatsache erscheint relevant, da diese Studie ohnehin ein kleines Patientenkollektiv (n=137) aufführte. Die

statistische Analyse führte z. T. zur Entstehung kleiner Kohorten, die eine große Streumaße aufwiesen. Dementsprechend könnte die Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt sein.

Fehlende Kontrollgruppe

Durch eine fehlende Kontrollgruppe war es nur möglich die einzelnen Parameter innerhalb der studieneigenen Kohorten zu evaluieren. Durch die Gegenüberstellung zweier entstandener Gruppen – größer und kleiner zum ermittelten MD – könnten ungenauere Ergebnisse erhoben worden sein als bei einer Korrelation zu einem gesunden Patientenkollektiv.

4.5 Ansatzpunkte für die Zukunft

Obwohl die Ergebnisse dieser Studie aufgrund des anzunehmenden Osteopontinabbaus kritisch zu bewerten sind, bieten sich Ansatzpunkte für die Zukunft, denen Folgestudien nachgehen sollten. Dabei sollte die häufig beobachtete große Streumaße der Ergebnisse – i. S. von Standardabweichungen und Quartilen, die der jeweiligen Tabelle entnommen werden können - und die angedeuteten Trends bei der Korrelation berücksichtigt werden. Sowohl die Streumaße als auch die angedeuteten Trends weisen darauf hin, dass künftig eine größere Fallzahl verwendet werden sollte.

Trotz der Limitationen zeigen die volumetrischen Parameter – insbesondere die LVEF – bei Korrelation zu OPN eine Signifikanz. Diese Feststellung sollte in Folgestudien nicht nur bestätigt, sondern weiter ausgebaut werden. Da Herzinsuffizienz bei HCM einer anhaltenden Progression unterliegt bzw. bei bis zu 10% der HCM-Patienten in eine HFrEF resultiert, ist eine Gegenüberstellung von OPN zu HFrEF relevant und würde die prognostische Bedeutung von OPN unterauern..

Einen interessanten Aspekt bietet auch die Aussage von Armstrong et al., die einen literaturbasierten Vergleich von 2D-TTE und CMR zur Messung von LVMM vorgenommen haben (87). Obwohl die 2D-TTE im klinischen Alltag mehr praktikabel ist, schlussfolgerten sie u.a., dass die CMR bei klinischen Studien - wo eine hohe Genauigkeit und Replizierbarkeit erforderlich ist - Anwendung finden sollte. Diese Notwendigkeit besteht bei der HCM, da die charakteristische asymmetrische Septumhypertrophie und damit verbundene LVMM mittels TTE oftmals nicht akkurat bestimmt bzw. sogar überschätzt wird (102, 103). Bisläng wurde keine Studie

durchgeführt, die diese zwei Methoden - in Bezug auf die LVMM Bestimmung – direkt gegenüberstellt. Während Bottini et al. eine präzisere LVMM-Messung mittels CMR suggestieren, konnten Grotheus et al. eine überlegene Reproduzierbarkeit der CMR bei normalen, insuffizienten, und hypertrophierten Herzen feststellen (102, 104). Auch Supe-Markovina et al. konnten eine Überschätzung der LVMM mittels TTE in hypertensiven Kinderherzen erkennen (103). Diese Erkenntnisse machen eine Korrelation von OPN und der mittels CMR erhobenen Parameter - zur Bestimmung der LVMM und Determinierung von LVH - in Folgestudien sinnvoll. Neben der 2D-TTE und CMR wird auch die 3D-TTE als alternatives Diagnostikum anerkannt. Obwohl diverse Studien eine vergleichbare Aussagekraft der 3D-TTE zu CMR ermitteln konnten, verlangsamt der technische und finanzielle Aspekt die flächendeckende Ausbreitung dieser Methode (87, 105). Es ist abzuwarten, wann die 3D-TTE als standardisiertes Diagnostikum bei HCM-Patienten eingesetzt wird.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurde gezeigt, dass OPN durch die proteolytische Wirkung von u. a. Thrombin und MMP-7 gespalten wird. Studien zeigen, dass die gespaltene Form des OPN eine erhöhte Aktivität im Vergleich zum Vollängenprotein aufweist (106). Des Weiteren werden erst bei der Spaltung durch Thrombin Bindungsstellen freigelegt, die für den Adhäsionsprozess relevant sind (25). Es stellt sich die Frage, ob und inwiefern das gespaltene OPN auch bei der HCM einen Einfluss hat. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das in dieser Studie verwendete OPN-Kit das durch Thrombin gespaltene OPN nicht erfasst, gewinnt diese Fragestellung nochmals an Belang.

Diese Pilotstudie hat gezeigt, dass sich OPN als Biomarker für die HCM eignen könnte. Die sowohl nachgewiesenen als auch angedeuteten Korrelationen zwischen OPN und klinisch-diagnostischen Parametern der HCM müssen jedoch aufgrund des Alters der Plasmaproben kritisch interpretiert werden. Es empfiehlt sich daher den gewonnenen Erkenntnissen nun in Folgestudien – unter Vermeidung insbesondere der aktuell limitierenden Momente – nachzugehen.

5 Zusammenfassung

Die hypertrophe Kardiomyopathie stellt die häufigste genetische Herzerkrankung (Prävalenz 1:500) dar und ist durch eine interindividuell variable Hypertrophie des linken Ventrikels geprägt. Neben symptomarmen Verläufen, können eine progrediente Herzinsuffizienz, vermehrtes Auftreten von Vorhofflimmern mit den daraus resultierenden Folgen, und der plötzliche Herztod beobachtet werden. Angesichts der stark variierenden Symptomatik und möglichen Krankheitsprogression der HCM ist die eindeutige Diagnosestellung von prognostischer Bedeutung. Hierzu dient eine initial umfassende Anamneseerhebung mit folgender transthorakaler Echokardiographie. Unterstützt werden diese bei Bedarf durch die kardiale Magnetresonanztomographie und eine Herzkatheteruntersuchung. Trotz zahlreicher Studien gibt es bislang keine biologischen Marker, die für die HCM validiert werden konnten. Ein Biomarker würde eine objektive und einfache Untersuchung erlauben, die unabhängig vom Erfahrungsgrad des Untersuchers eine sichere Diagnose oder Prognoseeinschätzung erlauben würde.

Diese Studie setzte sich zum Ziel, den Einsatz des Glykoproteins Osteopontin als potentiellen Biomarker für die HCM zu untersuchen. Osteopontin ist ein bereits umfassend erforschter Biomarker, der mit zahlreichen Pathologien, u.a. der linksventrikulären Hypertrophie, korreliert wurde. Um die Einsetzbarkeit als Biomarker zu prüfen, wurden Zusammenhänge von Osteopontinplasmaspiegeln mit klinisch-diagnostischen Parametern der HCM untersucht. Diese Parameter umfassten sowohl biometrische und echokardiographisch erhobene Parameter als auch für die HCM charakteristische Risikostratifizierung, das VHF und die NYHA-Einteilung.

Die statistische Analyse ergab einerseits eine Korrelation zum niedrigeren BMI und einen Trend für erhöhte OPN-Spiegel beim weiblichen Geschlecht - beides Ergebnisse, die im Widerspruch zur aktuellen Datenlage stehen. Andererseits konnte eine signifikante Abhängigkeit zu erniedrigter linksventrikulärer Ejektionsfraktion und ein signifikanter Trend bei einem erhöhten Gradienten der linksventrikulären Ausflussbahn in Ruhe und unter Provokation festgestellt werden. Diese Erkenntnisse werden durch vorangegangene Studien, die i. R. anderer kardialer Erkrankungen durchgeführt wurden, unterstützt. Die erhoffte Korrelation von OPN zur linksventrikulären Hypertrophie konnte im vorliegenden Projekt nicht nachgewiesen werden.

Die hier bestimmten Korrelationen müssen kritisch interpretiert werden, da das Alter der gesammelten Plasmaproben zwischen 7,5 und 12,5 Jahren lag, was in unerwartet niedrigeren OPN-Plasmaspiegeln der Patienten resultierte. Dies ließ die Vermutung eines – unter Kryopräservierung stattgehabten – Osteopontinabbaus zu. Aufgrund der heute noch gänzlich fehlenden

zitäblen Datenlage zum Proteinabbau unter Langzeitlagerung kann nicht abgeschätzt werden, wann der Abbauprozess eintritt und inwieweit dieser voranschreitet. Demnach sind unsere Korrelationen von eingeschränkter Aussagekraft.

Auch angesichts von Limitationen bieten die Ergebnisse dieser Studie eine Grundlage für Folgestudien, denen nachgegangen werden sollte. Die Annahme, dass sich OPN als Biomarker für die HCM eignen könnte, wurde i. R. dieser Studie angedeutet und sollte an größeren Fallzahlen weiter erforscht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006; 113(14):1807–16.
2. Kuhl C, Luedde M, Langer C, Frey N. Aktuelle Diagnostik und Therapie hypertrophischer Kardiomyopathien. *Dtsch Med Wochenschr* 2013; 138(12):583–8.
3. Ho CY. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2010; 122(23):2430-40; discussion 2440.
4. Parato VM, Antoncicchi V, Sozzi F, Marazia S, Zito A, Maiello M et al. Echocardiographic diagnosis of the different phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Ultrasound* 2016; 14(1):30.
5. Frey N, Luedde M, Katus HA. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 2011; 9(2):91–100.
6. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE et al. American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(9):1687–713.
7. Elliott PM, Anastakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2014; 35(39):2733–79.
8. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy (JCS 2012)- Digest Version. *Circ J* 2016; 80(3):753–74.
9. Erdmann E. *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. 8., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011;142,337-341.

10. Maron BJ. The electrocardiogram as a diagnostic tool for hypertrophic cardiomyopathy: revisited. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2001; 6(4):277–9.
11. *Journal für Kardiologie: Österreichische Zeitschrift für Herz-Kreislaferkrankungen = Austrian journal of cardiology*. Gablitz: Krause & Pachernegg GmbH Verl. für Medizin und Wirtschaft; 1994.
12. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5(6):463–6.
13. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3):89–95.
14. Salter H, Holland R. Biomarkers: refining diagnosis and expediting drug development - reality, aspiration and the role of open innovation. *J Intern Med* 2014; 276(3):215–28.
15. Dimitrow PP. Current and future roles of biochemical biomarkers in hypertrophic cardiomyopathy. *Biomark Med* 2014; 8(1):81–3.
16. Coats CJ, Elliott PM. Genetic biomarkers in hypertrophic cardiomyopathy. *Biomark Med* 2013; 7(4):505–16.
17. Elmas E, Doesch C, Fluechter S, Freundt M, Weiss C, Lang S et al. Midregional pro-atrial natriuretic peptide: a novel marker of myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiovasc Imaging* 2011; 27(4):547–56.
18. Yakar Tuluçe S, Tuluçe K, Cil Z, Emren SV, Akyıldız ZI, Ergene O. Galectin-3 levels in patients with hypertrophic cardiomyopathy and its relationship with left ventricular mass index and function. *Anatol J Cardiol* 2016; 16(5):344–8.
19. Sase SP, Ganu JV, Nagane N. Osteopontin: A Novel Protein Molecule. *Indian Medical Gazette* February 2012:62–6.
20. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(2):460–5.
21. Gürsoy G, Acar Y, Alagöz S. Osteopontin: A multifunctional molecule. *Journal of Medicine and Medical Sciences* April 2010; (Vol 1 (3)):55–60.

-
22. Cabiati M, Svezia B, Matteucci M, Botta L, Pucci A, Rinaldi M et al. Myocardial Expression Analysis of Osteopontin and Its Splice Variants in Patients Affected by End-Stage Idiopathic or Ischemic Dilated Cardiomyopathy. *PLoS One* 2016; 11(8):e0160110.
 23. Gressner AM, Arndt T. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2013;1029-1030.
 24. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(11):2302–9.
 25. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal* 2009; 3(3-4):311–22.
 26. SP Gregor, V Alla, J Kuball, PR Galle, D Strand, S Strand. Die Spaltung von Osteopontin durch MMP–7 verändert die Interaktion zwischen zytotoxischen T-Zellen und HepG2-Zellen. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2005; (Vol. 43).
 27. Heinegard D, Hultenby K, Oldberg A, Reinholt F, Wendel M. Macromolecules in bone matrix. *Connect Tissue Res* 1989; 21(1-4):3-11; discussion 12-4.
 28. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; 92(4):1686–96.
 29. Hu Z-D, Wei T-T, Yang M, Ma N, Tang Q-Q, Qin B-D et al. Diagnostic value of osteopontin in ovarian cancer: a meta-analysis and systematic review. *PLoS One* 2015; 10(5):e0126444.
 30. Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, Juenger C, Frank D, Remppis A et al. Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2008; 1(1):43–9.
 31. Roderburg C, Benz F, Cardenas DV, Lutz M, Hippe H-J, Luedde T et al. Persistently elevated osteopontin serum levels predict mortality in critically ill patients. *Crit Care* 2015; 19:271.

32. Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC et al. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1997; 96(9):3063–71.
33. Zahradka P. Novel role for osteopontin in cardiac fibrosis. *Circ Res* 2008; 102(3):270–2.
34. Singh M, Foster CR, Dalal S, Singh K. Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48(3):538–43.
35. Stawowy P, Blaschke F, Pfautsch P, Goetze S, Lippek F, Wollert-Wulf B et al. Increased myocardial expression of osteopontin in patients with advanced heart failure. *Eur J Heart Fail* 2002; 4(2):139–46.
36. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA et al. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 2006; 7(2):79–108.
37. Flachskampf FA. Kursbuch Echokardiografie: Unter Berücksichtigung der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie ; ... 43 Tabellen ; [inkl. DVD-ROM]. 5., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012;47-49.
38. Maron MS, Olivetto I, Betocchi S, Casey SA, Lesser JR, Losi MA et al. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003; 348(4):295–303.
39. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 2009; 10(2):165–93.
40. Kruck I, Wilkenshoff U. Handbuch der Echokardiographie. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. s.l.: Thieme; 2008;13-17,263-264.
41. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull World Health Organ* 1976; 54(2):129–39.
42. Gey MH. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. 3. Aufl. Berlin: Springer Spektrum; 2015;402-404.
43. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978; 31(6):507–20.

-
44. Crowther JR. The ELISA guidebook. 2. ed. New York NY: Humana Press; 2009. (Methods in molecular biology; vol 516);18.
 45. DeGraff, Arthur C., et al. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart. 4th Edition. New York: New York Heart Association 1947;72-73.
 46. Siontis KC, Geske JB, Ong K, Nishimura RA, Ommen SR, Gersh BJ. Atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: prevalence, clinical correlations, and mortality in a large high-risk population. *J Am Heart Assoc* 2014; 3(3):e001002.
 47. MacIntyre C, Lakdawala NK. Management of Atrial Fibrillation in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 2016; 133(19):1901–5.
 48. Devereux RB. Detection of left ventricular hypertrophy by M-mode echocardiography. Anatomic validation, standardization, and comparison to other methods. *Hypertension* 1987; 9(2 Pt 2):III19-26.
 49. Sjogren AL. Left ventricular wall thickness determined by ultrasound in 100 subjects without heart disease. *Chest* 1971; 60(4):341–6.
 50. Flachskampf FA, Angermann CE, editors. Praxis der Echokardiografie: Das Referenzwerk zur echokardiografischen Diagnostik ; 68 Tabellen ; [inklusive DVD]. 3., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011.
 51. Arnlov J, Evans JC, Benjamin EJ, Larson MG, Levy D, Sutherland P et al. Clinical and echocardiographic correlates of plasma osteopontin in the community: the Framingham Heart Study. *Heart* 2006; 92(10):1514–5.
 52. Abdalrhim AD, Marroush TS, Austin EE, Gersh BJ, Solak N, Rizvi SA et al. Plasma Osteopontin Levels and Adverse Cardiovascular Outcomes in the PEACE Trial. *PLoS One* 2016; 11(6):e0156965.
 53. Li G, Chen Y-F, Kelpke SS, Oparil S, Thompson JA. Estrogen Attenuates Integrin- 3-Dependent Adventitial Fibroblast Migration After Inhibition of Osteopontin Production in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* 2000; 101(25):2949–55.
 54. Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 93:175–85.

-
55. Chang I-C, Chiang T-I, Yeh K-T, Lee H, Cheng Y-W. Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteoporos Int* 2010; 21(8):1401–9.
56. Miller SJ, Watson WC, Kerr KA, Labarrere CA, Chen NX, Deeg MA et al. Development of progressive aortic vasculopathy in a rat model of aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(5):H2634-43.
57. Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Ramirez B, Rodriguez A, Colina I, Silva C et al. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(9):3719–27.
58. Caesar C, Lyle AN, Joseph G, Weiss D, Alameddine FMF, Lassègue B et al. Cyclic Strain and Hypertension Increase Osteopontin Expression in the Aorta. *Cel. Mol. Bioeng.* 2016.
59. Seo KW, Lee SJ, Ye BH, Kim YW, Bae SS, Kim CD. Mechanical stretch enhances the expression and activity of osteopontin and MMP-2 via the Akt1/AP-1 pathways in VSMC. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 85:13–24.
60. Elliott PM, Gimeno JR, Thaman R, Shah J, Ward D, Dickie S et al. Historical trends in reported survival rates in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 2006; 92(6):785–91.
61. BRAUNWALD E, LAMBREW CT, ROCKOFF SD, ROSS J, MORROW AG. Idiopathic Hypertrophic Subaortic Stenosis: I. A Description of the Disease Based Upon an Analysis of 64 Patients. *Circulation* 1964; 29(5S4):IV-3-IV-119.
62. O'Mahony C, Tome-Esteban M, Lambiase PD, Pantazis A, Dickie S, McKenna WJ et al. A validation study of the 2003 American College of Cardiology/European Society of Cardiology and 2011 American College of Cardiology Foundation/American Heart Association risk stratification and treatment algorithms for sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 2013; 99(8):534–41.
63. Elliott PM, Gimeno Blanes JR, Mahon NG, Poloniecki JD, McKenna WJ. Relation between severity of left-ventricular hypertrophy and prognosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2001; 357(9254):420–4.

-
64. Dimitrow PP, Chojnowska L, Rudzinski T, Piotrowski W, Ziolkowska L, Wojtarowicz A et al. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: old risk factors re-assessed in a new model of maximalized follow-up. *Eur Heart J* 2010; 31(24):3084–93.
65. Heradien M, Revera M, van der Merwe L, Goosen A, Corfield VA, Brink PA et al. Abnormal blood pressure response to exercise occurs more frequently in hypertrophic cardiomyopathy patients with the R92W troponin T mutation than in those with myosin mutations. *Heart Rhythm* 2009; 6(11 Suppl):S18-24.
66. Counihan PJ, Frenneaux MP, Webb DJ, McKenna WJ. Abnormal vascular responses to supine exercise in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1991; 84(2):686–96.
67. McKenna WJ, England D, Doi YL, Deanfield JE, Oakley C, Goodwin JF. Arrhythmia in hypertrophic cardiomyopathy. I: Influence on prognosis. *Br Heart J* 1981; 46(2):168–72.
68. Monserrat L, Elliott PM, Gimeno JR, Sharma S, Penas-Lado M, McKenna WJ. Non-sustained ventricular tachycardia in hypertrophic cardiomyopathy: an independent marker of sudden death risk in young patients. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(5):873–9.
69. Spirito P, Bellone P, Harris KM, Bernabo P, Bruzzi P, Maron BJ. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000; 342(24):1778–85.
70. Elliott PM, Poloniecki J, Dickie S, Sharma S, Monserrat L, Varnava A et al. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: identification of high risk patients. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(7):2212–8.
71. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(8):802–9.
72. Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; 54(2):230–46.
73. Hanna N, Cardin S, Leung T-K, Nattel S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2004; 63(2):236–44.
74. Xu J, Cui G, Esmailian F, Plunkett M, Marelli D, Ardehali A et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* 2004; 109(3):363–8.

-
75. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 2011; 4(2):165–78.
76. Francia P, Uccellini A, Frattari A, Modestino A, Ricotta A, Balla C et al. Extracellular matrix remodelling in myocardial hypertrophy and failure: Focus on osteopontin. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2009; 16(4):195–9.
77. Grammer JB, Böhm J, Lange R, Bauernschmitt R. Identification of genes associated with persistent atrial fibrillation using oligonucleotide microarrays. *J Mol Cell Cardiol* 2004; (37):267–268 [abstract].
78. Grammer JB, Bohm J, Dufour A, Benz M, Lange R, Bauernschmitt R. Atrial fibrosis in heart surgery patients Decreased collagen III/I ratio in postoperative atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2005; 100(3):288–94.
79. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GYH, Schotten U, Savelieva I, Ernst S et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2010; 31(19):2369–429.
80. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012; 33(14):1787–847.
81. Singh K, Sirokman G, Communal C, Robinson KG, Conrad CH, Brooks WW et al. Myocardial Osteopontin Expression Coincides With the Development of Heart Failure. *Hypertension* 1999; 33(2):663–70.
82. Behnes M, Brueckmann M, Lang S, Espeter F, Weiss C, Neumaier M et al. Diagnostic and prognostic value of osteopontin in patients with acute congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2013; 15(12):1390–400.
83. KANNEL WB, FEINLEIB M, McNAMARA PM, GARRISON RJ, CASTELLI WP. AN INVESTIGATION OF CORONARY HEART DISEASE IN FAMILIES. *American Journal of Epidemiology* 1979; 110(3):281–90.

-
84. Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L et al. Exaggerated Left Ventricular Dilation and Reduced Collagen Deposition After Myocardial Infarction in Mice Lacking Osteopontin. *Circ Res* 2001; 88(10):1080–7.
85. Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760:109–26.
86. Lopez B, Gonzalez A, Lindner D, Westermann D, Ravassa S, Beaumont J et al. Osteopontin-mediated myocardial fibrosis in heart failure: a role for lysyl oxidase? *Cardiovasc Res* 2013; 99(1):111–20.
87. Armstrong AC, Gidding S, Gjesdal O, Wu C, Bluemke DA, Lima JAC. LV mass assessed by echocardiography and CMR, cardiovascular outcomes, and medical practice. *JACC Cardiovasc Imaging* 2012; 5(8):837–48.
88. Palmieri V, Dahlöf B, DeQuattro V, Sharpe N, Bella JN, Simone G de et al. Reliability of echocardiographic assessment of left ventricular structure and function. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(5):1625–32.
89. Lipshultz SE, Easley KA, Orav EJ, Kaplan S, Starc TJ, Bricker JT et al. Reliability of Multicenter Pediatric Echocardiographic Measurements of Left Ventricular Structure and Function: The Prospective P2C2 HIV Study. *Circulation* 2001; 104(3):310–6.
90. Grigoriu B-D, Scherpereel A, Devos P, Chahine B, Letourneux M, Lebailly P et al. Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment. *Clin Cancer Res* 2007; 13(10):2928–35.
91. Lanteri P, Lombardi G, Colombini A, Grasso D, Banfi G. Stability of osteopontin in plasma and serum. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(11):1979–84.
92. Cristaudo A, Foddìs R, Bonotti A, Simonini S, Vivaldi A, Guglielmi G et al. Comparison between plasma and serum osteopontin levels: usefulness in diagnosis of epithelial malignant pleural mesothelioma. *Int J Biol Markers* 2010; 25(3):164–70.
93. Boyanton BL, JR, Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem* 2002; 48(12):2242–7.

-
94. Hsieh S-Y, Chen R-K, Pan Y-H, Lee H-L. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *Proteomics* 2006; 6(10):3189–98.
95. Creaney J, Yeoman D, Musk AW, Klerk N de, Skates SJ, Robinson BWS. Plasma versus serum levels of osteopontin and mesothelin in patients with malignant mesothelioma--which is best? *Lung Cancer* 2011; 74(1):55–60.
96. Elliott P, Peakman TC. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol* 2008; 37(2):234–44.
97. Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters HV et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem* 2014; 47(4-5):258–66.
98. Tuck MK, Chan DW, Chia D, Godwin AK, Grizzle WE, Krueger KE et al. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J Proteome Res* 2009; 8(1):113–7.
99. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res* 2003; 543(3):217–34.
100. Enroth S, Hallmans G, Grankvist K, Gyllensten U. Effects of Long-Term Storage Time and Original Sampling Month on Biobank Plasma Protein Concentrations. *EBioMedicine* 2016; 12:309–14.
101. Vordermark D, Said HM, Katzer A, Kuhnt T, Hansgen G, Dunst J et al. Plasma osteopontin levels in patients with head and neck cancer and cervix cancer are critically dependent on the choice of ELISA system. *BMC Cancer* 2006; 6:207.
102. BOTTINI P, CARR A, PRISANT L, FLICKINGER F, ALLISON J, GOTTDIENER J. Magnetic resonance imaging compared to echocardiography to assess left ventricular mass in the hypertensive patient. *American Journal of Hypertension* 1995; 8(3):221–8.

-
103. Supe-Markovina K, Nielsen JC, Musani M, Panesar LE, Woroniecki RP. Assessment of Left Ventricular Mass and Hypertrophy by Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Pediatric Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2016; 18(10):976–81.
104. Grothues F, Smith GC, Moon JCC, Bellenger NG, Collins P, Klein HU et al. Comparison of interstudy reproducibility of cardiovascular magnetic resonance with two-dimensional echocardiography in normal subjects and in patients with heart failure or left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol* 2002; 90(1):29–34.
105. Soliman OII, Kirschbaum SW, van Dalen BM, van der Zwaan HB, Mahdavian Delavary B, Vletter WB et al. Accuracy and reproducibility of quantitation of left ventricular function by real-time three-dimensional echocardiography versus cardiac magnetic resonance. *Am J Cardiol* 2008; 102(6):778–83.
106. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 1999; 162(2):1024–31.
107. Abdel-Azeez HA-H, Al-Zaky M. Plasma osteopontin as a predictor of coronary artery disease: association with echocardiographic characteristics of atherosclerosis. *J Clin Lab Anal* 2010; 24(3):201–6.
108. Zhang F, Luo W, Li Y, Gao S, Lei G. Role of osteopontin in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2015; 35(4):589–95.
109. Lan Z, Fu D, Yu X, Xi M. Diagnostic values of osteopontin combined with CA125 for ovarian cancer: a meta-analysis. *Fam Cancer* 2016; 15(2):221–30.
110. Rud AK, Boye K, Oijordsbakken M, Lund-Iversen M, Halvorsen AR, Solberg SK et al. Osteopontin is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2013; 13:540.
111. Liu J, Liu Q, Wan Y, Zhao Z, Yu H, Luo H et al. Osteopontin promotes the progression of gastric cancer through the NF-kappaB pathway regulated by the MAPK and PI3K. *Int J Oncol* 2014; 45(1):282–90.

112. Narita I, Nakayama H, Goto S, Takeda T, Sakatsume M, Saito A et al. Identification of genes specifically expressed in chronic and progressive glomerulosclerosis. *Kidney Int Suppl* 1997; 63:S215-7.
113. Barreto DV, Lenglet A, Liabeuf S, Kretschmer A, Barreto FC, Nollet A et al. Prognostic implication of plasma osteopontin levels in patients with chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 2011; 117(4):c363-72.
114. Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab* 2014; 3(4):384–93.
115. Wen Y, Jeong S, Xia Q, Kong X. Role of Osteopontin in Liver Diseases. *Int J Biol Sci* 2016; 12(9):1121–8.

7 Anhang

NYHA Stadium	Definition
I	Keine Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit; Patient verneint das Auftreten einer Beschwerdesymptomatik
II	Leichte Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit; Beschwerdesymptomatik tritt bei alltäglicher Belastung, jedoch nicht in Ruhe auf
III	Deutliche Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit; Beschwerdesymptomatik tritt bei geringer physischer Belastung, jedoch nicht in Ruhe auf
IV	Jegliche physische Belastung führt zur progredienter Beschwerdesymptomatik, Symptome auch in Ruhe möglich

Tab. 2 NYHA-Stadien modifiziert nach Leitlinien Herzinsuffizienz

NYHA-Stadium	Etagenanzahl
I	keine Limitation
II	2-3
III	1-1,5
IV	Treppensteigen nicht möglich

Tab. 3 NYHA-Stadium anhand der gestiegenen Etagenanzahl

Parameter	Anzahl einbezogener Patienten (n)	Median (MD)
Patienten	137	
Biometrische Parameter		
Geschlecht	Männer = 94	
Alter	137	51 Jahre
BMI	137	26,72 kg/m ²
RR systolisch	136	129 mmHg
RR diastolisch	136	75 mmHg
Risik stratifizierung		
Familiäre Disposition für PHT	137; ja = 118 nein = 19	
RR-Abfall unter Belastung	137; ja = 24 nein = 113	
Langzeitelektrokardiographisch erfasste nsVTs	137; ja = 62 nein = 75	
Synkope in der Vorgeschichte	137; ja = 46 nein = 91	
Septumhypertrophie ≥ 30 mm	137; ja = 13 nein = 124	
Risikofaktoren insgesamt	137; 0 = 41 1 = 41 2 = 45 3 = 8 4 = 2 5 = 0	
NYHA-Stadium	136; NYHA I-II = 82 NYHA III-IV = 54	
VHF „at Baseline“	137; ja = 18 nein = 119	
Paroxysmales VHF	11	
Persistierendes VHF	3	
Permanentes VHF	4	

Parameter	Anzahl einbezogener Patienten (n)	Median (MD)
Echokardiographisch erhobene Befunde		
LAD	137	47 mm
LVEF	135	55 %
IVSd	136	18 mm
LVEDD	136	46 mm
LVPWd	135	13 mm
LVMM	135	357,75 mm
LVMM normal?	135; ja = 6 nein = 129	
RWT	135	0,55
Maximale Wanddicke	135	18 mm
Summe der LV-Wanddicke	135	31 mm
LVOTG in Ruhe	126	20 mmHg
LVOTG unter Provokation	118	74 mmHg

Tab. 4 Zusammenfassung studienrelevanter Parameter

Aufgeführt sind alle innerhalb der Studie erhobenen Parameter. Zusätzlich beigefügt sind der MD und die Anzahl der Patienten, dessen Werte in die statistische Analyse einbezogen wurden.

	Osteopontin (ng/mL)					
	Geschlecht		Alter (Jahre)		BMI (kg/m ²)	
	W	M	> 51	≤ 51	≤ 26,72	> 26,72
MW	236,86	201,67	229,85	195,83	242,39	183,48
SD	137,40	125,08	137,50	119,92	152,11	95,12
25. P.	129,27	106,20	134,73	108,67	120,34	106,42
MD	221,83	186,35	203,61	175,47	212,01	186,80
75. P.	292,12	255,43	284,24	255,43	328,79	238,36
p-Wert	0,095		0,144		0,032	

Tab. 5 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht, Alter und BMI.

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

	Osteopontin (ng/mL)			
	Systolischer Blutdruck (mmHg)		Diastolischer Blutdruck (mmHg)	
	≤ 129	> 129	≤ 75	> 75
MW	211,77	216,28	228,18	199,45
SD	143,33	114,31	142,97	112,45
25. P.	110,93	115,66	124,75	106,20
MD	178,34	208,14	197,88	200,43
75. P.	285,57	277,71	281,49	276,73
p-Wert	0,426		0,412	

Tab. 6 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit vom systolischen und diastolischen RR

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

	Osteopontin (ng/mL)					
	Familiäre Disposition für PHT		Blutdruckabfall unter Belastung		Septumdicke (mm)	
	nein	ja	nein	ja	≥ 30	> 30
MW	220,89	161,96	211,76	217,25	216,35	178,07
SD	129,57	120,97	132,60	116,95	130,56	119,24
25. P.	116,31	87,64	111,31	122,71	117,33	104,16
MD	205,92	118,35	195,21	215,31	201,10	116,16
75. P.	281,41	186,80	281,41	267,14	281,45	260,95
p-Wert	0,033		0,630		0,223	

Tab. 7 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von der familiären Disposition für PHT, einem Blutdruckabfall unter Belastung und der Septumdicke.

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

	Osteopontin (ng/mL)			
	nsVT		Synkope in der Vorgeschichte	
	nein	ja	nein	ja
MW	210,75	215,10	216,16	205,91
SD	121,10	140,17	108,49	164,79
25. P.	111,31	113,18	124,75	86,41
MD	200,43	190,19	199,17	168,42
75. P.	281,49	275,91	281,49	260,95
p-Wert	0,983		0,215	

Tab. 8 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von nsVTs und Synkopen in der Vorgeschichte.

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

	Osteopontin (ng/mL)				
	Risikofaktoren insgesamt (n)				
	0	1	2	3	4
MW	212,73	248,20	181,39	208,14	208,14
SD	104,70	126,95	140,74	180,53	74,69
25.	144,70	171,98	104,16	43,85	155,32
MD	200,43	220,00	136,98	147,09	208,14
75. P	279,51	325,64	252,48	400,13	260,95
p-Wert	0,061				

Tab. 9 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von Risikofaktoren insgesamt.

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

	Osteopontin (ng/mL)						
	NYHA - Stratifizierung		VHF zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme		Art des VHF		
	NYHA I-II	NYHA III-IV	nein	ja	paroxysmal	persistierend	permanent
MW	199,89	228,48	209,78	232,17	225,87	207,16	268,24
SD	129,82	126,78	125,48	156,94	165,69	175,00	158,54
25. P.	106,42	144,70	114,49	109,55	109,55	28,21	135,51
MD	190,19	202,94	197,88	198,04	169,75	215,35	289,12
75. P.	251,39	307,81	275,91	377,92	374,18	377,92	400,97
p-Wert	0,130		0,769		0,807		

Tab. 10 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von der NYHA-Stratifizierung und VHF zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme.

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

	Osteopontin (ng/mL)							
	LAD (mm)		LVEF (%)		IVSd (mm)		LVEDD (mm)	
	≤ 47	> 47	≤ 55	> 55	≤ 18	> 18	≤ 46	> 46
MW	208,96	217,40	223,00	189,09	214,10	213,90	224,66	201,68
SD	127,78	132,75	110,30	160,42	136,87	119,88	139,47	116,02
25. P.	111,66	114,49	145,27	90,55	115,77	112,90	116,16	106,74
MD	210,17	184,05	208,14	144,70	200,47	184,97	205,44	193,57
75. P.	267,14	310,03	289,65	252,48	267,07	308,92	290,99	255,43
p-Wert	0,993		0,011		0,875		0,394	

Tab. 11 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von LAD, LVEF, IVSd und LVEDD.

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

	Osteopontin (ng/mL)							
	LVPWd (mm)		LVMM (g)		LVMM normal?		RWT (mm)	
	≤ 13	> 13	≤357,75	>357,75	nein	ja	≤ 0,55	> 0,55
MW	213,06	217,99	216,41	213,12	216,46	178,48	194,38	236,10
SD	127,54	134,05	141,41	116,92	128,69	151,21	112,87	142,36
25. P.	111,37	116,84	111,37	116,16	116,31	95,36	106,42	144,70
MD	204,98	185,66	204,98	193,57	200,43	128,94	186,80	207,94
75. P.	281,45	279,51	279,07	289,65	281,41	227,36	275,91	310,03
p-Wert	0,993		0,850		0,321		0,110	

Tab. 12 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von LVPWd, LVMM, normaler LVMM und RWT.

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

	Osteopontin (ng/mL)							
	Max. Wanddicke (mm)		Summe der LV-Dicke (mm)		LVOTG in Ruhe (mmHg)		LVOTG unter Provokation (mmHg)	
	≤ 18	> 18	≤ 31	>31	≤ 20	> 20	≤ 74	> 74
MW	214,10	215,64	202,84	228,01	194,08	229,23	185,92	230,02
SD	136,87	120,15	124,80	133,97	128,69	128,52	121,79	134,69
25. P.	115,77	114,49	108,67	116,57	105,84	129,27	104,16	129,27
MD	200,47	185,89	193,57	202,94	170,86	216,98	169,75	211,48
75. P.	267,07	310,03	273,33	308,92	252,53	281,49	252,58	289,65
p-Wert	0,804		0,292		0,062		0,055	

Tab. 13 Osteopontinplasmaspiegel in Abhängigkeit von max. Wanddicke, Summe der LV Dicke, LVOTG in Ruhe und unter Provokation.

Aufgeführt sind der MW, der MD, die SD, die 25. und 75. Perzentile, sowie der p-Wert von OPN in Bezug auf die jeweiligen Parameter.

8 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christoph Langer, für die Vergabe des sehr interessanten Dissertationsthemas und sein Vertrauen in mich, was den Schaffensprozess und die anschließende Abfassung dieser Arbeit erst möglich gemacht hat. Ich bedanke mich für seine Betreuung, kritischen Anregungen, unermüdliches Korrekturlesen und die umfassende Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Norbert Frey, Direktor der Medizinischen Klinik für Innere Medizin III – Kardiologie und Angiologie des UKSH Campus Kiel, danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik promovieren zu dürfen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Lothar Faber möchte ich mich für das mühevoll Sichten und Auswerten der echokardiographischen Daten bedanken.

Ein aufrichtiges Dankeschön geht an Herrn Dr. rer. nat. Martin Farr, Leiter des Kardiologischen Labors am Herz- und Diabeteszentrum NRW, welcher mich herzlich in seinem Labor aufgenommen und somit die Datenerhebung ermöglicht hat. Vielen Dank für die Zuvorkommenheit und die Bereitschaft, all meine Fragen bestmöglich zu beantworten.

Frau Anne-Rose Nissen danke ich für die Auswertung der Plasmaproben und Hilfestellung bei themenbezogenen Fragen.

Besonderen Dank richte ich auch an Frau Dr. med. Tanja Kottmann für die umfassende und geduldige Unterstützung bei der statistischen Analyse.

Ich bedanke mich von Herzen bei meinen Eltern, Jadwiga und Marek, für die meine Ausbildung immer an erster Stelle stand und die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben. Ihr Glaube an mich und ihre Unterstützung haben mir den Weg zu dieser Arbeit geebnet.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Freund Colin bedanken. Deine unermüdliche Unterstützung und Geduld in jeder Lebenslage, doch insbesondere bei Verfassung dieser Arbeit, waren und sind für mich unverzichtbar. Danke für das Korrekturlesen, Deine Motivation und Deinen Glauben an mich.