

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Bedeutung von Entzündungszellen, Apoptose- und Nekrosemarkern in Myokardbiopsaten mit
Amyloidablagerungen**

und

**Korrelation klinischer Patienteneigenschaften mit dem AL- und ATTR-Gehalt in
Myokardbiopsaten**

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

vorgelegt von

Philip Edward Simon

aus **Lauf an der Pegnitz**

Kiel 2025

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie
2. Berichterstatter/in: Prov.-Doz. Dr. Martina-Elisabeth Spehlmann, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2026

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.10.2025

gez.: Prof. Dr. Björn Konukiewitz
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Amyloid und Amyloidosen	1
1.2 Kardiale Amyloidose	2
1.2.1 Definition und Formen	2
1.2.2 ATTR-Amyloidose	4
1.2.2.1 Pathophysiologie	4
1.2.2.2 Klinische Manifestation und Diagnostik	5
1.2.2.3 Therapie	6
1.2.3 AL-Amyloidose	7
1.2.3.1 Pathophysiologie	7
1.2.3.2 Klinische Manifestation und Diagnostik	7
1.2.3.3 Therapie	8
1.3 Entzündung bei kardialer Amyloidose	8
1.4 Apoptose und Nekrose	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Ethikvotum	14
2.2 Material	14
2.2.1 Chemikalien	14
2.2.2 Geräte	14

2.3	Patientenkohorte	14
2.4	Histologie	16
2.5	Kongorotfärbung	16
2.6	Immunhistochemie	16
2.7	Scanvorgang der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte	17
2.8	Quantifizierung der immunhistochemisch gefärbten Immunzellen sowie des Komplement 9- und Caspase 3-gefärbten Areal	17
2.9	Scanvorgang der kongorotgefärbten Gewebeschnitte	17
2.10	Quantifizierung des Amyloidgehalts	18
2.11	Messung des Kardiomyozytendurchmessers	18
2.12	Statistik	18
3	Ergebnisse	21
3.1	Das Studiendesign mit Darstellung untersuchter Biomarker in der Übersicht	21
3.2	Histologie	23
3.3	Nachweis von Immunzellen im Herzen von Patienten mit AL- und ATTR-Amyloid	23
3.4	Immunfärbungen von Komplement 9 und Caspase 3	23
3.5	Statistik	24
4	Diskussion	33
4.1	Es werden T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen im amyloid-befallenen Areal nachgewiesen.	33
4.2	Complement 9 und Caspase 3 sind im Amyloid-haltigen Herzbiopaten nachweisbar	35

4.3	Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Dichte von Entzündungszellen und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.	36
4.4	Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Durchmesser von Herzmuskelzellen und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.	37
4.5	Studieneinschränkungen	38
4.6	Ausblick	38
5	Zusammenfassung	40
6	Literaturverzeichnis	41
7	Abbildungsverzeichnis	48
8	Tabellenverzeichnis	49
9	Eidesstattliche Versicherung	51
10	Danksagung	52
11	Publikation	53

Abkürzungsverzeichnis

AA	Serum-Amyloid-Amyloidose
ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme</i>
AL	Leichtketten-Amyloidose
ATTR	Transthyretin-Amyloidose
ATTRm	Erworbene Transthyretin-Amyloidose
ATTRwt	Wildtyp Transthyretin-Amyloidose
Bak1	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
CAEL-101	<i>Fibril-reactive monoclonal antibody</i>
Cas3	Caspase 3
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CD68	<i>Cluster of differentiation 68</i>
C9	Komplement 9
eGFR	Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-7	Interleukin-7
IFN- α	Interferon alpha
IFN- γ	Interferon gamma
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
MAPSE	<i>Mitral annular plane systolic excursion</i>

MPO	Myeloperoxidase
NT-pro-BNP	<i>B-type natriuretic peptide</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
TDI	<i>Tissue doppler imaging</i>

1 Einleitung

1.1 Amyloid und Amyloidosen

Amyloid ist eine pathologische fibrilläre Polypeptidaggregation mit einer Cross- β -Struktur, die intra- und/oder extrazellulär auftritt (Röcken et al., 2009). Amyloidosen sind durch Amyloidablagerungen verursachte Krankheiten (Röcken et al., 2009). Diese Amyloidablagerungen entstehen aus einer fehlerhaften Faltung des Vorläuferproteins und neigen aufgrund der abnormalen Konformation zu Polymerisierung und Aggregation in unlöslichen Fasern (Iadanza et al., 2018). Die als Fibrillen bezeichneten Fasern bestehen aus mehreren Lagen von Amyloid in der β -Sheet-Konformation. Nicht alle Amyloidfibrillen sind pathologisch; funktionelle Amyloide sind beispielsweise die β -Sheet-Fibrillen *Pmel17* der Melanosomen, die an der Melaninsynthese beteiligt sind (McGlinchey et al., 2009). Entsprechend der aktuellen Nomenklatur werden Amyloidproteine mit einem „A“, gefolgt von der Abkürzung des Vorläuferproteins bezeichnet, also beispielsweise ATTR für ein Amyloid aus Transthyretin (Benson et al., 2020).

Verschiedene Prozesse sind für eine amyloidogene Fehlfaltung der Vorläuferproteine verantwortlich. Manche Proteine neigen dazu, mit zunehmendem Alter eine amyloide Konformation anzunehmen, bei anderen führt eine unphysiologisch hohe Serumkonzentration des Proteins, beispielsweise aufgrund einer Hämodialyse, zu der Fehlfaltung.

Bei Amyloidosen handelt es sich um solche Krankheiten, die durch Ablagerungen von toxischen, unlöslichen Fibrillen aus Amyloidprotein in den Geweben entstehen. Gemeinsam ist diesen heterogenen Erkrankungen, dass die amyloidogenen Proteine in der β -Sheet-Konformation vorliegen. Diese amyloidogene Konformation der Proteine begünstigt ihre Ablagerung und auch die anderer Proteine, wie beispielsweise Heparansulfat und Proteoglykan, und führt zu Funktionsstörung der betroffenen Organe (Benson et al., 2020).

Die Amyloidosen werden anhand der Ätiologie in lokalisierte oder systemische Amyloidosen unterteilt, in angeborene oder erworbene Amyloidosen, und weiter anhand des amyloidogenen Vorläuferproteins und der Lokalisation klassifiziert (Picken, 2020). Es sind bisher 42 amyloidogene Proteine bekannt, wobei hiervon 18 für systemische Amyloidosen, 22 für lokale Amyloidosen und zwei sowohl für systemische als auch für lokale Amyloidosen verantwortlich sind (Benson et al., 2020). Neben der Vielzahl an diversen Vorläuferproteinen unterscheidet sich auch die Art der Fibrillen- und Komplexbildung der Amyloide zwischen den Amyloidoseentitäten. Klinische Symptome werden durch die Art und den Ort der Amyloidablagerungen bestimmt und umfassen Hepatomegalie, Proteinurie, Kardiomyopathie, Neuropathie, Nierenversagen, Bluthochdruck, und ophthalmologische Auffälligkeiten.

1.2 Kardiale Amyloidose

1.2.1 Definition und Formen

Bei der kardialen Amyloidose handelt es sich um eine Erkrankung, die durch pathologische Ablagerungen von Amyloidfibrillen im Herz charakterisiert ist, aufgrund derer es zu morphologischen und funktionellen Anomalien kommt. Es lassen sich zwei Haupttypen von kardialen Amyloidosen unterscheiden, die durch die amyloidogene Transformation unterschiedlicher Proteine hervorgerufen werden (Tabelle 1) (Martinez-Naharro et al., 2018). Der ATTRwt-Amyloidose („wt“ für Wildtyp) liegt die amyloidogene Konformationsänderung von Tranthyretin zugrunde, während bei AL-Amyloidose die Leichtketten von Immunglobulinen abgelagert sind. Mutationen im Transthyretin-Gen können zu einer erblichen Form der ATTRm-Amyloidose („m“ für Mutation), auch als familiäre Amyloidose bezeichnet, führen (Sattianayagam et al., 2012). Eine sekundäre kardiale Amyloidose (AA-Amyloidose) entsteht durch die Bildung von Amyloidfibrillen aus dem Serum-Amyloid A, welches als Akut-Phase-Protein bei jeder Entzündung physiologisch von der Leber sezerniert wird (Lachmann et al., 2007). Die isolierte atriale Amyloidose wird durch Amyloidablagerungen aus dem atrialen natriuretischen Peptid hervorgerufen (Richter et al., 2020).

Obwohl die klinischen Symptome der Krankheitstypen ähnlich sein können, unterscheiden diese sich morphologisch durch das Ausmaß und die Verteilung der Amyloidfibrillen. Die pathologischen Amyloidablagerungen in den Gefäßen verursachen eine diastolische Dysfunktion, Hypertrophie und myokardiale Ischämie. Der Krankheitsverlauf von ATTR- und AL-Amyloidosen unterscheidet sich, ebenso wie die Therapie. In Abhängigkeit von der Art des Amyloids ist auch die Prognose für Patienten mit AL-Amyloidose gemeinhin schlechter als für Patienten mit ATTR-Amyloidose, obwohl letztere durch vergleichsweise mehr Amyloidablagerungen charakterisiert ist.

Erste Indikatoren einer kardialen Amyloidose umfassen Herzinsuffizienz und Arrhythmien. Auffällig ist eine Intoleranz gegenüber üblichen Therapien kardialer Erkrankungen, wie beispielsweise β -Blocker, Angiotensin II-Rezeptor-Blocker und ACE-Inhibitoren.

Bestimmte kardiale Biomarker werden für die Diagnose und den Schweregrad kardialer Amyloidosen herangezogen, insbesondere der Troponinwert und der NT-proBNP-Wert. Eine Verdachtsdiagnose ergibt sich aus einer Kombination der kardialen Symptome, einem abnormalen Herzultraschall und einer kardialen Magnetresonanztomographie.

Amyloidose-Typ	Ursache	Erworben/ angeboren	Lokal/systemisch
AL-Amyloidose/primäre Amyloidose	Ablagerung von AL-Fibrillen, die von abnormen Plasmazellen gebildet werden.	erworben	systemisch
ATTRwt- Amyloidose/senile systemische Amyloidose/kardiale Amyloidose	altersbedingte Amyloidablagerungen aus Transthyretin	erworben	systemisch
ATTRm- Amyloidose/familiäre Amyloidose/hereditäre ATTRh-Amyloidose	Mutationen in Transthyretin	angeboren	systemisch
AA- Amyloidose/sekundäre Amyloidose	Ablagerung von Serum-Amyloid A bei chronischen Entzündungen	erworben	systemisch
Isolierte atriale Amyloidose	Ablagerung von Amyloid aus dem atrialen natriuretischen Peptid	erworben	lokal

Tabelle 1: Typen kardialer Amyloidose (Martinez-Naharro et al., 2018)

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den kardialen ATTR- und AL-Amyloidosen, die im Folgenden näher beschrieben werden. In Abbildung 1 werden die Prozesse, die zu ATTR- und AL-Amyloidose führen, graphisch dargestellt.

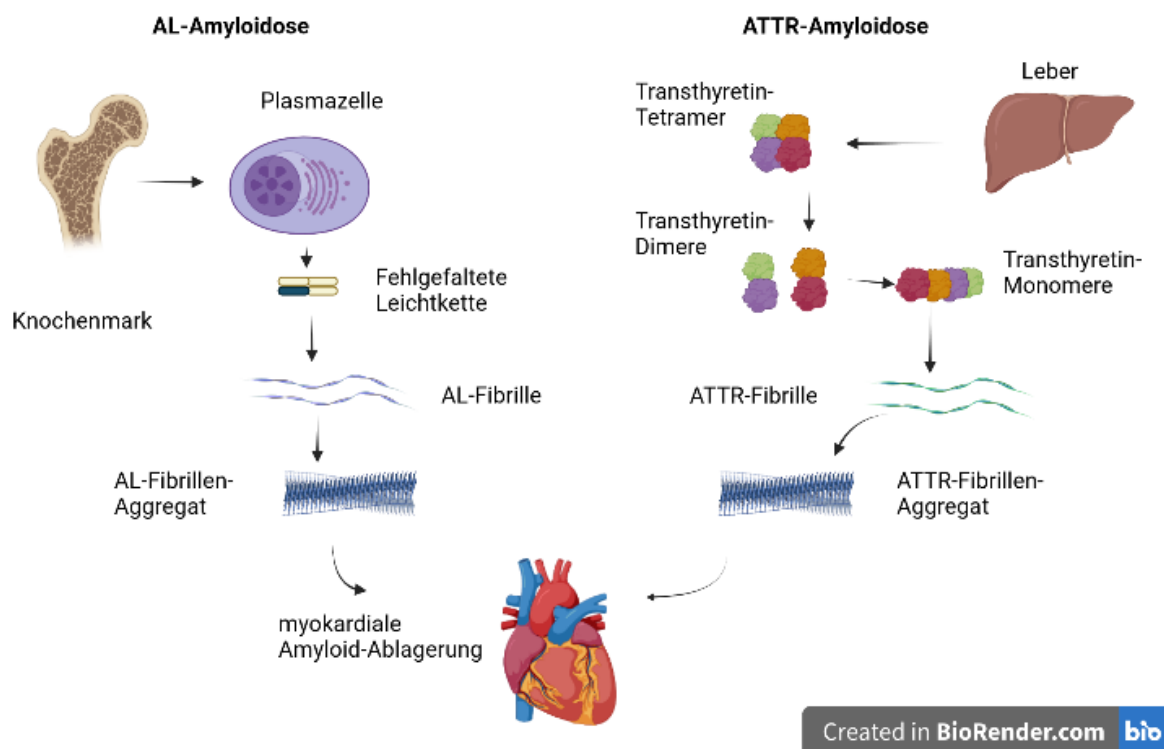


Abbildung 1: Pathophysiologie der ATTR- und AL-Amyloidose. Eigene Darstellung angelehnt an (Donnelly and Hanna, 2017). Abbildung generiert mit BioRender (www.biorender.com)

1.2.2 ATTR-Amyloidose

1.2.2.1 Pathophysiologie

Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, werden Wildtyp- und mutationsbedingte ATTR-Amyloidosen unterschieden. Die Prävalenz der kardialen ATTR-Amyloidose wird zwischen 10 und 25 % bei älteren Männern geschätzt, wobei sie mit zunehmendem Alter entsprechend der altersbedingten Transformation von Transthyretin zunimmt (Tanskanen et al., 2008, Porcari et al., 2021, Merlo et al., 2022, López-Sainz et al., 2019).

Beide ATTR-Typen sind auf eine amyloidogene Transformation des Transthyretins zurückzuführen. Transthyretin bildet im Serum ein Tetramer und wird überwiegend in der Leber synthetisiert. Unter physiologischen Bedingungen ist seine Hauptfunktion der Transport von Thyroxin und dem Retinolbindenden Protein im Serum und in der Spinalflüssigkeit des zentralen Nervensystems. Mit zunehmendem Alter wird die Tetramerkonformation des Proteins geschwächt. Das begünstigt bei ATTRwt-Amyloidose die Bildung einer amyloidogenen Konformation der Monomere und damit von Amyloid (Yee et al., 2019). Die Ursache für die Schwächung des Tetramers ist bisher noch unklar, jedoch werden in diesem Zusammenhang eine altersbedingte verminderte Funktion von Chaperonproteinen in der Leber, welche für die Entsorgung dysfunktionaler Proteine verantwortlich sind, eine Oxidation der Transthyretin-Untereinheiten, und posttranslationale Veränderungen des

Transthyretins diskutiert (Saito et al., 2021). ATTRwt-Amyloidose kommt deutlich häufiger bei Männern als bei Frauen vor, wobei die Ursachen für diese geschlechtsspezifischen Unterschiede bisher noch nicht bekannt sind.

Die aus Transthyretin gebildeten Amyloidfibrillen werden in A- und B-Fibrillen unterteilt. Erstere bestehen aus einer Mischung von Transthyretin in voller Länge und fragmentiertem Transthyretin, während letztere ausschließlich aus Transthyretin in voller Länge bestehen. Die Amyloidfibrillen lagern sich zunächst in der Basalmembran von Kardiomyozyten und den glatten Muskelzellen der Gefäße ab. Aus Untersuchungen *in vitro* ist bekannt, dass ATTR-Amyloid eine toxische Wirkung auf die Kardiomyozyten ausübt, indem es die Produktion von reaktiven Superoxiden und Apoptose induziert und die hypertrophe Reaktion der Kardiomyozyten herabsetzen kann (Bourgault et al., 2011, Manral and Reixach, 2015, Hein et al., 2021).

1.2.2.2 Klinische Manifestation und Diagnostik

Die klinische Manifestation einer kardialen ATTR-Amyloidose ist in Tabelle 2 aufgelistet. Die Patienten unterscheiden sich zwischen ATTRm- und ATTRwt-Amyloidosen hinsichtlich des Alters, der Symptombdauer vor der Diagnose und der Lebenserwartung, jedoch ist die klinische, kardiale Manifestation ähnlich (Gertz et al., 2020, Maurer et al., 2019). Die hereditäre Form manifestiert sich in jüngerem Alter, während die Fehlformation des Wildtyp-Transthyretins mit einem hohen Lebensalter assoziiert ist. Beide Formen kommen bei Männern öfter vor als bei Frauen, wobei die Frauenquote beim ATTRm-Typ höher ist. Kardiale Symptome umfassen Kurzatmigkeit, Müdigkeit und Ödeme, extrakardiale Symptome können Proteinurie, Taubheit und Dysautonomie sein. Typische klinische Manifestationen sind eine Verdickung der linksventrikulären Wand bei Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und Karpaltunnelsyndrom.

Die Diagnostik erfolgt herkömmlich basierend auf einer Biopsie und histopathologischer Untersuchung. Amyloid wird konventionell mit einer Anfärbung des Gewebes mit Kongorot und dem polarisationsmikroskopischen Nachweis einer anormalen Polarisationsfarbe identifiziert (Yakupova et al., 2019). In den letzten Jahren kommen vor allem nicht-invasive Methoden wie die Szintigraphie mit Knochenmarkern, die Bildgebung mittels Echokardiographie, Positronen-Emissions-Tomographie und *Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie*, oder als weiterführende Untersuchung die kardiale Magnetresonanztomographie für die Diagnostik der Amyloidosen zum Einsatz (Gillmore et al., 2016, Rossi et al., 2022, Maurer et al., 2019).

	ATTRm	ATTRwt
Alter bei Symptombeginn	> 20 Jahre	> 50 Jahre
Geschlecht	76 – 86 % Männer	91 – 97 % Männer
Symptombdauer vor Diagnose	etwa 3 Jahre	etwa 2 Jahre
Lebenserwartung (Median)	2 – 10 Jahre	4 Jahre
kardiale klinische Manifestation	ja	ja
Art der kardialen Manifestation	<ul style="list-style-type: none"> • Herzinsuffizienz • periphere Polyneuropathie • gastrointestinale Symptome (Obstipation oder Diarrhoe, Übelkeit) • Karpaltunnelsyndrom 	<ul style="list-style-type: none"> • Herzrhythmusstörungen, Vorhofflimmern • Herzinsuffizienz mit ungeklärter linksventrikulärer Wandverdickung und nicht dilatiertem linken Ventrikel • konzentrische linksventrikuläre Wandverdickung • eingeschränkte longitudinale linksventrikuläre Funktion trotz normaler Ejektionsfraktion • Karpaltunnelsyndrom

Tabelle 2: Klinische Manifestation von ATTR-Amyloidosen, angelehnt an (Gertz et al., 2020) und (Maurer et al., 2019).

1.2.2.3 Therapie

Die Therapie der kardialen ATTR-Amyloidose umfasst drei Ansätze:

1. Behandlung von bestehenden kardialen Komplikationen und Komorbiditäten. Aufgrund der Intoleranz von Amyloidpatienten gegenüber herkömmlichen Herzmedikamenten bedarf es einer Optimierung der Therapie dieser Patienten und dem Einsatz nicht-pharmakologischer Ansätze beispielsweise mit Diuretika.
2. Blockade einer weiteren Amyloidbildung und die Stabilisierung der Transthyretintetramere. Das hierfür eingesetzte Medikament der Wahl ist Tafamadis, ein Benoxazol-Derivat, welches in klinischen Studien zu einer verbesserten körperlichen Fitness und Lebensqualität von ATTR-Patienten führte und zudem die Mortalität signifikant reduzierte (Maurer et al., 2018).
3. Abbau bereits vorhandener Amyloide. Obwohl die Entfernung bereits gebildeter Amyloid-Fibrillen, beispielsweise mit einem speziellen Antikörper, ein wünschenswerter Therapieansatz ist, steht die Entwicklung einer solchen Therapie bisher noch aus und es laufen hierzu klinische Studien.

Die Synthese von Transthyretin in der Leber kann bei Patienten mit ATTRm-Amyloidose durch genetische *silencer* wie Patisiran oder Inotersen oder eine Lebertransplantation erreicht werden (Solomon et al., 2019, Dasgupta et al., 2020). Medikamente wie Tafamidis und Diflunisal zielen auf die Stabilisierung des Transthyretintetramers ab (Maurer et al., 2018, Lohrmann et al., 2020). Bereits vorhandene Amyloidfibrillen werden durch Doxyzyklin abgebaut (Obici et al., 2012). Ein sechsmonatiges *follow-up* mit Bildgebung wird für Patienten mit ATTR-Amyloidose empfohlen (Garcia-Pavia et al., 2021).

Die Einschätzung der Prognose erfolgt basierend auf einem *staging* mit den Biomarkern *N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide* (NT-proBNP, > 3000 pg/mL), sowie Troponin T (> 0,05 ng/mL, ATTRwt) und der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (*estimated Glomerular Filtration Rate/eGFR*, < 45 mL/min, ATTRm) (Grogan et al., 2016, Gillmore et al., 2018). Die Stadien I bis III werden entsprechend dem Vorliegen von keinem, einen, oder beiden dieser Parameter zugeteilt, mit abnehmender Lebenserwartung (Gillmore et al., 2018, Grogan et al., 2016).

1.2.3 AL-Amyloidose

1.2.3.1 Pathophysiologie

Die AL-Amyloidose resultiert aus einer fehlerhaften Konformation der leichten Ketten von Immunglobulin, welches in Plasmazellen synthetisiert wird (Gertz and Dispenzieri, 2020, Merlini, 2017). Diese ist in den meisten Fällen auf eine Plasmazelldyskrasie zurückzuführen. Das Immunglobulinprotein besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne und liegt unter physiologischen Bedingungen als Dimer vor. Die amyloidogene Transformation umfasst die Entfaltung der variablen Domäne, die Ausbildung von Dimeren und Oligomeren und letztendlich die Fibrillenbildung aus diesen Oligomeren. Etwa drei Viertel der AL-Amyloidose-Patienten zeigen eine kardiale Beteiligung und dies ist die Haupttodesursache (Gertz et al., 2020). Die AL-Fibrillen induzieren in den Kardiomyozyten oxidativen Stress, eine Lyse der extrazellulären Matrix, mitochondrialen Stress und Apoptose (Lavatelli et al., 2015, Brenner et al., 2004, Biolo et al., 2008, Shi et al., 2010).

Die Inzidenz der AL-Amyloidose liegt bei etwa 8 – 10 pro 100.000 Einwohner (Hou et al., 2022, Quock et al., 2018). Im Gegensatz zu der ATTR-Amyloidose betrifft die Krankheit bei einem Krankheitsbeginn von im Median 65 Jahren auch Frauen (Verhältnis Männer zu Frauen = 3:2) (Quock et al., 2018).

1.2.3.2 Klinische Manifestation und Diagnostik

Die kardiale Beteiligung führt bei Patienten mit AL-Amyloidose zu einer biventrikulären Wandverdickung mit nicht dilatierten oder verkleinerten Ventrikeln, linksventrikulärer Hypertrophie, kontraktile Dysfunktion und Herzinsuffizienz. Typische Symptome der AL-Amyloidose sind

Herzrasen, Kurzatmigkeit, Gewichtsabnahme, Schwindel, Veränderungen im Blutdruck, Müdigkeit und gastrointestinale Beschwerden (Wechalekar et al., 2022). Die kardialen Befunde umfassen Verdickungen der Herzklappen und des interatrialen Septums, Perikard- und Pleuraergüsse, sowie ein gesprenkeltes Aussehen des Myokards. Extrakardiale klinische Zeichen umfassen Nephropathie, Hepatomegalie, periphere oder autonome Neuropathie und Makroglossie (Merlini, 2017).

Die Diagnostik erfolgt ähnlich der ATTR-Amyloidose anhand einer histopathologischen Untersuchung einer Gewebebiopsie, anhand von bildgebenden Verfahren wie der Echokardiographie und einer kardialen Magnetresonanztomographie, und basierend auf Biomarkern wie NT-proBNP und Troponin T in Blut- und Urinproben (Wechalekar et al., 2022).

1.2.3.3 Therapie

Die Therapie besteht meist aus einer Kombinationschemotherapie mit Daratumumab, Zyklophosphamid, Bortezomib und Dexamethason oder aus der autologen Stammzelltransplantation (Wechalekar et al., 2022). Die Chemotherapie zielt auf die Behandlung der Plasmazelldyskrasie ab. Das kardiale Ansprechen auf die Therapie wird anhand der Senkung des NT-proBNP-Wertes beurteilt. Die Wirksamkeit einer Antifibrillentherapie mit Antikörpern wie Birtamimab oder CAEL-101 wird derzeit in klinischen Studien untersucht (Solomon et al., 2019, Wall et al., 2012).

Das *staging* für die Prognose basiert auf drei Parametern: der Differenz zwischen involviertem und nicht-involviertem Leichtkettenimmunglobulin, dem NT-proBNP-Wert und dem Troponin T-Wert (Kumar et al., 2012). Die Stadien I bis IV werden bei Vorliegen von keinem, einem, zwei oder drei dieser Parameter zugeteilt und korrelieren invers mit der Überlebenszeit (Garcia-Pavia et al., 2021).

1.3 Entzündung bei kardialer Amyloidose

Fehlgefaltete und aggregierte Proteine lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, die mit Entzündungen, oxidativem Stress und einer Veränderung der extrazellulären Matrix einhergehen. Die AA-Amyloidose ist mit einer chronischen Entzündung und Autoimmunkrankheiten assoziiert, wobei die Entzündungsreaktion zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt und die Bildung und Aggregation von Amyloiden begünstigt (Sack, 2018, Scarpioni et al., 2016).

Die pharmakologische Inhibition der Produktion dieser Zytokine wie Interleukin (IL)-1 und IL-6 ist mit einer reduzierten Bildung von AA-Amyloid assoziiert (Keisuke et al., 2013). Auch für andere Formen der Amyloidose werden Immunreaktionen und Entzündungen diskutiert, jedoch als sekundäres Ereignis zu einer bereits bestehenden Ablagerung von Amyloid (Gitter et al., 1995). Der erste Hinweis auf eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathophysiologie von anderen Amyloidosen als der AA-Amyloidose ergab sich durch die *post mortem*-Analyse von Alzheimerpatienten und die Identifikation von Mikroglia in der Umgebung des Amyloids (Itagaki et al., 1989). Inzwischen wird davon

ausgegangen, dass Entzündungsreaktionen in der Pathogenese von *Morbus Alzheimer* eine zentrale Rolle spielen, und die Einnahme antiinflammatorischer Medikamente geht mit einem geringeren Alzheimerisiko einher (Anthony et al., 2000).

In Tiermodellen konnte festgestellt werden, dass die Menge an Amyloid mit der Expression proinflammatorischer Zytokine korreliert (Patel et al., 2005). Im Kontext der kardialen Amyloidose spielen kardiale Fibroblasten als Aktivatoren des Inflammasoms und der Immunantwort eine entscheidende Rolle. Die Fibroblasten können Amyloid durch Endozytose in das Zellinnere aufnehmen. In einer *In vitro*-Studie wurden die Auswirkungen einer Transthyretinamyloidaggregation auf die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen durch die kardialen Fibroblasten untersucht (Magaud et al., 2023). Die Ergebnisse zeigten, dass Transthyretinaggregate durch die kardialen Fibroblasten aufgenommen werden und die Sekretion verschiedener Entzündungsfaktoren, unter anderem IL-6 und IL-8, induzieren. Die Aggregation von Transthyretinamyloid in den Fibroblasten hatte jedoch in der Untersuchung von Magaud et al. keinen Einfluss auf die Proteine der extrazellulären Matrix wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die auch Teil der Entzündungsreaktion sein können (Magaud et al., 2023).

Der Fokus einer Studie von Luigetti et al. lag ebenfalls auf dem Zusammenhang zwischen der Zytokinsekretion und der ATTR-Amyloidose (Luigetti et al., 2022). Sie untersuchten die Serumspiegel inflammatorischer Marker bei ATTRm-Patienten und verglichen sie mit denen gesunder Kontrollpersonen. Es wurden erhöhte Interferon (IFN)- α und IFN- γ -Werte im Serum von ATTRm-Amyloidosepatienten gemessen. Die Patienten wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe niedrigere Spiegel des antiinflammatorischen Zytokins IL-7 auf. Diese veränderten Parameter im Serum von ATTRm-Patienten korrelierten jedoch nicht mit den klinischen Parametern oder mit demographischen Patientencharakteristika.

Treitz et al. erstellten ein Proteomprofil von ATTR-Amyloid in Karpaltunnelgewebeschnitten. Sie identifizierten in diesen 22 Proteine des Komplementsystems, die an der Immunantwort beteiligt sind (Treitz et al., 2022). Die Autoren schlussfolgerten, dass das Komplementsystem mit großer Wahrscheinlichkeit an der Pathologie des ATTR-Amyloids beteiligt ist.

Siegismund et al. schlossen in ihre Untersuchung Patienten mit ATTR- oder AL-Amyloidose ein und verglichen den Krankheitsverlauf und die Mortalität von Patienten ohne Anzeichen einer Entzündung und Patienten mit einer intramyokardialen Entzündung (Siegismund et al., 2018). Die Patienten wurden von der ersten Diagnose anhand einer kardialen Biopsie über einen Zeitraum von 36 Monaten nachverfolgt. Von 54 eingeschlossenen Patienten wies fast die Hälfte eine in der Biopsie nachweisbare intramyokardiale Entzündung auf. Die Ergebnisse zeigten, dass bei Amyloidosepatienten mit einer intramyokardialen Entzündung von einer signifikant schlechteren Gesamtprognose auszugehen ist als

bei Patienten ohne diese Entzündung. Im Vergleich der beiden Amyloidosearten ergab sich, dass Patienten mit einer AL-Amyloidose eine schlechtere Prognose aufwiesen als Patienten mit ATTR-Amyloidose und dass auch die Auswirkung der intrakardialen Entzündung auf das Überleben dieser Patienten stärker war als dies für Patienten mit ATTR-Amyloidose der Fall war.

Neben der Hochregulierung von inflammatorischen Zytokinen in der Gegenwart von Amyloid in Kardiomyozyten oder kardialen Fibroblasten ist eine mögliche Infiltration des Herzgewebes mit Immunzellen für das Verständnis der Pathophysiologie und der Rolle von Immunreaktionen im Krankheitsverlauf von Interesse. Zu der Gegenwart und Art von Immunzellen im Myokard von Amyloidose-Patienten ist bisher vergleichsweise wenig bekannt. In einigen Studien konnten CD68-positive Makrophagen im Myokard nachgewiesen werden.

Argilés et al. untersuchten Proben von Patienten mit Hämodialyse-induziertem A β 2M-Amyloid mit spezifischen Markern auf die Infiltration mit Immunzellen (Argilés et al., 1994). Es wurden Immunzellen in den infiltrierten Geweben identifiziert, von denen die meisten CD68-positive Makrophagen und nur ein geringer Anteil CD3-positiv T-Zellen waren (Argilés et al., 1994).

In einer Fallstudie von Nakamura et al. wurde in verschiedenen Organen eines Patienten mit ATTRm-Amyloidose eine Infiltration der von Amyloid betroffenen Gewebestellen mit Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen beobachtet (Nakamura et al., 1999).

Pucci et al. analysierten Myokardbiopsien von Patienten mit AL- oder ATTR-Amyloidose hinsichtlich der vorhandenen Immunzellpopulationen und identifizierten sowohl CD3-positive T-Zellen als auch CD68-positive Makrophagen in den Geweben (Pucci et al., 2021). In Geweben von Patienten mit AL-Amyloidose wurden signifikant mehr CD3-positive Zellen gezählt als in den Gewebeproben von Patienten mit ATTR-Amyloidose, während sich die Anzahl der CD68-positiven Makrophagen nicht signifikant zwischen beiden Amyloidosearten unterschied (Pucci et al., 2021).

Im Gegensatz dazu beobachteten Stats und Stone in Myokardbiopsien eine höhere Dichte von CD68-positiven Makrophagen in Geweben von Patienten mit AL-Amyloidose als in Geweben von Patienten mit ATTR-Amyloidose (Stats and Stone, 2016). Neben diesen histopathologischen Beobachtungen ist bisher nicht bekannt, inwiefern die Immunzellinfiltration mit klinischen Parametern der Amyloidosepatienten korreliert.

1.4 Apoptose und Nekrose

Zelltodmechanismen werden durch fehlgefaltete Proteine und Proteinaggregate wie den Amyloidfibrillen induziert. Hierbei spielt eine Gruppe von Signalproteinen, die Caspasen, eine zentrale Rolle.

Die Fehlfaltung von amyloidogenen Proteinen und die Ansammlung von Fibrillen kann auch in Geweben, in denen diese akkumulieren, zu der Induktion von Apoptose und Nekrose führen. Die Häufigkeit und hierfür verantwortlichen Mechanismen wurden in verschiedenen Studien untersucht.

Nunes et al. analysierten, inwiefern die amyloidogene Transformation von Transthyretin zu Veränderungen der Expression und einer Schädigung von Endothelzellen führen kann (Nunes et al., 2013). Hierfür wurden humane Endothelzellen in Kultur mit Wildtyp-Transthyretin und mutiertem Transthyretin inkubiert und die RNA-Expression evaluiert. Die Behandlung der Zellen mit mutiertem Transthyretin resultierte in einer verminderten Expression solcher Proteine, die für die angiogene Transformation der Endothelzellen verantwortlich sind. Gleichzeitig führte die Transthyretin-Behandlung zu einer Hochregulierung apoptotischer Gene, wie beispielsweise BAK1. Diese Expressionsunterscheide waren mit der Induktion der Apoptose und einer Inhibition der Zellmigration von Endothelzellen assoziiert.

In einer Studie von Shi et al. wurden Kardiomyozyten von Ratten mit AL-Amyloid von Patienten inkubiert und Veränderungen im Phosphorylierungs- und Expressionsprofil dieser Zellen evaluiert (Shi et al., 2010). Durch die Behandlung mit AL-Amyloid wurde die Phosphorylierung von p38 induziert, einer Kinase, die an apoptotischen Signalkaskaden beteiligt ist. Die Phosphorylierung anderer Kinasen, die in apoptotische Prozesse involviert sein können, wie beispielsweise *Janus-Kinase* (JNK) und *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK), wurde durch die Behandlung der Kardiomyozyten mit AL-Amyloid nicht verändert (Shi et al., 2010). Zudem wurde durch die Amyloid-vermittelte p38-Phosphorylierung die Apoptose der Kardiomyozyten eingeleitet (Shi et al., 2010). Shi et al. konnten außerdem in kardialen Biopsien von AL-Amyloidose-Patienten zeigen, dass apoptotische Prozesse stattfinden (Shi et al., 2010). In einem weiteren Versuch von Shi et al. wurde p38 inhibiert und dies resultierte in einer verminderten Amyloid-induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, einem Indikator für eine Dysfunktion der Kardiomyozyten (Shi et al., 2010).

Ähnliche Beobachtungen machten auch Brenner et al., die reaktive Sauerstoffspezies und den hierdurch hervorgerufenen Oxidationsstress in Kardiomyozyten der Ratte untersuchten, welche mit humanem AL-Amyloid inkubiert worden waren (Brenner et al., 2004). Die Inkubation mit Amyloid resultierte in erhöhtem oxidativen Stress in Kardiomyozyten (Brenner et al., 2004). Zudem war eine verminderte kontraktile Funktion der Kardiomyozyten zu beobachten, die mit einer reduzierten Fähigkeit der Zellen einherging, den intrazellulären Kalziumgehalt zu regulieren (Brenner et al., 2004).

Imperlini et al. behandelten kardiale Fibroblasten mit AL-Amyloid und analysierten die hierdurch hervorgerufenen Veränderungen im Proteom der Zellen (Imperlini et al., 2017). Im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Amyloid behandelt worden waren, wurde eine veränderte Expression von solchen Proteinen beobachtet, die an der Organisation des Zytoskeletts, dem mitochondrialen Stoffwechsel und

der Signaltransduktion beteiligt sind und mit oxidativen und apoptotischen Prozessen assoziiert sind (Imperlini et al., 2017).

In einer aktuellen Studie von Zhang et al. wurden die Mechanismen untersucht, die bei AL-Amyloidose zu einer Dysfunktion und dem Zelltod von Kardiomyozyten führen (Zhang et al., 2023). Hierfür behandelten sie Kardiomyozyten der Ratte mit humanem Leichtketten-Amyloid und analysierten die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die Zytotoxizität des Amyloids und Zelltodmechanismen (Zhang et al., 2023). Sie fanden heraus, dass Leichtketten-Amyloid-Fibrillen die Zellvitalität herabsetzten und Autophagie-Mechanismen in den Kardiomyozyten induzierten (Zhang et al., 2023).

Nekrotische Prozesse wurden vereinzelt in verschiedenen Amyloidosetypen beschrieben. Iwaya et al. berichteten beispielsweise in ihrer Fallstudie von nekrotischen Veränderungen im Gewebe eines Patienten mit Diabetes-induzierter Amyloidose (Iwaya et al., 2019). Zabel et al. berichteten von einem Fall einer AA-Amyloidose, in dem sowohl eine Entzündung als auch eine Nekrose der Magenmuskulatur nachgewiesen wurde (Zabel et al., 2022). Okoshi et al. beobachteten in Fibroblasten sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse im Tiermodell der AL-Amyloidose (Okoshi et al., 2015). Es ist jedoch bisher unklar, inwiefern sich Herzgewebe von Amyloidose-Patienten nekrotisch verändert.

Diese Ergebnisse deuten zusammenfassend darauf hin, dass die Bildung und Ablagerung von Amyloid im Myokard oxidative und apoptotische Prozesse auslöst, die letztendlich zu einer Dysfunktion der Zellen und Zelltod führen. Es ist jedoch noch nicht genau bekannt, inwiefern diese Prozesse mit klinischen und demographischen Parametern von Amyloidose-Patienten korrelieren.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei Patienten mit verschiedenen Formen der Amyloidose, insbesondere AL-Amyloidose und ATTR-Amyloidose, wurden inflammatorische und apoptotische Prozesse im Herzen in vorherigen Studien beschrieben. Es ist jedoch bislang unklar, inwiefern eine Infiltration des betroffenen Herzgewebes mit Immunzellen stattfindet, welche Immunzellen infiltrieren, und inwiefern Apoptose in Kardiomyozyten von Amyloidosepatienten nachweisbar ist. Zudem ist unbekannt, ob immunologische und apoptotische Prozesse mit der Amyloidmenge und mit klinischen Parametern der Amyloidosepatienten korrelieren.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, Myokardbiopsien von Patienten mit AL-Amyloidose oder ATTR-Amyloidose hinsichtlich der Infiltration mit Immunzellen und der Expression apoptotischer Proteine zu analysieren und dies mit klinischen Parametern der Patienten zu korrelieren.

Die Forschungsfragen waren wie folgt:

1. Welche Immunzellen sind im Herzgewebe von Patienten mit AL- oder ATTR-Amyloidose nachweisbar?
2. Sind apoptotische Zellen im Herzgewebe von Patienten mit AL- oder ATTR-Amyloidose nachweisbar?
3. Korreliert die Immunzellzahl mit der Amyloidmenge?
4. Korreliert die Immunzellzahl mit klinischen Parametern der Patienten?
5. Korreliert Zelltod mit der Amyloidmenge?
6. Korreliert Zelltod mit klinischen Parametern der Patienten?

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Diese Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, genehmigt (D 581-585/15; D 489/18).

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Kongorot (Art. Nr. 27215.01) wurde von Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland), Xylol und Äthanol von Büfa (Lübeck, Deutschland), pPhosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) und Hämatoxylin Gill III von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

2.2.2 Geräte

Für die Durchführung und Auswertung wurden folgende Geräte verwendet: Leica Mikrotom und BondMax Färbeautomat (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland), Tissue Tek Prisma Färbeautomat sowie Tissue Tek Film Eindeckautomat (beide Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, Kalifornien, USA). Hamamatsu NanoZoomer 2. ORS-Scanner (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) unter Verwendung von Fluoreszenzfiltern der Firma Semrock, Inc. (Rochester, New York, USA) Leica SCN400 Scanner (Leica Biosystems) und Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop (ZEISS Deutschland, Oberkochen, Deutschland).

2.3 Patientenkohorte

Für meine Studie suchte ich aus dem Amyloidregister Kiel Fälle mit kardialer Amyloidose heraus, die bereits in früheren Studien publiziert worden waren und zu denen umfassenden klinische Daten vorlagen (Kristen et al., 2016). Auswahlkriterium war der histologische Nachweis von AL- oder ATTR-Amyloid im Herzmuskelgewebe. Die Biopsate stammten aus den Jahren 2007 bis 2014. Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme betrug für Patienten mit nachgewiesenem AL-Amyloid 64,7 Jahre bei einer Altersverteilung von 37,0 bis 86,0 Jahren. Für Patienten mit nachgewiesenem ATTR-Amyloid betrug das mediane Alter 72,07 Jahre, bei einer Altersverteilung von 53,27 bis 86,52 Jahren. Die Fälle der Kohorte wurden dadurch definiert, dass mindestens einer der folgenden Messwerte vorhanden war: Amyloidgehalt, C9, Caspase 3, CD3, MPO oder CD68.

Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen klinischen Patientencharakteristika und Amyloidgehalt in AL- und ATTR-Amyloidfällen sowie in allen Amyloidfällen untersucht, Kardiomyozytendurchmesser und der Dichte der Immunzellen. Zu der untersuchten Kohorte, bestehend aus

157 Patienten, lagen ausgewählte klinische Patientencharakteristika vor: NYHA-Klassifikation, NTproBNP, Größe des linken Vorhofes, Gewebe-Doppler-Bildgebung (TDI), *mitral annular plane systolic excursion* (MAPSE), *precordial voltage* und *limb voltage* (Kristen et al., 2016).

Parameter	Fallzahlen, N (%)
Kohorte	157 (100)
Amyloidtyp	N = 157
AL	73 (46,5)
ATTR	84 (53,5)
Amyloidgehalt insgesamt	N = 125
<i>low</i>	63 (50,4)
<i>high</i>	62 (49,6)
Amyloidgehalt AL	N = 60
<i>low</i>	30 (50,0)
<i>high</i>	30 (50,0)
Amyloidgehalt ATTR	N = 65
<i>low</i>	33 (50,8)
<i>high</i>	32 (49,2)
NYHA-Klasse	N = 151
1	3 (2,0)
2	49 (32,5)
3	96 (63,6)
4	3 (2,0)
NTproBNP	N = 150
<i>low</i>	71 (47,3)
<i>high</i>	79 (52,7)
LA size	N = 150
<i>low</i>	78 (49,7)
<i>high</i>	72 (45,9)
MAPSE	N = 148
<i>low</i>	76 (48,4)
<i>high</i>	72 (45,9)
Precordial Voltage	N = 142
<i>low</i>	71 (45,2)
<i>high</i>	71 (45,2)
Limb voltage	N = 142
<i>low</i>	82 (52,2)
<i>high</i>	60 (38,2)

Tabelle 3: Auflistung der untersuchten Amyloidtypen und der klinisch-pathologischen Patientencharakteristika mit entsprechenden Fallzahlen.

2.4 Histologie

Alle Biopate waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Von jedem Paraffinblock waren bereits zuvor für die Routinediagnostik 2 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und mit Hämalaun sowie Kongorot gefärbt worden. Der Nachweis von Amyloid erfolgte primär polarisationsoptisch durch den Nachweis der charakteristischen anomalen Polarisationsfarbe. Die Klassifikation des Amyloidtyps war bereits mittels Immunhistochemie bestimmt worden (Kristen et al., 2016).

2.5 Kongorotfärbung

Für die Kongorotfärbung nach Puchtler (Puchtler et al., 1963) wurden verschiedene Lösungen vorbereitet. Der Grundansatz bestand aus 30 g Natriumchlorid, das in 1.000 ml 80%-igem Äthanol gelöst wurde. Nach 24-stündiger Reifungszeit dienten 500 ml dieser gesättigten Lösung inklusive eines Teils des NaCl-Bodensatzes als Kongorot Stammlösung 1. Für die Kongorot Stammlösung 2 wurden 2,5 g Kongorot in den restlichen 500 ml des Grundsatzes gelöst. Nach weiteren 24 Stunden Reifungszeit wurden für die jeweiligen Gebrauchslösungen zu je 160 ml Stammlösung 2 ml einer 1%-igen NaOH-Lösung hinzugegeben. Diese Gebrauchslösungen waren eine Woche lang haltbar.

2.6 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten an Serienschnitten, von denen jeweils einer mit Kongorot gefärbt war. Verwendet wurden kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen Komplement 9 (C9; 1:400; Biozol, Eching, Deutschland), CD68 (1:100; Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) und monoklonale Kaninchenantikörper gegen Caspase 3 (1:100; Cell Signaling, Danvers, USA) sowie polyklonale Kaninchenantikörper gegen Anti-Lambda-Leichtkettenantikörper (AL7, 1:200; Pineda, Berlin, Deutschland), Transthyretin (TTR3, 1:2000; Pineda, Berlin, Deutschland), CD3 (1:100; Neomarkers, Portsmouth, USA), Myeloperoxidase (MPO; 1:100, DAKO, Hamburg, Deutschland). Die Färbungen wurden mittels Leica BondMax Färbeautomat unter Verwendung des Bond Polymer Refine Red Detektionssystems voll automatisiert durchgeführt. Je nach Herstelleranweisung wurden für die Antigendemaskierung die ER2-Bond Epitope Retrieval Solution 2 (Caspase3), die ER1-Bond Epitope Retrieval Solution 1 (C9) oder die Pronase E (C9) benutzt. Die Spezifität wurde unter Verwendung von Resektaten, die bekannte Amyloidarten enthielten (AA-Amyloid, ATTR-Amyloid, Lambda-Leichtketten-Amyloid), oder Verwendung von Positivkontrollen, die von den Herstellern empfohlen wurden, verifiziert. Als Negativkontrollen dienten Gewebeschnitte derselben Kohorte, die nicht mit entsprechenden Antikörpern gegen CD3, MPO, CD68, C9 und Caspase 3 angefärbt worden waren.

2.7 Scanvorgang der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte

Die immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate wurden mit dem Leica SCN400 Scanner unter 400-facher Vergrößerung digitalisiert.

2.8 Quantifizierung der immunhistochemisch gefärbten Immunzellen sowie des C9- und Caspase 3-gefärbten Areal

Im Auswertungsprozess wurde im ersten Serienschnitt das Vorliegen von Amyloid bestätigt. Die Anzahl der im ausgewählten Areal enthaltenen CD3-, MPO- und CD68-positiven Zellen wurde mit Hilfe der Bildanalysesoftware Definiens Tissue Studio Version 4.4.2 (Definiens AG, München, Deutschland) im Zellmarkierungsmodus bestimmt. Anschließend erfolgte eine Messung des ausgewählten Gewebeareals, welches in der Regel dem gesamten verfügbaren Schnittpräparat entsprach. Um die Dichte der entsprechend angefärbten Immunzellen im Gewebe zu bestimmen, wurde das Verhältnis von Immunzellen zu Pixel des gesamten ausgewählten Gewebeareals berechnet.

Darüber hinaus wurde das Verteilungsmuster der Caspase 3- und C9-Immunfärbung verglichen. Es folgte eine Einteilung der Färbeintensität in: nicht vorhanden (0), schwach (1+), mäßig (2+), stark (3+). Eine Farbintensität von 1+ bis 3+ wurde als positiv gewertet. Anschließend wurde die Menge der im ausgewählten Areal enthaltenen C9- und Caspase 3-angefärbten Fläche bewertet, indem Pixel mit der Farbschwellenfunktion der bildverarbeitenden Software ImageJ im *Hue/Saturation/Brightness* (HSB)-Farbmodell gezählt wurden. Der prozentuale Anteil, der innerhalb der Amyloidablagerungen nachgewiesenen Zielproteine wurde in 5%-Schritten dokumentiert. Zusätzlich wurde das Verhältnis von zellulären Immunfärbungen von Caspase 3 und C9 zu Amyloidablagerungen dokumentiert. Der Prozentsatz der Caspase 3- bzw. C9-darstellenden Pixel in Bezug zur Anzahl der Pixel des gesamten ausgewählten Gewebeareals wurde berechnet.

2.9 Scanvorgang der kongorotgefärbten Gewebeschnitte

Die kongorotgefärbten und eingedeckten Gewebeschnitte der untersuchten Patientenkohorte wurden mit dem Hamamatsu NanoZoomer 2. ORS-Scanner mit folgenden Einstellungen eingescannt: Alexa555 (Anregungswellenlänge/Bandbreite 560/25 nm; Emissionswellenlänge/Bandbreite = 60//36 nm) als Fluoreszenzfilter für die Kongorotfärbung (mit vierfacher Belichtungszeit). Die Anti-TTR-gefärbten Gewebeschnitte wurden mit demselben Hamamatsu NanoZoomer 2. ORS-Scanner ebenfalls in 400-facher Auflösung unter Hellfeldeinstellung gescannt. Als Negativkontrollen dienten Gewebeschnitte derselben Kohorte, die nicht mit Kongorot gefärbt worden waren

Mithilfe des Programms NDP view 2 von Hamamatsu konnten die gescannten Gewebeschnitte am Computer betrachtet und weiterverwendet werden. In der Bilddatei eines Patienten wurden Areale identifiziert und als TIFF-Datei in 400-facher Vergrößerung exportiert.

2.10 Quantifizierung des Amyloidgehalts

Die Menge des im ausgewählten Areal enthaltenen Amyloids wurde bewertet, indem Pixel mit der Farbschwellenwertfunktion des frei verfügbaren, Java-basierten Bildverarbeitungsprogramms ImageJ 1,48v (*US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*) im *Hue/Saturation/Brightness* (HSB)-Farbmodell gezählt wurden. Für alle 157 Fälle der Patientenkohorte wurden folgende Farbschwellenwerte für die kongorotgefärbten Gewebeschnitte verwendet: Farbwert (*Hue*) 0-255, Sättigung (*Saturation*) 0-255 und Helligkeit (*Brightness*) 47-255. Anschließend wurde der Prozentsatz der Amyloid-darstellenden Pixel in Bezug zur Anzahl der Pixel des gesamten ausgewählten Gewebeareals berechnet.

2.11 Messung des Kardiomyozytendurchmessers

Der Kardiomyozytendurchmesser wurde am Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnittpräparat mit einem Nikon Eclipse Ni-Mikroskop, ausgestattet mit einer Digitalkamera Nikon DS-Ri2 (beides von Nikon Coproration, Tokyo, Japan), gemessen. Die Bilddatei eines repräsentativen Areals wurde bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe der Bildanalyse-Software NIS Elements BR, Version 5.02 (Nikon Coproration, Tokyo, Japan), aufgenommen. Im aufgenommenen Areal wurden 30 Kardiomyozyten zufällig ausgewählt, deren Durchmesser mit zur Verfügung stehendem Linealwerkzeug so gemessen wurde, dass der rechtwinklige Querschnitt am besten dargestellt werden konnte, d.h. wenn der geringste Durchmesser der elliptischen Querschnittsfläche der Kardiomyozyten erfasst werden konnte. Der berechnete Mittelwert wurde zur weiteren Analyse angewandt.

2.12 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS Version 27.0 (IBM Corporation, Armonk, New York) durchgeführt. Kontinuierliche Daten wurden als Median ausgedrückt und reichten von der ersten bis zur vierten Quartile. Kategoriale Variablen wurden als absolute Zahlen und Prozentsätze ausgedrückt. Die Signifikanz von Assoziationen zwischen nicht-ordinalen Variablen wurde mit dem *Fisher's Exact Test* berechnet. Für Parameter der Ordinalskala (NYHA) wurde der Tau-Test nach Kendall angewendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 angenommen. Um die Falscherkennungsrate innerhalb der Korrelationen zu kompensieren, wurde die Simes (Benjamini-Hochberg) Methode (multiple testing correction) angewendet. Alle p-Werte wurden unkorrigiert dargestellt.

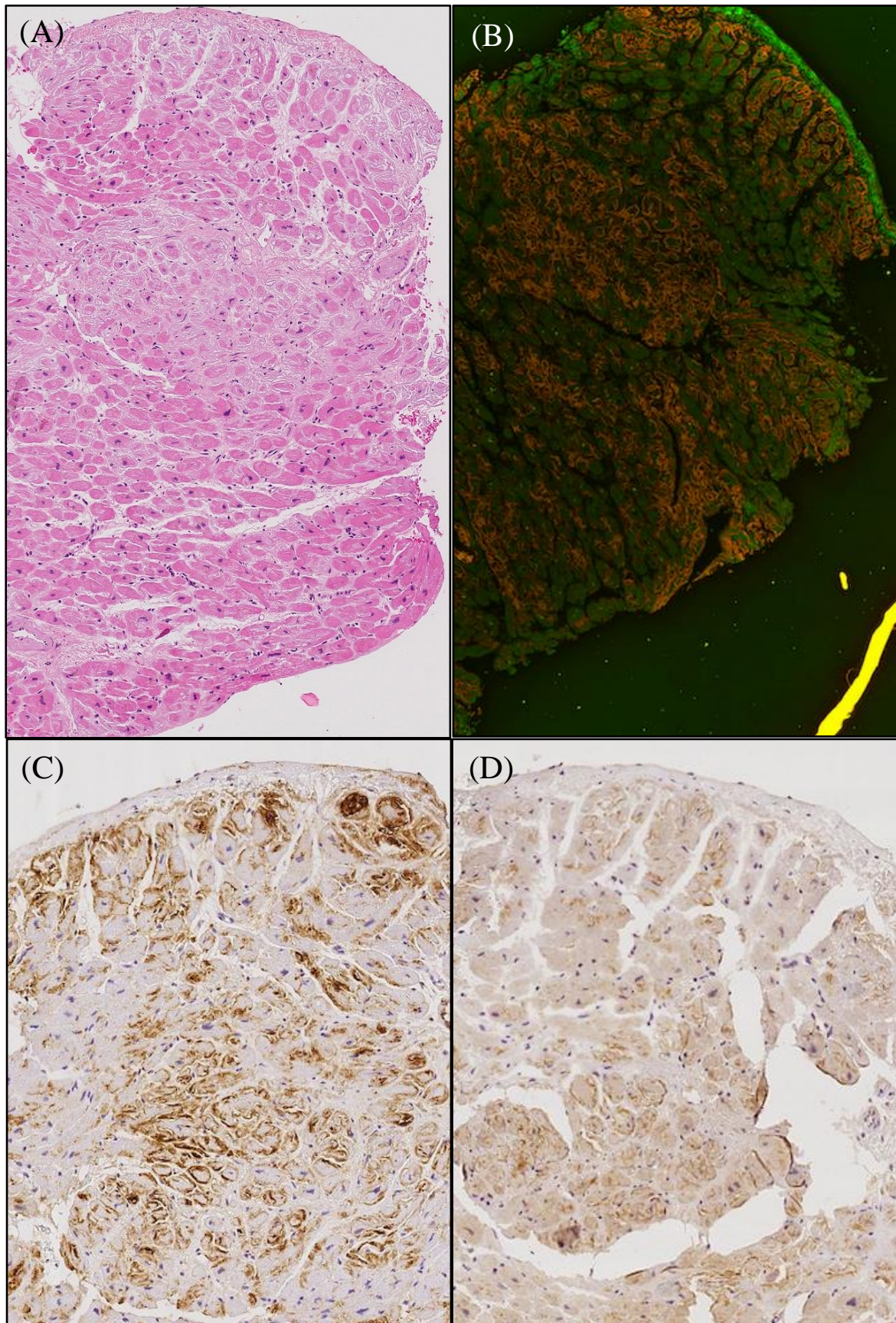


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung angefärbter Areale des AL-Amyloid-befallenen Herzmuskelgewebes in 100-facher Ver-größerung mittels Mikroskopie. Gezeigt ist ein Areal in den jeweiligen Färbungen Hämatoxylin-Eosin (A), Kongorot-Fluoreszenz (B), anti-C9-Antikörper (C), anti-Caspase 3-Antikörper (D) (Simon et al., 2024).

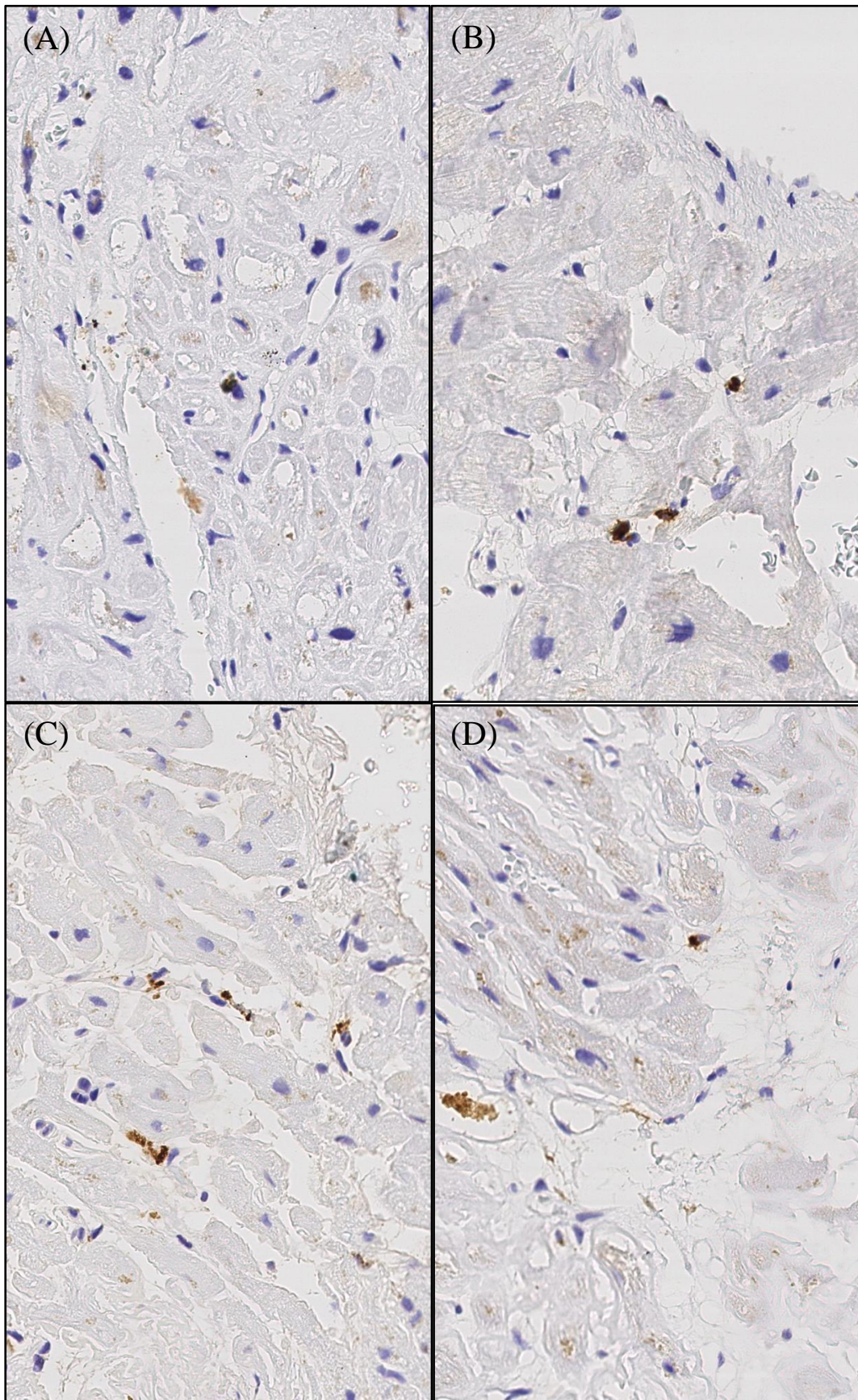


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung unterschiedlicher AL-Amyloid-befallener Areale der immunhistochemischen Färbungen in 400-facher Vergrößerung mittels Mikroskopie: Anti-CD3-Antikörper (A), Anti-MPO-Antikörper (B), Anti-CD68-Antikörper bei einem Patienten mit nachgewiesener NYHA-Klasse 2 (C) und Anti-CD68-Antikörper bei einem Patienten mit nachgewiesener NYHA-Klasse 3 (D) (Simon et al., 2024).

3 Ergebnisse

3.1 Das Studiendesign mit Darstellung untersuchter Biomarker in der Übersicht

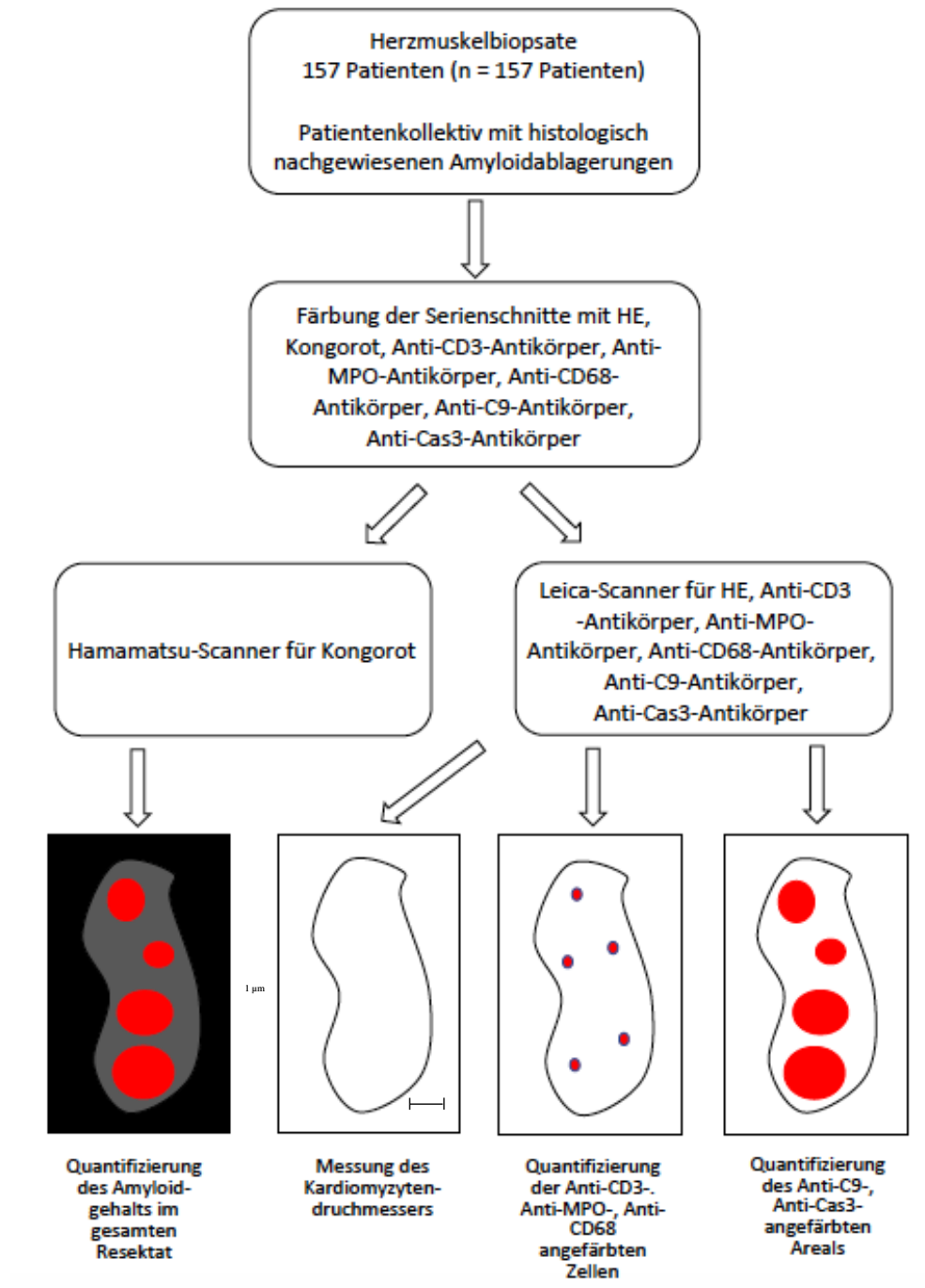


Abbildung 4: Übersichtsdarstellung des Studiendesigns. Abbildung generiert mit Microsoft Word für Mac 16.

In der 157 Patienten umfassenden Einschlusskohorte konnten nicht alle Färbungen durchgeführt und Biomarker untersucht werden. Bei 109 Patienten lagen so genannte Reserveschnitte des gut charakterisierten Patientenkollektivs vor (Kristen et al., 2016). Bei 48 Patienten lag lediglich der Amyloidanteil ohne verfügbare Reserveschnitte vor. Weitere Untersuchungen wurden in der 109 Patienten umfassenden Studienkohorte durchgeführt. Abbildung 5 zeigt eine grafische Darstellung der Verteilung untersuchter und nicht untersuchter Färbungen der Patientenfälle.

Fälle n (%)	Amyloid- anteil	C9-pos. Flächenanteil	Cas3-pos. Flächenanteil	Dichte CD3- pos. Zellen	Dichte CD68- pos. Zellen	Dichte MPO- pos. Zellen
48 (30,6)	grün	rot	rot	rot	rot	rot
22 (14,0)	grün	grün	grün	grün	grün	grün
6 (3,8)	grün	grün	grün	grün	grün	rot
4 (2,5)	grün	grün	grün	grün	rot	grün
6 (3,8)	grün	grün	grün	grün	rot	rot
1 (0,6)	grün	grün	grün	rot	grün	grün
1 (0,6)	grün	grün	grün	rot	rot	rot
1 (0,6)	grün	grün	grün	rot	rot	grün
8 (5,1)	grün	grün	grün	rot	rot	rot
2 (1,3)	grün	grün	rot	grün	grün	rot
2 (1,3)	grün	grün	rot	rot	rot	rot
6 (3,8)	grün	rot	grün	grün	grün	grün
3 (1,9)	grün	rot	grün	grün	grün	rot
1 (0,6)	grün	rot	grün	grün	rot	grün
2 (1,3)	grün	rot	grün	grün	rot	rot
1 (0,6)	grün	rot	grün	rot	grün	grün
2 (1,3)	grün	rot	rot	grün	grün	grün
1 (0,6)	grün	rot	rot	grün	rot	grün
7 (4,5)	grün	rot	rot	grün	rot	rot
1 (0,6)	grün	rot	rot	rot	rot	grün
5 (3,2)	rot	grün	grün	grün	grün	grün
4 (2,5)	rot	grün	grün	grün	grün	rot
1 (0,6)	rot	grün	grün	grün	rot	grün
5 (3,2)	rot	grün	grün	grün	rot	rot
4 (2,5)	rot	grün	grün	rot	rot	rot
1 (0,6)	rot	grün	rot	grün	rot	grün
1 (0,6)	rot	grün	rot	grün	rot	rot
1 (0,6)	rot	grün	rot	rot	rot	grün
2 (1,3)	rot	rot	grün	grün	grün	grün
1 (0,6)	rot	rot	grün	grün	grün	rot
1 (0,6)	rot	rot	grün	grün	rot	grün
2 (1,3)	rot	rot	grün	grün	rot	rot
2 (1,3)	rot	rot	grün	rot	rot	rot
1 (0,6)	rot	rot	rot	grün	grün	grün
1 (0,6)	rot	rot	rot	grün	rot	rot

Abbildung 5: Übersichtsdarstellung der untersuchten und nicht untersuchten Immunfärbungen mit Angabe der Anzahl von zugehörigen Patientenfällen (grün – vorhanden und untersucht; rot – nicht vorhanden und nicht untersucht).

3.2 Histologie

Alle Biopate der 157 Patienten umfassenden Kohorte zeigten variable Mengen an interstitiellen Amyloidablagerungen mit einer charakteristischen gelb-grünen anomalen Polarisationsfarbe im polarisierten Licht nach Kongorot-Färbung. Der mediane Amyloidgehalt aller untersuchten Biopate betrug 44,7 % (Umfang: 1,2 % - 86,9 %). Der untersuchte mediane Kardiomyozytendurchmesser betrug 21,5 μm (Umfang 13 – 37,9 μm).

3.3 Nachweis von Immunzellen im Herzen von Patienten mit AL- und ATTR-Amyloid

Ich prüfte im Anschluss an die histologische Untersuchung das Vorhandensein und die Menge der im Herzen nachweisbaren T-Lymphozyten (CD3), Makrophagen (CD68) und neutrophilen Granulozyten (MPO). Auf Grund der begrenzten Anzahl an Leerschnitten, standen mir dafür Leerschnitte von 89 Patienten der Kohorte für CD3, 58 für CD68 und 52 für MPO zur Verfügung. In 38 (42,7%) Fällen wies ich T-Lymphozyten, in 31 (59,6%) neutrophile Granulozyten - und in 27 (46,6 %) Makrophagen nach.

Die Dichte der CD3-positiven Zellen variierte von 0 bis 6,3 pro mm^2 und betrug im Median 0. In Fällen der MPO-positiven Zellen ließ sich eine Variation der Zelldichte von 0 bis 31,9 pro mm^2 feststellen, mit einem Median von 0,21 pro mm^2 . Bei CD68-positiven Zellen wurde eine Zelldichte von 0 bis 6,3 pro mm^2 berechnet, mit einem Medianwert von 0.

3.4 Immunfärbungen von Komplement 9 und Caspase 3

Der immunhistologische Nachweis von C9 erfolgte in 81 Fällen. Somit lagen 81 gültige Messwerte vor. In allen AL- und ATTR-Amyloidfällen reagierte der gegen C9-gerichtete Antikörper homogen mit den Amyloidablagerungen (siehe Abbildung 6). Außerhalb der Amyloidablagerungen konnte keine interstitielle Immunreaktion mit dem gegen C9 gerichteten Antikörper nachgewiesen werden. Nachfolgend wurde die zelluläre Expression von C9 in Kardiomyozyten untersucht. Insgesamt wurde in 16 von 99 Fällen Einzelzellen gefunden, die sich mit anti-C9-Antikörpern anfärben ließen. Diese wurden weiter als C9-positive Myozyten beschrieben.

Zur immunhistologischen Untersuchung von Cas3-positiver Fläche lagen 89 gültige Messwerte vor, in 68 Fällen konnte Caspase 3 nicht im Amyloid nachgewiesen werden. Die prozentuale Flächenanteil des Cas3-gefärbten Amyloidareals variierte von 0,2 bis 15,5 %.

3.5 Statistik

Schließlich korrelierte ich die verschiedenen histopathologischen Befunde mit den klinischen Patientencharakteristika.

Es wurde die Korrelation von *amyloid load* und Myozytendurchmesser untersucht. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Myozytendurchmesser und Amyloidgehalt nachgewiesen werden, weder in der Gesamtkohorte noch separat für AL- und ATTR-Amyloidablagerungen. Somit konnte festgestellt werden, dass der Gehalt von Amyloid im Herzmuskelgewebe keinen Einfluss auf den Durchmesser der Herzmuskelzellen hat.

Es folgte eine Untersuchung des bestimmten Myozytendurchmessers mit vorliegenden Patientencharakteristika. Interessanterweise zeigte sich bei der Untersuchung der Gewebe-Doppler-Bildgebung, dass eine geringe TDIs mit hohem Amyloidgehalt, eine hohe TDIs mit einem geringen Amyloidgehalt korrelierte. Aufgrund der zahlreichen Untersuchungen fiel der p-Wert unter die Grenze der statistischen Signifikanz ($p = 0,024$). Ein Zusammenhang lässt sich dennoch in der folgenden Tabelle bestimmen. Korrelationen des Myozytendurchmessers mit klinischen Patientencharakteristika (NYHA-Klasse, *NTproBNP*, *LA size*, TDIs, MAPSE, *precord. Voltage* und *limb voltage*) werden in Tabelle 4 aufgeführt.

		Kardiomyozytendurchmesser [μm]	
		<i>low n (%)</i>	<i>high n (%)</i>
Insgesamt	n p⁽¹⁾	63 (50.0)	63 (50.0)
Amyloidtyp	n p⁽¹⁾	126	0.859
AL		31 (51.7)	29 (48.3)
ATTR		32 (48.5)	34 (51.5)
Amyloid-gehalt [%] insg.	N p⁽¹⁾	106	1.000
<i>low n (%)</i>		26 (45.6)	31 (54.4)
<i>high n (%)</i>		22 (44.9)	27 (55.1)
Amyloid-gehalt [%] AL	n p⁽¹⁾	50	0.785
<i>low n (%)</i>		13 (50.0)	13 (50.0)
<i>high n (%)</i>		11 (45.8)	13 (54.2)
Amyloid-gehalt [%] ATTR	n p⁽¹⁾	56	1.000
<i>low n (%)</i>		13 (41.9)	18 (58.1)
<i>high n (%)</i>		11 (44.0)	14 (56.0)
NYHA	n p⁽¹⁾	122	0.702
1		1 (33.3)	2 (66.7)

2		21 (53.8)	18 (46.2)
3		37 (47.4)	41 (52.6)
4		1 (50.0)	1 (50.0)
NYHA	n p⁽¹⁾	122	0.704
1 / 2		22 (52.4)	20 (47.6)
2 / 3		38 (47.5)	42 (52.5)
NTproBNP	n p⁽¹⁾	123	0.368
<i>low n (%)</i>		26 (44.8)	32 (55.2)
<i>high n (%)</i>		35 (53.8)	30 (46.2)
LA size	n p⁽¹⁾	122	0.153
<i>low n (%)</i>		35 (55.6)	28 (44.4)
<i>high n (%)</i>		25 (42.4)	34 (57.6)
TDIs	n p⁽¹⁾	113	0.024^(*)
<i>low n (%)</i>		24 (40.0)	36 (60.0)
<i>high n (%)</i>		33 (62.3)	20 (37.7)
MAPSE	n p⁽¹⁾	121	0.856
<i>low n (%)</i>		33 (50.0)	33 (50.0)
<i>high n (%)</i>		26 (47.3)	29 (52.7)
Precord. Voltage	n p⁽¹⁾	116	0.099
<i>low n (%)</i>		33 (55.9)	26 (44.1)
<i>high n (%)</i>		23 (40.4)	34 (59.6)
Limb. Voltage	n p⁽¹⁾	116	0.343
<i>low n (%)</i>		37 (52.1)	34 (47.9)
<i>high n (%)</i>		19 (42.2)	26 (57.8)

Tabelle 4: Korrelationen des Myozytendurchmessers mit dem Amyloidgehalt insgesamt (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), Amyloidgehalt vom Typ AL, Amyloidgehalt vom Typ ATTR sowie klinischen Parametern (NYHA-Klasse, NTproBNP, LA size, TDIs, MAPSE, precord. Voltage und limb voltage). Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in *low* und *high* sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) Fisher's exact test (*) Not significant after multiple testing correction).

In 111 Fällen konnte ich immunhistochemische Untersuchungen durchführen, um diese anschließend mit klinischen Patientencharakteristika zu korrelieren. Die Korrelation des Amyloidgehalts dichotomisiert am jeweiligen Median mit dem Amyloidtyp ließ keinen signifikanten Unterschied des *amyloid load* bei Patienten mit AL- und ATTR-Amyloid beobachten ($p = 1,000$).

Bei der Untersuchung von Patienten mit AL-Amyloidose und deren klinisch vorbestimmter NYHA-Klasse zeigte sich, dass der Amyloidgehalt invers mit der NYHA-Klasse korreliert ($p = 0,007$). Diese Beobachtung konnte sowohl bei der Aufteilung der Patientengruppe in NYHA-Klassen 1-4 als

auch bei einer Unterteilung in 2 Gruppen der jeweils NYHA 1- und NYHA 2-Klasse (NYHA 1/2 – *low*) sowie NYHA 3- und NYHA 4-Klasse (NYHA 3/4 – *high*) gemacht werden. Auch die Aufteilung der Amyloidmenge des Typs AL in 1) <20 %, 2) 20-40 % und 3) >40 % zeigte, dass in der ersten Untergruppe fast alle Patientenfälle einer NYHA-Stufe 3 und 4 zuzuordnen wären, in der dritten Untergruppe dagegen einer NYHA-Stufe 2 und 3.

Entsprechend umgekehrt verhielt es sich bei ATTR-Amyloid. Die NYHA-Klasse stieg hier zunehmend mit dem ATTR-Amyloidgehalt ($p = 0,052$; $p = 0,117$ unter Berücksichtigung der NYHA-Klassen 1-4 sowie NYHA *low* und NHA *high*).

Tabelle 5 veranschaulicht die beschriebenen Beobachtungen und Korrelationen des *amyloid load*, und der klinischen Patientencharakteristika: NYHA-Klasse, *NTproBNP*, *LA size*, TDIs, MAPSE, *precord. voltage* und *limb voltage*.

		Amyloid-gehalt [%]			Amyloid-gehalt [%]		Amyloid-gehalt [%]			Amyloid-gehalt [%]	
		insg.			AL		AL			ATTR	
		<i>Total</i>	<i>low</i>	<i>high</i>	<i>low</i>	<i>high</i>	<20 %	20 – 40	>40 %	<i>low</i>	<i>high</i>
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Insgesamt	n p⁽¹⁾	157 (100)	63 (50,0)	62 (39,5)							
NYHA	n p⁽¹⁾	151	120	0,688	57	0,007	57	0,029	63	0,052	
1		3 (2,0)	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	2 (100,0)	0 (0,0)
2		49 (32,5)	18 (46,2)	21 (53,8)	5 (27,8)	13 (72,2)	0 (0,0)	5 (27,8)	13 (72,2)	13 (61,9)	8 (38,1)
3		96 (63,6)	40 (52,6)	36 (47,4)	23 (62,2)	14 (37,8)	8 (21,6)	9 (24,3)	20 (54,1)	17 (43,6)	22 (56,4)
4		3 (2,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
NYHA	n p⁽¹⁾	151	120	0,703	57	0,012	57	0,065	63	0,117	
1 / 2		52 (34,4)	20 (47,6)	22 (52,4)	5 (26,3)	14 (73,7)	0 (0,0)	5 (26,3)	14 (73,7)	15 (65,2)	8 (34,8)

2 / 3		99 (65,6)	41 (52,6)	37 (47,4)	24 (63,2)	14 (36,8)	9 (23,7)	9 (23,7)	20 (52,6)	17 (42,1)	23 (57,5)	
NTproBNP	n p⁽¹⁾	150	120	0,719	59	0,252					61	0,582
<i>low</i>		71 (47,3)	28 (47,5)	31 (52,5)	6 (35,3)	11 (64,7)					22 (52,4)	20 (47,6)
<i>high</i>		79 (52,7)	31 (50,8)	30 (49,2)	23 (54,8)	19 (45,2)					8 (421,1)	11 (57,9)
LA size	n p⁽¹⁾	150	119	1,000	59	0,438					60	0,437
<i>low</i>		78 (49,7)	33 (51,6)	31 (48,4)	14 (45,2)	17 (54,8)					19 (57,6)	14 (42,4)
<i>high</i>		72 (45,9)	28 (50,9)	27 (49,1)	16 (57,1)	12 (42,9)					12 (44,4)	15 (55,6)
TDIs	n p⁽¹⁾	139	110	0,702	53	0,271					57	0,790
<i>low</i>		71 (45,2)	32 (55,2)	26 (44,8)	16 (64,0)	9 (36,0)					16 (48,5)	17 (51,5)
<i>high</i>		68 (43,3)	26 (50,0)	26 (50,0)	13 (46,4)	15 (53,6)					13 (54,2)	11 (45,8)
MAPSE	n p⁽¹⁾	148	119	0,715	59	0,288					60	0,796
<i>low</i>		76 (48,4)	34 (53,1)	30 (46,9)	21 (56,8)	16 (43,2)					13 (48,1)	14 (51,9)
<i>high</i>		72 (45,9)	27 (49,1)	28 (50,9)	9 (40,9)	13 (59,1)					18 (54,5)	15 (45,5)
Precord. Voltage	n p⁽¹⁾	142	113	1,000	56	1,000					57	1,000
<i>low</i>		71 (45,2)	28 (49,1)	29 (50,9)	12 (50,0)	12 (50,0)					16 (48,5)	17 (51,5)
<i>high</i>		71 (45,2)	27 (48,2)	29 (51,8)	15 (46,9)	17 (53,1)					12 (50,0)	12 (50,0)
Limb. Voltage	n p⁽¹⁾	142	113	1,000	56	0,570					57	0,599
<i>low</i>		82 (52,2)	33 (48,5)	36 (51,5)	17 (44,7)	21 (55,3)					16 (53,3)	14 (46,7)
<i>high</i>		60 (38,2)	22 (48,9)	23 (51,5)	10 (55,6)	8 (44,4)					12 (44,4)	15 (55,6)

Tabelle 5: Korrelationen des Amyloidgehalts insgesamt (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), Amyloidgehalt vom Typ AL und Amyloidgehalt vom Typ ATTR mit klinischen Parametern (NYHA-Klasse, *NTproBNP*, *LA*

size, TDIs, MAPSE, *precord. voltage* und *limb voltage*). Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in *low* und *high* sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) Fisher's exact test).

Tabelle 6 zeigt, dass der Nachweis von C9-positiven Myozyten unabhängig vom Amyloidtyp keine Korrelation mit Amyloidgehalt aufweist.

		Nachweis von C9-positiven Myozyten	
		<i>low</i> n (%)	<i>high</i> n (%)
Amyloid- gehalt [%] insg.	n p⁽¹⁾	71 0,365	
<i>low</i> n (%)		31 (77,5)	9 (22,5)
<i>high</i> n (%)		27 (87,1)	4 (12,9)
Amyloid- gehalt [%] AL	n p⁽¹⁾	39 1,000	
<i>low</i> n (%)		17 (68,0)	8 (32,0)
<i>high</i> n (%)		10 (71,4)	4 (28,6)
Amyloid- gehalt [%] ATTR	n p⁽¹⁾	32 0,469	
<i>low</i> n (%)		14 (93,3)	1 (6,7)
<i>high</i> n (%)		17 (100,0)	0 (0,0)

Tabelle 6: Korrelationen des Nachweises C9-positiver Myozyten mit dem Amyloidgehalt insgesamt (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), Amyloidgehalt vom Typ AL und Amyloidgehalt vom Typ ATTR. Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in *low* und *high*. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) Fisher's exact test).

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs von Anteil der C9-positiven Fläche an der Gesamtfläche und Amyloidgehalt fiel auf, dass beide Messwerte korrelierten, sich dies aber nur an den Rohwerten nachweisen ließ ($p = 0,173$). Bei der Unterteilung am Median in *low* und *high* zeigte sich der Zusammenhang statistisch nicht signifikant, auch die Untersuchung der Rohwerte separat für AL- und ATTR-Fälle ergab keinen signifikanten Zusammenhang. Ich konnte dennoch beobachten, dass in ATTR-Amyloidfällen der Quotient von C9-positiver Fläche höher ausfiel als bei AL-Amyloidflächen ($p = 0,011$). Für den entsprechenden Caspase 3-Quotienten konnte ich dies nicht nachweisen, ich beobachtete keinen Zusammenhang zwischen dem Amyloidtyp und dem Verhältnis von Caspase 3-positiver Fläche und Gesamtfläche. Tabelle 7 veranschaulicht die beschriebenen Erkenntnisse.

		Anteil des C9-pos. Areal		Anteil des Caspase 3-positiven Areal	
		<i>low</i> n (%)	<i>high</i> n (%)	<i>low</i> n (%)	<i>high</i> n (%)
Amyloidtyp	n p⁽¹⁾	75 0,011			
AL		24 (64,9)	13 (35,1)		
ATTR		13 (34,2)	25 (65,8)		
Amyloidgehalt [%] insg.	n p⁽¹⁾	53 0,173		62 0,798	
<i>low</i> n (%)		16 (59,3)	11 (40,7)	19 (54,3)	16 (45,7)
<i>high</i> n (%)		10 (38,5)	16 (61,5)	13 (48,1)	14 (51,9)
Amyloidgehalt [%] AL	n p⁽¹⁾	30 1,000			
<i>low</i> n (%)		13 (72,2)	5 (27,8)		
<i>high</i> n (%)		8 (66,7)	4 (33,3)		
Amyloidgehalt [%] ATTR	n p⁽¹⁾	23 0,343			
<i>low</i> n (%)		3 (33,3)	6 (66,7)		
<i>high</i> n (%)		2 (14,3)	12 (85,7)		

Tabelle 7: Korrelationen des Anteils des C9-positiven und Caspase 3-positiven Fläche mit dem Amyloidtyp, Amyloidgehalt insgesamt (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), Amyloidgehalt vom Typ AL und Amyloidgehalt vom ATTR. Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in *low* und *high* sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) Fisher's exact test).

Die statistische Auswertung der Immunzellmesswerte zeigte, dass im Fall der Makrophagendichte mit zunehmender NYHA-Stufe die Zahl der CD68-positiven Zellen zunahm. Trotz fehlender statistischer Signifikanz ließ sich diese Beobachtung für alle Amyloidfälle (unabhängig vom Amyloidtyp) sowohl bei der NYHA-Klassen-Einteilung 1-4 als auch bei Unterteilung der NYHA-Klassen in 2 Gruppen (1 / 2 – *low* und 3 / 4 - *high*) nachweisen ($p = 0,009$, $p = 0,006$). Im Falle der Makrophagendichte bei Patienten mit Amyloidose des Typs AL kam ich bei der Untersuchung der Korrelation mit der NYHA-Klassen-Einteilung in *low* und *high* zu ähnlichen Schlüssen ($p = 0,041$). Zusätzlich ließ sich für den klinischen Parameter des NTproBNP bei ATTR-Amyloidosen beobachten: je höher das NTproBNP, desto größer die Makrophagendichte. Weitere Untersuchungen der Zusammenhänge von Makrophagendichte und LA size, TDIs, MAPSE, *precord. voltage* und *limb. voltage* zeigten keine Korrelationen. Auch die Untersuchung der CD3- und MPO-positiven Zellen mit Amyloidtyp, Amyloidgehalt und den genannten Patientencharakteristika zeigten keine nennenswerten Zusammenhänge. Tabelle 8 und

Tabelle 9 stellen die genannten Korrelationen entsprechend für die CD68-positive Zelldichte (mit separater Darstellung der Ergebnisse für AL und ATTR) sowie für die CD3- und MPO-positive Zelldichte mit den klinischen Patientencharakteristika vor.

		Dichte der CD68-pos. Zellen, insg.		Dichte der CD68-pos. Zellen, AL		Dichte der CD68-pos. Zellen, ATTR	
		<i>low n (%)</i>	<i>high n (%)</i>	<i>low n (%)</i>	<i>high n (%)</i>	<i>low n (%)</i>	<i>high n (%)</i>
NYHA	n p⁽¹⁾	57	0,009	32	0,080	25	0,080
1		2 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
2		11 (84,6)	2 (15,4)	6 (85,7)	1 (14,3)	5 (83,3)	1 (16,7)
3		17 (41,5)	24 (58,5)	9 (39,1)	14 (60,9)	8 (44,4)	10 (55,6)
4		1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
NYHA	n p⁽¹⁾	57	0,006	32	0,041	25	0,090
1 / 2		13 (86,7)	2 (13,3)	7 (87,5)	1 (12,5)	6 (85,7)	1 (14,3)
2 / 3		18 (42,9)	24 (57,1)	10 (41,7)	14 (58,3)	8 (44,4)	10 (55,6)
NTproBNP	n p⁽¹⁾	56	0,054	32	0,691	24	0,038
<i>low</i>		15 (71,4)	6 (28,6)	5 (62,5)	3 (37,5)	10 (76,9)	3 (23,1)
<i>high</i>		15 (42,9)	20 (57,1)	12 (50,0)	12 (50,0)	3 (27,3)	8 (72,7)
LA size	n p⁽¹⁾	57	1.000	32	1.000	25	1.000
<i>low</i>		18 (54,5)	15 (45,5)	10 (52,6)	9 (47,4)	8 (57,1)	6 (42,9)
<i>high</i>		13 (54,2)	11 (45,8)	7 (53,8)	6 (46,2)	6 (54,5)	5 (45,5)
TDIs	n p⁽¹⁾	53	0.170	30	0.730	23	0.102
<i>low</i>		12 (46,2)	14 (53,8)	8 (50,0)	8 (50,0)	4 (40,0)	6 (60,0)
<i>high</i>		18 (66,7)	9 (33,3)	8 (57,1)	6 (42,9)	10 (76,9)	3 (23,1)
MAPSE	n p⁽¹⁾	56	0.596	32	0.712	24	1.000
<i>low</i>		16 (51,6)	15 (48,4)	11 (50,0)	11 (50,0)	5 (55,6)	4 (44,4)
<i>high</i>		15 (60,0)	10 (40,0)	6 (60,0)	4 (40,0)	9 (60,0)	6 (40,0)
Precord. Voltage	n p⁽¹⁾	57	0.794	31	1.000	26	1.000
<i>low</i>		13 (52,0)	12 (48,0)	8 (53,3)	7 (46,7)	5 (50,0)	5 (50,0)
<i>high</i>		18 (56,3)	14 (43,8)	9 (56,3)	7 (43,8)	9 (56,3)	7 (43,8)
Limb. Voltage	n p⁽¹⁾	57	0.601	31	0.097	26	0.422
<i>low</i>		19 (57,6)	14 (42,4)	15 (65,2)	8 (34,8)	4 (40,0)	6 (60,0)
<i>high</i>		12 (50,0)	12 (50,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	10 (62,5)	6 (37,5)

Tabelle 8: Korrelationen der Dichte der CD68-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe insg. (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), sowie der Dichte der CD68-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe vom Typ AL und der Dichte der CD68-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe vom Typ ATTR mit klinischen Parametern (NYHA-Klasse, *NTproBNP*, *LA size*, TDIs, MAPSE, *precord. voltage* und *limb voltage*). Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in *low* und *high* sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) Fisher's exact test).

		Dichte der CD3-pos. Zellen, insg.		Dichte der MPO-pos. Zellen, insg.	
		<i>low</i> n (%)	<i>high</i> n (%)	<i>low</i> n (%)	<i>high</i> n (%)
NYHA	n p⁽¹⁾	86	0.710	50	0.502
1		2 (66.7)	1 (33.3)	1 (50.0)	1 (50.0)
2		13 (54.2)	11 (45.8)	7 (63.6)	4 (36.4)
3		34 (58.6)	24 (41.4)	18 (48.6)	19 (51.4)
4		1 (100.0)	0 (0.0)	0	0
NYHA	n p⁽¹⁾	86	0.816	50	0.526
1 / 2		15 (55.6)	12 (44.4)	8 (61.5)	5 (38.5)
2 / 3		35 (59.3)	24 (40.7)	18 (48.6)	19 (51.4)
NTproBNP	n p⁽¹⁾	85	0.659	50	1.000
<i>low</i>		19 (54.3)	16 (45.7)	10 (50.0)	10 (50.0)
<i>high</i>		30 (60.0)	20 (40.0)	15 (50.0)	15 (50.0)
LA size	n p⁽¹⁾	86	0.664	51	0.400
<i>low</i>		28 (59.6)	19 (40.4)	17 (56.7)	13 (43.3)
<i>high</i>		21 (53.8)	18 (46.2)	9 (42.9)	12 (57.1)
TDIs	n p⁽¹⁾	80	0.822	47	0.772
<i>low</i>		24 (57.1)	18 (42.9)	13 (52.0)	12 (48.0)
<i>high</i>		23 (60.5)	15 (39.5)	10 (45.5)	12 (54.5)
MAPSE	n p⁽¹⁾	84	1.000	50	0.159
<i>low</i>		27 (57.4)	20 (42.6)	13 (43.3)	17 (56.7)
<i>high</i>		22 (59.5)	15 (40.5)	13 (65.0)	7 (35.0)
Precord. Voltage	n p⁽¹⁾	85	0.188	50	0.778
<i>low</i>		28 (66.7)	14 (33.3)	13 (54.2)	11 (45.8)
<i>high</i>		22 (51.2)	21 (48.8)	12 (46.2)	14 (53.8)
Limb. Voltage	n p⁽¹⁾	85	1.000	50	1.000
<i>low</i>		31 (59.6)	21 (40.4)	14 (50.0)	14 (50.0)
<i>high</i>		19 (57.6)	14 (42.4)	11 (50.0)	11 (50.0)

Tabelle 9: Korrelationen der Dichte der CD3-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe insg. (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), sowie MPO-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe insg. (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps) mit klinischen Parametern (NYHA-Klasse, *NTproBNP*, *LA size*,

TDIs, MAPSE, *precord. voltage* und *limb voltage*). Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in *low* und *high* sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) Fisher's exact test).

Abbildung 6 zeigt den Vergleich der Kongorot- und Anti-C9-Immunreaktion mit anschließender ImageJ-Berechnung der Fläche bzw. Flächenanteile.

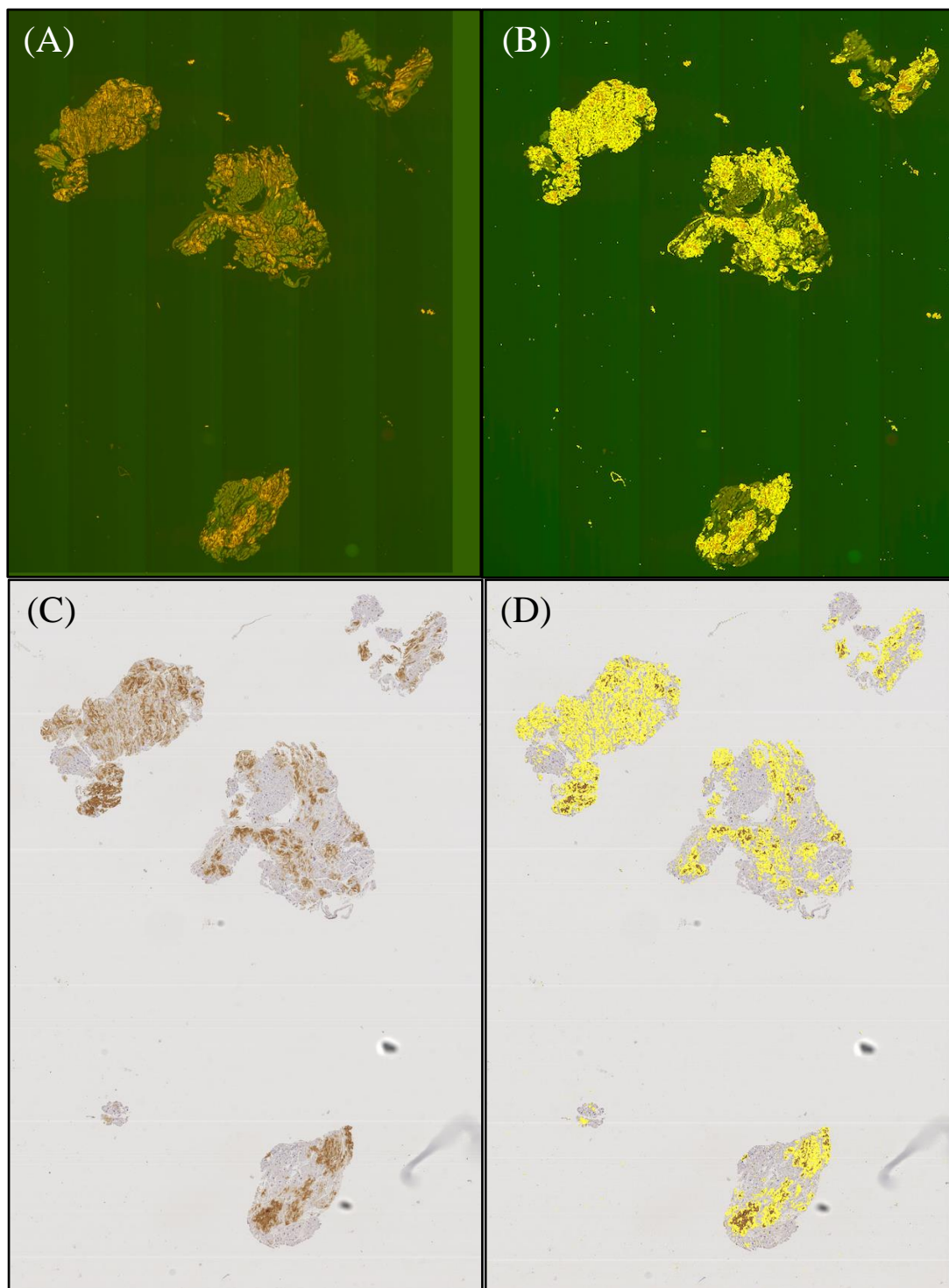


Abbildung 6: Vergleich von Kongorot- (A, B) und Anti-C9-Immunreaktion (C, D) in Serienschnitten des AL-Amyloid-befallenen Herzmuskelgewebes in 5-facher Vergrößerung mittels Mikroskopie. A und C zeigen die jeweiligen Färbungen, B und D zeigen die ImageJ-Berechnung. Bei A, B, C und D handelt es sich um einen Patientenfall.

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit konnten folgende Hypothesen bestätigt werden:

- 1) Im amyloidbefallenen Herzmuskelgewebe werden unterschiedliche Entzündungszellen und Zelltodformen nachgewiesen. Hierbei handelt es sich entsprechend um T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen.
- 2) Im amyloidbefallenen Herzmuskelgewebe wird Zelltod nachgewiesen.
- 3) Es lässt sich ein Amyloidtyp-abhängiger Unterschied bei klinisch-pathologischen Patientencharakteristika nachweisen.
- 4) Es besteht ein statistisch nicht signifikanter Zusammenhang zwischen der Dichte von Entzündungszellen und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.

Folgender Teilspekt der genannten Fragestellungen wurde verworfen:

- 1) Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Dichte von Entzündungszellen und dem Amyloidgehalt.
- 2) Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Durchmesser von Herzmuskelzellen und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.

Amyloidablagerungen verursachen unterschiedliche Krankheitsformen, deren Auftreten und Vielfalt vermutlich bis heute unterschätzt werden (Chiti & Dobson, 2006). Der Diagnostik einer kardialen Beteiligung bei einer systemischen Amyloidose kommt eine hervorgehobene Rolle zu, da diese mit einer deutlich schlechteren Prognose für den Patienten sowie einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht (Siddiqi & Ruberg, 2018).

4.1 Es werden T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen im amyloidbefallenen Areal nachgewiesen.

Die Bildung von Amyloid kann mit einer lokalen Entzündungsreaktion einhergehen. Immunhistochemisch gelang mir der Nachweis von T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Herzbiopsaten von Patienten mit AL- und ATTR-Amyloid. Das Vorliegen von CD3-, MPO- und CD68-positiven Zellen wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben (Argilés et al., 1994; Jadoul et al., 2001; Nakamura et al., 1999; Pucci et al., 2021).

Makrophagen besiedeln in ihrem Lebenszyklus Gewebe verschiedenen Ursprungs. Einmal im Gewebe, unterstützen Makrophagen die Aufrechterhaltung der lokalen Homöostase und wachen über die Immunabwehr. Nicolas-Avila et al. schrieben von kardioresidenten Makrophagen, die, neben den dominierenden Kardiomyozyten und Fibroblasten, fester Bestandteil der zellulären Zusammensetzung kardialen Gewebes sind (Nicolas-Avila et al., 2020). Immunhistochemisch konnte ermittelt werden, dass ein Kardiomyozyt durchschnittlich fünf Makrophagen berührt (Nicolas-Avila et al., 2020). Somit sollte man bei histologischen Untersuchungen des kardialen Gewebes von einer entsprechenden Anzahl CD68-positiver Zellen ausgehen, die in gesundem Herzmuskelgewebe grundsätzlich vorhanden ist.

Es ist anzunehmen, dass Makrophagen das Myokard von Patienten mit kardialer Amyloidose infiltriert haben, um Amyloidfibrillen zu phagozytieren und aufzulösen, doch der genaue Ablauf der Ereignisse ist noch unbekannt (Richey et al., 2019). Zusätzlich wurde beschrieben, dass die Immunzellinfiltration in Behandlungsstrategien unter Verwendung von Transthyretinantikörpern eingesetzt wird, die eine Phagozytose von ATTR-Aggregaten induzieren und somit die Amyloidlast im Myokard reduzieren (Michalon et al., 2021). Diese Beobachtung würde die Hypothese bestätigen, wonach es zu einer aktiven Aufnahme von Amyloid durch Immunzellen kommt und somit eine erhöhte Immunzellpräsenz im amyloidbefallenen Gewebe von hoher prognostischer Bedeutung wäre.

Widererwarten wurde statistisch kein Zusammenhang zwischen der Dichte von CD3-, MPO- und CD68-positiven Zellen und dem Amyloidgehalt nachgewiesen. Es liegen Ergebnisse vor, die auf einen Zusammenhang von Immunzellinfiltration in amyloidbelastetem Gewebe und dem Gehalt der angereicherten Amyloidfibrillen hindeuten (Pucci et al., 2021). In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass Amyloid im Herzmuskelgewebe ein signifikanter Faktor für die Dichte von T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen ist.

Zusätzlich sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Histologie einer Entzündung im Myokard durch die, um immunhistochemische Kriterien ergänzte, qualitative Dallas-Kriterien definiert wird. Während eines akuten entzündlichen Krankheitsverlaufs weisen histologische und immunhistologische Proben Zellinfiltrationen durch Lymphozyten und/oder Makrophagen auf (Dominguez et al., 2016). Andere Entzündungszellen sind selten (Dominguez et al., 2016). Bei CD3-positiven Zellen spricht man von einer Untergrenze von mindestens 8 Zellen pro Quadratmillimeter, bei CD68-positiven Zellen von mindestens 36 Zellen pro Quadratmillimeter, ab der man per Definition von Entzündung im Myokard spricht (Dominguez et al., 2016).

Für die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bedeutet dies, dass obwohl man im Fall von T-Lymphozyten und Makrophagen eine Infiltration im amyloidbefallenen Gewebe beobachtet, die Kriterien einer Entzündung des Herzmuskelgewebes nicht erfüllt werden. Somit kann festgestellt

werden, dass in den untersuchten Gewebeschnitten keine Myokarditis im eigentlichen Sinne vorliegt. Dies bedeutet jedoch nicht, dass Entzündungszellen im amyloidbefallenen Gewebe keine Rolle spielen.

Die folgende grafische Darstellung der gemessenen Immunzelldichte veranschaulicht auf einer logarithmischen Y-Achse die erhobenen Werte und vergleicht diese mit den in der Literatur beschriebenen Schwellenwerten.

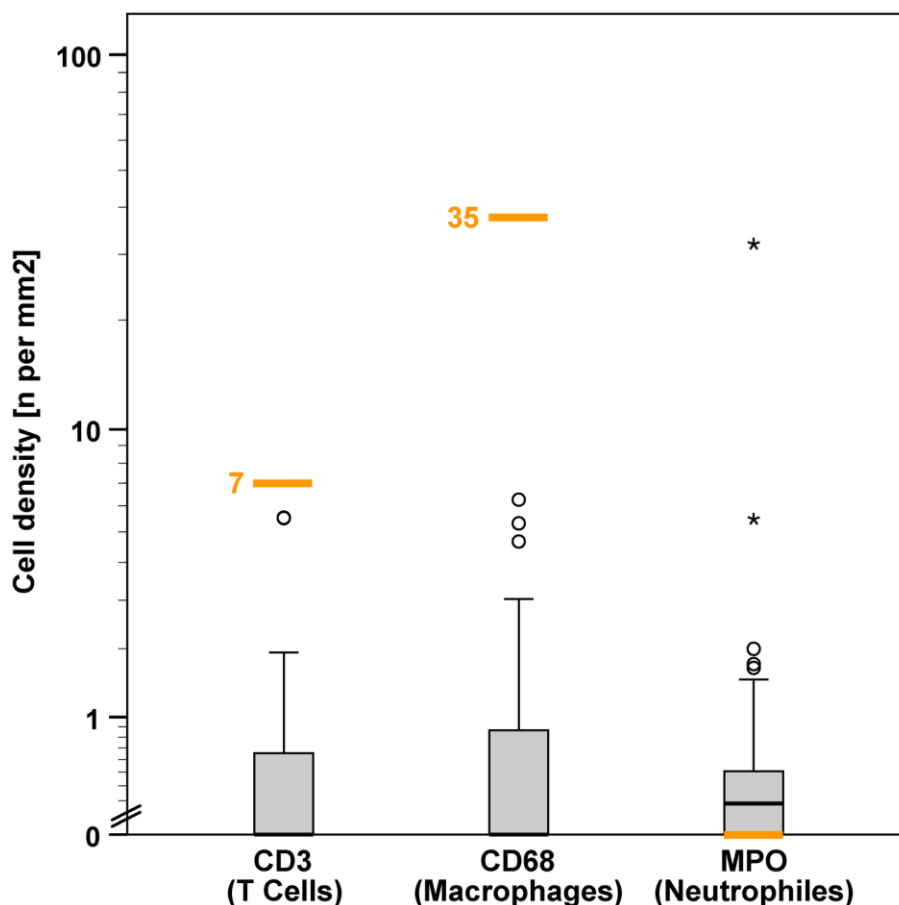


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Werteverteilung der Dichten von T-Lyphozyten (CD3-positiv), Makrophagen (CD-68-positiv) und Neutrophilen Granulozyten (MPO-positiv) auf einer logarithmischen Y-Achse mit Markierung entsprechender Schwellenwerte (orangefarbige Linie), die die Grenzwerte für Entzündung darstellen (orangefarbige Zahlen) (Dominguez et al., 2016; Simon et al., 2024). Der Schwellenwert für Neutrophile wurde bei 0 eingezeichnet. Einzeln als Kreise bzw. Sternchen dargestellten Messwerte stellen *outliers* beziehungsweise Extremwerte dar.

4.2 Komplement 9 und Caspase 3 sind in Amyloid-haltigen Herzbiopptaten nachweisbar

Die Komplementkomponente C9 ist das zentrale Element für den Membranangriffskomplex im Immunsystem aller Wirbeltiere. Zusammen mit der Caspase 3, einer Protease und Effektorcaspase im Prozess der Apoptose, wird C9 in immunhistochemischen Untersuchungen als Marker von Zelltod-

formen angewandt (Podack et al., 1982; Esser et al., 1979), wenn sie in Zellen nachgewiesen werden. Die Bedeutung des immunhistochemischen Nachweises von C9 und Cas3 außerhalb von Zellen, d.h. im Interstitium oder innerhalb von Amyloid, ist unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Anreicherung von C9 und eine gering ausgeprägte Präsenz von Caspase 3 in ATTR- und AL-amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe beobachtet werden. Die Untersuchung von C9-positiven Myozyten zeigte, dass keine Korrelation zu Amyloidgehalt bei ATTR- und AL-Amyloid sowie unabhängig vom Amyloidtyp besteht. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, die in der Arbeit von Lux' (2021) beschrieben wurden (Lux et al., 2021). In der genannten Publikation wurden Gewebebiopate unterschiedlichen Ursprungs auf die Prävalenz von Caspase 3- und C9-Positivität untersucht. Die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse wiesen auf eine spezifische Anreicherung von C9 in amyloidbefallenem Gewebe hin. Dieses stellte sich als regelhafter Bestandteil von Amyloid heraus. Deutlich seltener treten dagegen C9-positive Zellen auf. Im Fall von Caspase 3 zeigte sich, dass diese nur unregelmäßig in amyloidbefallenem Areal nachgewiesen werden konnte. Aus den Daten lässt sich ableiten, dass Caspase 3 ein im Amyloid selten vorkommendes Protein ist, das auch nur einen Bruchteil der Amyloidablagerung abdeckt.

Kourelis et al. untersuchten Unterschiede in der Häufigkeit amyloidspezifischer Proteine in Bezug auf klinische Patientencharakteristika (Kourelis et al., 2020). Im Gegensatz zu AL-Amyloidablagerungen konnte in ATTR-amyloidbefallenem Gewebe eine Zunahme der Komplementproteine beobachtet werden (Kourelis et al., 2020). Obwohl in der genannten Studie die Identifizierung der Proteine mittels Lasermikrodissektion und anschließender Flüssigkeitschromatographie erfolgte, stimmen die Ergebnisse mit denen der hier vorliegenden Arbeit überein. ATTR-Fälle wiesen eine höhere C9-angefärbte extrazelluläre Amyloidfläche als AL-Fälle auf. Bei C9-positiven Zellen zeigte sich dieser Amyloid-Typ-abhängige Unterschied nicht. Trotz fehlender statistischer Signifikanz aufgrund der geringen Fallzahl, unterstützt diese Beobachtung die Validität der hier präsentierten Daten.

4.3 Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Dichte von Entzündungszellen und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.

Makrophagen kommen in Amyloidablagerungen häufig vor (Stats & Stone, 2016). Eine fortgeschrittene systemische Amyloidose mit kardialer Beteiligung kann zu einer globalen Herzinsuffizienz führen. Betroffene Patienten leiden an Symptomen eines Rechtsherzversagens. Zu den möglichen Krankheitsanzeichen gehören ein erhöhter jugularvenöser Druck, periphere Ödeme, Hepatomegalie und Aszites. Seltener kommt es auch zu einer Linksherzinsuffizienz, die sich durch das Auftreten eines Lungenödems oder einer belastungsabhängigen Dyspnoe manifestieren kann (Ihne et al., 2019).

Die NYHA-Klassifikation dient der Einteilung der Herzinsuffizienz in bestimmte Stadien nach klar definierten Kriterien. Bei der Untersuchung zur Korrelation der NYHA-Klasse und der Makrophagendichte (CD68) stellte sich überraschenderweise heraus, dass eine höhere Makrophageninfiltration des amyloidbefallenen Gewebes mit einer höheren NYHA-Klasse, einer stärkeren Herzinsuffizienzsymptomatik, einhergeht. Es wäre zu erwarten, dass mit zunehmender kardialer Symptomatik und damit verbundener Hochstufung in der NYHA-Klassifikation, es zu einer Zunahme des Entzündungszellinfiltrats kommt. Bei NTproBNP lässt sich ein ähnlicher Effekt beobachten. Je höher das NTproBNP desto mehr Makrophagen. Somit lässt sich einmal mehr unterstreichen, dass Makrophagen in irgendeiner Form eine Rolle im amyloidbefallenen Myokard spielen. Diese Beobachtung gilt vor allem für Patientenfälle des AL-Amyloidtyps.

Kristen et al. stellten fest, dass sich der Pathomechanismus einer AL- und ATTR-Amyloidose unterscheiden muss (Kristen et al., 2016). Nachdem ich die Korrelation des *amyloid load* mit den einzelnen NYHA-Stufen untersuchte, ließen sich Erkenntnisse der Arbeit von Kristen et al. bestätigen, mehr noch, sie lieferte eine indirekte Bestätigung des beobachteten Zusammenhangs der Makrophagendichte mit den NYHA-Klassen (Kristen et al., 2016). Der beobachtete Effekt könnte sich dadurch erklären lassen, dass Leichtkettenfragmente toxisch wirken können und schädliche Intermediärprodukte auch bei gering vorhandenen Amyloidablagerungen Myokardzellen angreifen. Im fortgeschrittenen Stadium der kardialen Amyloidose könnte man dagegen von einem biomechanischen Pathomechanismus sprechen (Kristen et al., 2016). Im Fall der AL-Amyloidose würde man, verglichen mit der ATTR-Amyloidoseform, von einem dynamischeren Geschehen sprechen mit einer ausgeprägten Toxizität der präfibrillären Strukturen (Kristen et al., 2016).

4.4 Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Durchmesser von Herzmuskelzellen und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika.

In der Arbeit von Sukhacheva et al. (2016) wurden die Durchmesser der Kardiomyozyten bei bekannten kardialen Amyloidosen bestimmt, um deren Zusammenhang mit dem klinischen Schweregrad des Vorhofflimmerns zu untersuchen. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass mit der intrazellulären Amyloidanreicherung eine Zunahme des gesamten Kardiomyozytendurchmessers einherging (Sukhachva et al., 2016). Dieser wiederum korrelierte interessanterweise positiv mit dem Auftreten eines permanenten Vorhofflimmerns und negativ mit dem paroxysmalen Vorhofflimmern (Sukhachva et al., 2016). Unter den in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten Patienteneigenschaften konnte für das *Tissue-Doppler-Imaging* (TDI) eine Korrelation ermittelt werden (statistisch nicht signifikant, $p = 0,024$). Das TDI ist eine Technik, die Messungen der myokardialen Bewegung und des *timing* von

myokardialen Ereignissen erlaubt (Nestaas et al., 2018). Die hohe Zeitauflösung und die Möglichkeit der Links- und Rechtsherzfunktionsbeurteilung, machen den Gewebedoppler zu einem hervorragenden Diagnostikum zur Beurteilung der Herzfunktion, vorzugsweise auf atrioventrikulärer Ebene (Nestaas et al., 2018).

Die Ergebnisse der Untersuchung von Sukhacheva et al. (2016) und Nestaas et al. (2018) stimmen mit dem beobachteten Zusammenhang zwischen dem Durchmesser der Herzmuskelzellen und dem TDI der Patienten im vorliegenden Kollektiv überein (Sukhacheva et al., 2016; Nestaas et al., 2018). Somit konnte bestätigt werden, dass eine erhöhte intrazelluläre Amyloidablagerung im myokardialen Gewebe eine Funktionseinschränkung des betroffenen Organs verursacht. Paradoxerweise konnte in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen dem Durchmesser von Herzmuskelzellen und dem Amyloidgehalt nicht festgestellt werden.

4.5 Studieneinschränkungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beruhen ausschließlich auf immunhistochemischen Färbungen der Gewebeproben. Grundsätzlich könnten immunhistochemische Studien durch zusätzliche Untersuchungen erweitert und unterstützt werden, insbesondere im Hinblick auf weitere Charakterisierungen der Immunzellsubpopulationen und die Quantifizierung der Zellzahl und -dichte. Fluoreszenzunterstützte Zellsortierungen könnten zum Einsatz kommen, um so Immunzellen mit mehreren Markern gleichzeitig zu markieren und dadurch eine Bestimmung der Subpopulation durch das Vorhandensein mehrerer CD-Proteine durchzuführen. Dafür wäre jedoch frisches Gewebe erforderlich, was bei der geringen Prävalenz der Amyloidose schwer umsetzbar wäre. Fixiertes Gewebe kann dagegen konserviert und gelagert werden, was wiederum fortlaufende Färbungen mit anschließendem Vergleich des Materials ermöglicht.

Darüber hinaus sollte nicht unerwähnt bleiben, dass die erhobenen Surrogatmarker für die hier untersuchten zwei verschiedenen Formen des Zelltods (Nekrose und Apoptose) ausschließlich auf dem positiven zellulären Nachweis der Proteine beruhen. Dies bedeutet, dass man über tatsächlich stattfindende Apoptose- und Nekroseprozesse nur mutmaßen kann. Perspektivisch ließe sich in *In-Vitro*-Studien an isolierten Myozyten forschen, um so genauere Erkenntnisse über den stattfindenden Mechanismus zu gewinnen.

4.6 Ausblick

Meine Studie lieferte Ergebnisse über das Vorkommen von Entzündungszellen in Amyloidablagerungen in Herzmuskelgewebe. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit Korrelationen klinischer Patientendaten mit dem Gehalt des Amyloids vom Typ AL und ATTR untersucht.

Es konnte keine eindeutige Entzündungsreaktion im untersuchten Gewebe nachgewiesen werden. Die immunhistochemisch nachgewiesenen Immunzellen überschritten den Schwellenwert, ab dem man per Definition von einer Entzündung spricht, nicht.

Es ließ sich eine deutliche Anreicherung von C9 im Amyloid nachweisen. Unabhängig vom Amyloidtyp ließen Anti-C9-Antikörper auf mit Amyloid angereicherter Fläche nachweisen. Hiermit konnte bestätigt werden, dass das ubiquitär im extrazellulären Raum im Amyloid vorkommende C9 ein zusätzliches diagnostisches *tool* zur bisherigen Routinediagnostik mit der Kongorotfärbung darstellen könnte. Bei geringerer Sensitivität der Kongorot-Färbung stellt die C9-Immunhistochemie eine wertvolle Ergänzung dar.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen liefern Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der Dichte der ermittelten CD3-, MPO- und CD68-positiven Zellen und kardiologische Patientendaten. Diese gilt es, erweitert um zusätzliche klinische Patientencharakteristika, über einen längeren Zeitraum zu erfassen.

5 Zusammenfassung

Die AL- und ATTR-Amyloidose sind die häufigsten Formen der kardialen Amyloidose. Beide Varianten der Konformationskrankheit können mit Herzmuskelsstörungen, einer Herzinsuffizienz und weiteren kardialen Symptomen einhergehen. Es sollte nicht überraschen, dass ein Herzmuskelversagen zu den häufigsten Todesursachen unter Amyloidpatienten gehört. Da sowohl der Diagnosezeitpunkt als auch die Organbeteiligung eine wichtige Rolle für die Patienten und deren Prognose spielt, ist ein frühzeitiger Therapiestart mit Beurteilung der kardialen Pumpfunktion entscheidend. Zusätzlich wurden in der Fachliteratur Vermutungen geäußert, dass Amyloid im Herzmuskelgewebe mit einer Entzündung eben dieses Gewebes einhergehen könnte.

In dieser Studie wurden Myokardbiopsien mit nachgewiesener kardialer AL- und ATTR-Amyloidose auf das Vorkommen und die Anzahl von T-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten untersucht. Zusätzlich wurde die Fläche der Amyloidablagerungen, die Fläche der C9-positiv- und Cas3-positiv-angefärbten Amyloids bestimmt und der Durchmesser von Kardiomyozyten gemessen. Anschließend wurden der Zusammenhang der ermittelten Werte mit vorliegenden klinischen Patienteneigenschaften ermittelt. Das Gesamtkollektiv umfasste Myokardbiopate von 157 Patienten. Die Gewebeschnitte wurden histologisch und immunhistochemisch untersucht und bewertet. Hierbei zeigte sich, dass im Myokardgewebe eine variable Anzahl an T-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nachweisbar war. Es wurden Korrelationen zwischen der Anzahl der Makrophagen und der NYHA-Klasse nachgewiesen. Es konnte bestätigt werden, dass Antikörper, die gegen C9 gerichtet waren, homogen mit dem Muster der Amyloidablagerungen übereinstimmten. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen Amyloidgehalt und Cas3-positivem Gewebe. Bei der Untersuchung der Gewebe-Doppler-Bildgebung zeigte sich, dass eine geringe TDIs mit hohem Amyloidgehalt, eine hohe TDIs wiederum mit einem geringen Amyloidgehalt korrelierte.

Die Studie zeigt, dass sich in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe Immunzellen verschiedener Art in variabler Dichte nachweisen lassen, dies jedoch nicht als Entzündungsreaktion gewertet werden kann. Darüber hinaus lässt sich schlussfolgern, dass C9 regelhaft und flächendeckend im Amyloid vorkommt. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen liefern Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der Dichte der ermittelten CD3-, MPO- und CD68-positiven Zellen und kardiologische Patientendaten.

6 Literaturverzeichnis

- Anthony, J. C., Breitner, J. C., Zandi, P. P., Meyer, M. R., Jurasova, I., Norton, M. C. & Stone, S. V. (2000). Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptor antagonists: the Cache County study. *Neurology*, 54, 2066-71.
- Argilés, A., Mourad, G., Kerr, P. G., García, M., Collins, B. & Demaille, J. G. (1994). Cells surrounding haemodialysis-associated amyloid deposits are mainly macrophages. *Nephrol Dial Transplant*, 9, 662-7.
- Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Eisenberg, D. S., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., Sekijima, Y., Sipe, J. D. & Westermarck, P. (2020). Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*, 27, 217-222.
- Biolo, A., Ramamurthy, S., Connors, L. H., O'hara, C. J., Meier-Ewert, H. K., Hoo, P. T. S., Sawyer, D. B., Seldin, D. S. & Sam, F. (2008). Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Cardiac Amyloidosis. *Circulation: Heart Failure*, 1, 249-257.
- Bourgault, S., Choi, S., Buxbaum, J. N., Kelly, J. W., Price, J. L. & Reixach, N. (2011). Mechanisms of transthyretin cardiomyocyte toxicity inhibition by resveratrol analogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410, 707-713.
- Brenner, D. A., Jain, M., Pimentel, D. R., Wang, B., Connors, L. H., Skinner, M., Apstein, C. S. & Liao, R. (2004). Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress. *Circ Res*, 94, 1008-10.
- Chiti F., Dobson C. M (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem*, 86, 27–68.
- Dasgupta, N. R., Rissing, S. M., Smith, J., Jung, J. & Benson, M. D. (2020). Inotersen therapy of transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Amyloid*, 27, 52-58.
- Donnelly, J. P. & Hanna, M. (2017). Cardiac amyloidosis: An update on diagnosis and treatment. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 84, 12-26.
- Esser A. F., Kolb W. P., Podack E. R., et al. (1979). Molecular reorganization of lipid bilayers by complement: a possible mechanism for membranolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1410-1414.
- Garcia-Pavia, P., Rapezzi, C., Adler, Y., Arad, M., Basso, C., Brucato, A., Burazor, I., Caforio, A. L. P., Damy, T., Eriksson, U., Fontana, M., Gillmore, J. D., Gonzalez-Lopez, E., Grogan, M., Heymans, S., Imazio, M., Kindermann, I., Kristen, A. V., Maurer, M. S., Merlini, G., Pantazis, A., Pankuweit, S., Rigopoulos, A. G. & Linhart, A. (2021). Diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis: a position statement of the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*, 42, 1554-1568.

- Gertz, M., Adams, D., Ando, Y., Beirão, J. M., Bokhari, S., Coelho, T., Comenzo, R. L., Damy, T., Dorbala, S., Drachman, B. M., Fontana, M., Gillmore, J. D., Grogan, M., Hawkins, P. N., Lousada, I., Kristen, A. V., Ruberg, F. L., Suhr, O. B., Maurer, M. S., Nativi-Nicolau, J., Quarta, C. C., Rapezzi, C., Witteles, R. & Merlini, G. (2020). Avoiding misdiagnosis: expert consensus recommendations for the suspicion and diagnosis of transthyretin amyloidosis for the general practitioner. *BMC Family Practice*, 21, 198.
- Gertz, M. A. & Dispenzieri, A. (2020). Systemic Amyloidosis Recognition, Prognosis, and Therapy: A Systematic Review. *Jama*, 324, 79-89.
- Gillmore, J. D., Damy, T., Fontana, M., Hutchinson, M., Lachmann, H. J., Martinez-Naharro, A., Quarta, C. C., Rezk, T., Whelan, C. J., Gonzalez-Lopez, E., Lane, T., Gilbertson, J. A., Rowczenio, D., Petrie, A. & Hawkins, P. N. (2018). A new staging system for cardiac transthyretin amyloidosis. *Eur Heart J*, 39, 2799-2806.
- Gillmore, J. D., Maurer, M. S., Falk, R. H., Merlini, G., Damy, T., Dispenzieri, A., Wechalekar, A. D., Berk, J. L., Quarta, C. C., Grogan, M., Lachmann, H. J., Bokhari, S., Castano, A., Dorbala, S., Johnson, G. B., Glaudemans, A. W., Rezk, T., Fontana, M., Palladini, G., Milani, P., Guidalotti, P. L., Flatman, K., Lane, T., Vonberg, F. W., Whelan, C. J., Moon, J. C., Ruberg, F. L., Miller, E. J., Hutt, D. F., Hazenberg, B. P., Rapezzi, C. & Hawkins, P. N. (2016). Nonbiopsy Diagnosis of Cardiac Transthyretin Amyloidosis. *Circulation*, 133, 2404-12.
- Gitter, B. D., Cox, L. M., Rydel, R. E. & May, P. C. (1995). Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 10738-10741.
- Grogan, M., Scott, C. G., Kyle, R. A., Zeldenrust, S. R., Gertz, M. A., Lin, G., Klarich, K. W., Miller, W. L., Maleszewski, J. J. & Dispenzieri, A. (2016). Natural History of Wild-Type Transthyretin Cardiac Amyloidosis and Risk Stratification Using a Novel Staging System. *J Am Coll Cardiol*, 68, 1014-20.
- Hein, S., Furkel, J., Knoll, M., Aus Dem Siepen, F., Schönland, S., Hegenbart, U., Katus, H. A., Kristen, A. V. & Konstandin, M. H. (2021). Impaired in vitro growth response of plasma-treated cardiomyocytes predicts poor outcome in patients with transthyretin amyloidosis. *Clin Res Cardiol*, 110, 579-590.
- Hou, H.-A., Tang, C.-H., Goh, C. H., Shen, S.-P., Huang, K.-C., Qiu, H., Siggins, S., Rothwell, L. A. & Liu, Y. (2022). A population-based cohort study of the epidemiology of light-chain amyloidosis in Taiwan. *Scientific Reports*, 12, 15736.
- Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A. & Radford, S. E. (2018). A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 755-773.
- Ihne S., Morbach C., Obici L., Palladini G., Störk S. (2019). Amyloidosis in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep*, 16, 285-303.

- Imperlini, E., Gneccchi, M., Rognoni, P., Sabidò, E., Ciuffreda, M. C., Palladini, G., Espadas, G., Mancuso, F. M., Bozzola, M., Malpasso, G., Valentini, V., Palladini, G., Orrù, S., Ferraro, G., Milani, P., Perlini, S., Salvatore, F., Merlini, G. & Lavatelli, F. (2017). Proteotoxicity in cardiac amyloidosis: amyloidogenic light chains affect the levels of intracellular proteins in human heart cells. *Scientific Reports*, 7, 15661.
- Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S. & Selkoe, D. (1989). Relationship Of Microglia And Astrocytes To Amyloid Deposits Of Alzheimer Disease. *J Neuroimmunol*, 24, 173-82.
- Iwaya, K., Zako, T., Fukunaga, J., Sörgjerd, K. M., Ogata, K., Kogure, K., Kosano, H., Noritake, M., Maeda, M., Ando, Y., Katsura, Y. & Nagase, T. (2019). Toxicity of insulin-derived amyloidosis: a case report. *BMC Endocrine Disorders*, 19, 61.
- Jadoul M., Garbar C. van Ypersele de Strihou C. (2001). Pathological aspects of beta(2)-microglobulin amyloidosis. *Semin Dial*, 14, 86-89.
- Keisuke, H., Syota, K., Yuki, K. & Junsuke, A. (2013). Anti-Cytokine Therapy for AA Amyloidosis. In: DALI, F. (ed.) *Amyloidosis*. Rijeka: IntechOpen.
- Kourelis T. V., Dasari S. S., Dispenzieri A., et al 2020. A Proteomic Atlas of Cardiac Amyloid Plaques. *JACC CardioOncol*, 2, 632-643.
- Kristen A. V., Brokbals E., Aus dem Siepen F., Bauer R., Hein S., Aurich M., Riffel J., Behrens H.-M., Krüger S., Schirmacher P., Katus H. A., Röcken C. (2016). Cardiac Amyloid Load: A Prognostic and Predictive Biomarker in Patients With Light-Chain Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*, 68, 13-24.
- Kumar, S., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Hayman, S. R., Buadi, F. K., Colby, C., Laumann, K., Zeldenrust, S. R., Leung, N., Dingli, D., Greipp, P. R., Lust, J. A., Russell, S. J., Kyle, R. A., Rajkumar, S. V. & Gertz, M. A. (2012). Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J Clin Oncol*, 30, 989-95.
- Lachmann, H. J., Goodman, H. J., Gilbertson, J. A., Gallimore, J. R., Sabin, C. A., Gillmore, J. D. & Hawkins, P. N. (2007). Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *N Engl J Med*, 356, 2361-71.
- Lavatelli, F., Imperiini, E., Orrù, S., Rognoni, P., Sarnataro, D., Palladini, G., Malpasso, G., Soriano, M. E., Di Fonzo, A., Valentini, V., Gneccchi, M., Perlini, S., Salvatore, F. & Merlini, G. (2015). Novel mitochondrial protein interactors of immunoglobulin light chains causing heart amyloidosis. *The FASEB Journal*, 29, 4614-4628.
- Lohrmann, G., Pipilas, A., Mussinelli, R., Gopal, D. M., Berk, J. L., Connors, L. H., Vellanki, N., Hellawell, J., Siddiqi, O. K., Fox, J., Maurer, M. S. & Ruberg, F. L. (2020). Stabilization of Cardiac Function With Diflunisal in Transthyretin (ATTR) Cardiac Amyloidosis. *J Card Fail*, 26, 753-759.

- López-Sainz, Á., De Haro-Del Moral, F. J., Dominguez, F., Restrepo-Cordoba, A., Amor-Salamanca, A., Hernandez-Hernandez, A., Ruiz-Guerrero, L., Krsnik, I., Cobo-Marcos, M., Castro, V., Toquero-Ramos, J., Lara-Pezzi, E., Fernandez-Lozano, I., Alonso-Pulpon, L., González-López, E. & Garcia-Pavia, P. (2019). Prevalence of cardiac amyloidosis among elderly patients with systolic heart failure or conduction disorders. *Amyloid*, 26, 156-163.
- Luigetti, M., Romano, A., Guglielmino, V., Sciarrone, M. A., Vitali, F., Carbone, C., Piro, G., Sabino, A., De Stefano, N., Plantone, D. & Primiano, G. (2022). Serum Inflammatory Profile in Hereditary Transthyretin Amyloidosis: Mechanisms and Possible Therapeutic Implications. *Brain Sciences*, 12, 1708.
- Lux A., Gottwald J., Behrens H.-M. et al (2021). Complement 9 in amyloid deposits. *Amyloid*. 28, 199-208.
- Magaud, C., Harnois, T., Sebille, S., Chatelier, A., Faivre, J. F., Bois, P., Page, G. & Gellen, B. (2023). Pro-inflammatory cytokine secretion induced by amyloid transthyretin in human cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 642, 83-89.
- Manral, P. & Reixach, N. (2015). Amyloidogenic and non-amyloidogenic transthyretin variants interact differently with human cardiomyocytes: insights into early events of non-fibrillar tissue damage. *Biosci Rep*, 35.
- Martinez-Naharro, A., Hawkins, P. N. & Fontana, M. (2018). Cardiac amyloidosis. *Clin Med (Lond)*, 18, s30-s35.
- Maurer, M. S., Bokhari, S., Damy, T., Dorbala, S., Drachman, B. M., Fontana, M., Grogan, M., Kristen, A. V., Lousada, I., Nativi-Nicolau, J., Quarta, C. C., Rapezzi, C., Ruberg, F. L., Witteles, R. & Merlini, G. (2019). Expert Consensus Recommendations for the Suspicion and Diagnosis of Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Circulation: Heart Failure*, 12, e006075.
- Maurer, M. S., Schwartz, J. H., Gundapaneni, B., Elliott, P. M., Merlini, G., Waddington-Cruz, M., Kristen, A. V., Grogan, M., Witteles, R., Damy, T., Drachman, B. M., Shah, S. J., Hanna, M., Judge, D. P., Barsdorf, A. I., Huber, P., Patterson, T. A., Riley, S., Schumacher, J., Stewart, M., Sultan, M. B. & Rapezzi, C. (2018). Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 379, 1007-1016.
- McGlinchey, R. P., Shewmaker, F., Mcphie, P., Monterroso, B., Thurber, K. & Wickner, R. B. (2009). The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13731-6.
- Merlini, G. (2017). AL amyloidosis: from molecular mechanisms to targeted therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017, 1-12.
- Merlo, M., Pagura, L., Porcari, A., Cameli, M., Vergaro, G., Musumeci, B., Biagini, E., Canepa, M., Crotti, L., Imazio, M., Forleo, C., Cappelli, F., Perfetto, F., Favale, S., Di Bella, G., Dore, F., Girardi, F., Tomasoni, D., Pavasini, R., Rella, V., Palmiero, G., Caiazza, M., Carella, M. C., Igoen Guaricci, A., Branzi, G., Caponetti, A. G., Saturi, G., La Malfa, G., Merlo, A. C.,

- Andreis, A., Bruno, F., Longo, F., Rossi, M., Varrà, G. G., Saro, R., Di Ienno, L., De Carli, G., Giacomini, E., Arzilli, C., Limongelli, G., Autore, C., Olivotto, I., Badano, L., Parati, G., Perlini, S., Metra, M., Emdin, M., Rapezzi, C. & Sinagra, G. (2022). Unmasking the prevalence of amyloid cardiomyopathy in the real world: results from Phase 2 of the AC-TIVE study, an Italian nationwide survey. *Eur J Heart Fail*, 24, 1377-1386.
- Michalson A., Hagenbuch A., Huy C., et al (2021). A human antibody selective for transthyretin amyloid removes cardiac amyloid through phagocytic immune cells. *Nat Commun*, 12, 3142.
- Nakamura, Y., Yutani, C., Nakazato, M., Date, Y., Baba, T. & Goto, Y. (1999). A case of hereditary amyloidosis transthyretin variant Met 30 with amyloid cardiomyopathy, less polyneuropathy, and the presence of giant cells. *Pathol Int*, 49, 898-902.
- Nestaas E., Schubert U., de Boode W. P., El-Khuffash A. (2018). Tissue Doppler velocity imaging and event timings in neonates: a guide to image acquisition, measurement, interpretation, and reference values. *Pediatr Res*, 84, 18-29.
- Nicolas-Avila J. A., Lechuga-Vieco A. V., Esteban-Martinez L., et al (2020). A network of macrophages supports mitochondrial homeostasis in the heart. *Cell*, 183, 94-109.
- Nunes, R. J., De Oliveira, P., Lages, A., Becker, J. D., Marcelino, P., Barroso, E., Perdigoto, R., Kelly, J. W., Quintas, A. & Santos, S. C. (2013). Transthyretin proteins regulate angiogenesis by conferring different molecular identities to endothelial cells. *J Biol Chem*, 288, 31752-60.
- Obici, L., Cortese, A., Lozza, A., Lucchetti, J., Gobbi, M., Palladini, G., Perlini, S., Saraiva, M. J. & Merlini, G. (2012). Doxycycline plus tauroursodeoxycholic acid for transthyretin amyloidosis: a phase II study. *Amyloid*, 19 Suppl 1, 34-6.
- Okoshi, T., Yamaguchi, I., Ozawa, D., Hasegawa, K. & Naiki, H. (2015). Endocytosed β 2-Microglobulin Amyloid Fibrils Induce Necrosis and Apoptosis of Rabbit Synovial Fibroblasts by Disrupting Endosomal/Lysosomal Membranes: A Novel Mechanism on the Cytotoxicity of Amyloid Fibrils. *PLOS ONE*, 10, e0139330.
- Patel, N. S., Paris, D., Mathura, V., Quadros, A. N., Crawford, F. C. & Mullan, M. J. (2005). Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 2, 9.
- Picken, M. M. (2020). The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematologica*, 143, 322-334.
- Podack E. R., Müller-Eberhard H. J., Horst H., et al. (1982). Membrane attack complex of complement (MAC): three-dimensional analysis of MAC-phospholipid vesicle recombinants. *J Immunol*, 128, 2353-2357.
- Porcari, A., Bussani, R., Merlo, M., Varrà, G. G., Pagura, L., Rozze, D. & Sinagra, G. (2021). Incidence and Characterization of Concealed Cardiac Amyloidosis Among Unselected Elderly Patients Undergoing Post-mortem Examination. *Front Cardiovasc Med*, 8, 749523.

- Pucci, A., Aimo, A., Musetti, V., Barison, A., Vergaro, G., Genovesi, D., Giorgetti, A., Masotti, S., Arzilli, C., Prontera, C., Pastormerlo, L. E., Coceani, M. A., Ciardetti, M., Martini, N., Palmieri, C., Passino, C., Rapezzi, C. & Emdin, M. (2021). Amyloid Deposits and Fibrosis on Left Ventricular Endomyocardial Biopsy Correlate With Extracellular Volume in Cardiac Amyloidosis. *J Am Heart Assoc*, 10, e020358.
- Quock, T. P., Yan, T., Chang, E., Guthrie, S. & Broder, M. S. (2018). Epidemiology of AL amyloidosis: a real-world study using US claims data. *Blood Adv*, 2, 1046-1053.
- Richey T., Foster J. S., Williams A. D., et al (2019). Macrophage-Mediated Phagocytosis and Dissolution of Amyloid-Like Fibrils in Mice, Monitored by Optical Imaging. *The American Journal of Pathology*, 189, 989-998.
- Richter, S., Jahnke, C., Klingel, K. & Paetsch, I. (2020). Isolated atrial amyloidosis. *European Heart Journal*, 41, 2695-2695.
- Röcken, C., Eriksson, M. (2009). Amyloid und Amyloidosen. *Pathologe*, 3, 182-92.
- Rossi, M., Varrà, G. G., Porcari, A., Saro, R., Pagura, L., Lalario, A., Dore, F., Bussani, R., Sinagra, G. & Merlo, M. (2022). Re-Definition of the Epidemiology of Cardiac Amyloidosis. *Biomedicines*, 10.
- Sack, G. H., Jr. (2018). Serum amyloid A - a review. *Mol Med*, 24, 46.
- Saito, Y., Nakamura, K. & Ito, H. (2021). Molecular Mechanisms of Cardiac Amyloidosis. *Int J Mol Sci*, 23.
- Sattianayagam, P. T., Hahn, A. F., Whelan, C. J., Gibbs, S. D., Pinney, J. H., Stangou, A. J., Rowczenio, D., Pflugfelder, P. W., Fox, Z., Lachmann, H. J., Wechalekar, A. D., Hawkins, P. N. & Gillmore, J. D. (2012). Cardiac phenotype and clinical outcome of familial amyloid polyneuropathy associated with transthyretin alanine 60 variant. *Eur Heart J*, 33, 1120-7.
- Scarpioni, R., Ricardi, M. & Albertazzi, V. (2016). Secondary amyloidosis in autoinflammatory diseases and the role of inflammation in renal damage. *World J Nephrol*, 5, 66-75.
- Shi, J., Guan, J., Jiang, B., Brenner, D. A., Del Monte, F., Ward, J. E., Connors, L. H., Sawyer, D. B., Semigran, M. J., Macgillivray, T. E., Seldin, D. C., Falk, R. & Liao, R. (2010). Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38 α MAPK pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 4188-4193.
- Siddiqi O. K., Ruberg F. L. (2018). Cardiac amyloidosis: An update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Trends Cardiovasc Med*, 28, 10-21.
- Siegismund, C. S., Escher, F., Lassner, D., Kühl, U., Gross, U., Fruhwald, F., Wenzel, P., Münzel, T., Frey, N., Linke, R. P. & Schultheiss, H. P. (2018). Intramyocardial inflammation predicts adverse outcome in patients with cardiac AL amyloidosis. *Eur J Heart Fail*, 20, 751-757
- Simon, P., Behrens, H.-M., Kristen, A. & Röcken, C. (2024). Myocardial inflammatory cells in cardiac amyloidosis. *Scientific Reports*, 14, 23313.

- Solomon, S. D., Adams, D., Kristen, A., Grogan, M., González-Duarte, A., Maurer, M. S., Merlini, G., Damy, T., Slama, M. S., Brannagan, T. H., Dispenzieri, A., Berk, J. L., Shah, A. M., Garg, P., Vaishnaw, A., Karsten, V., Chen, J., Gollob, J., Vest, J. & Suhr, O. (2019). Effects of Patisiran, an RNA Interference Therapeutic, on Cardiac Parameters in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *Circulation*, 139, 431-443.
- Stats, M. A. & Stone, J. R. (2016). Varying levels of small microcalcifications and macrophages in ATTR and AL cardiac amyloidosis: implications for utilizing nuclear medicine studies to subtype amyloidosis. *Cardiovascular Pathology*, 25, 413-417.
- Sukhacheva T. V., Eremeeva M. V., Ibragimova A. G., Vaskovskii V. A., Serov R. A., Revishvili A. Sh. (2016). Isolated Atrial Amyloidosis in Patients with Various Types of Atrial Fibrillation. *Bull Exp Biol Med*, 160, 844-9.
- Tanskanen, M., Peuralinna, T., Polvikoski, T., Notkola, I. L., Sulkava, R., Hardy, J., Singleton, A., Kiuru-Enari, S., Paetau, A., Tienari, P. J. & Myllykangas, L. (2008). Senile systemic amyloidosis affects 25% of the very aged and associates with genetic variation in alpha2-macroglobulin and tau: a population-based autopsy study. *Ann Med*, 40, 232-9.
- Treitz, C., Gottwald, J., Gericke, E., Urban, P., Meliß, R. R., Axmann, H. D., Siebert, F., Becker, K., Tholey, A. & Röcken, C. (2022). Quantitative proteome profiling provides evidence of an activation of the complement cascade in ATTR amyloidosis. *Amyloid*, 29, 102-109.
- Wall, J. S., Kennel, S. J., Williams, A., Richey, T., Stuckey, A., Huang, Y., Macy, S., Donnell, R., Barbour, R., Seubert, P. & Schenk, D. (2012). AL Amyloid Imaging and Therapy with a Monoclonal Antibody to a Cryptic Epitope on Amyloid Fibrils. *PLOS ONE*, 7, e52686.
- Wechalekar, A. D., Fontana, M., Quarta, C. C. & Liedtke, M. (2022). AL Amyloidosis for Cardiologists. *JACC: CardioOncology*, 4, 427-441.
- Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M. & Bobylev, A. G. (2019). Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci Rep*, 39.
- Yee, A. W., Aldeghi, M., Blakeley, M. P., Ostermann, A., Mas, P. J., Moulin, M., De Sanctis, D., Bowler, M. W., Mueller-Dieckmann, C., Mitchell, E. P., Haertlein, M., De Groot, B. L., Boeri Erba, E. & Forsyth, V. T. (2019). A molecular mechanism for transthyretin amyloidogenesis. *Nature Communications*, 10, 925.
- Zabel, K. M., Lin, G. Y., Sell, R. E. & Aisagbonhi, O. (2022). Systemic AA Amyloidosis Associated With Intravenous Injection of Oral Prescription Opioids—An Autopsy Case Report. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 43.
- Zhang, Y., Yu, W., Chang, W., Wang, M., Zhang, L. & Yu, F. (2023). Light Chain Amyloidosis–Induced Autophagy Is Mediated by the Foxo3a/Beclin-1 Pathway in Cardiomyocytes. *Laboratory Investigation*, 103, 100001.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Pathophysiologie der ATTR- und AL-Amyloidose. Eigene Darstellung angelehnt an (Donnelly and Hanna, 2017). Abbildung generiert mit BioRender (www.biorender.com).
- Abbildung 2:** Exemplarische Darstellung angefärbter Areale des Herzmuskelgewebes in 100-facher Vergrößerung mittels Mikroskopie. Gezeigt ist ein Areal in den jeweiligen Färbungen Hämatoxylin-Eosin (A), Kongorot-Fluoreszenz (B), anti-C9-Antikörper (C), anti-Caspase 3-Antikörper (D).
- Abbildung 3:** Exemplarische Darstellung unterschiedlicher Areale der immunhistochemischen Färbungen in 400-facher Vergrößerung mittels Mikroskopie: Anti-CD3-Antikörper (A), Anti-MPO-Antikörper (B), Anti-CD68-Antikörper bei einem Patienten mit nachgewiesener NYHA-Klasse 2 (C) und Anti-CD68-Antikörper bei einem Patienten mit nachgewiesener NYHA-Klasse 3 (D).
- Abbildung 4:** Übersichtsdarstellung des Studiendesigns. Abbildung generiert mit Microsoft Word für Mac 16.
- Abbildung 5:** Übersichtsdarstellung der untersuchten und nicht untersuchten Immunfärbungen mit Angabe der Anzahl von zugehörigen Patientenfällen (grün – vorhanden und untersucht; rot – nicht vorhanden und nicht untersucht).
- Abbildung 6:** Vergleich von Kongorot- (A, B) und Anti-C9-Immunreaktion (C, D) in Serienschnitten des Herzmuskelgewebes in 5-facher Vergrößerung mittels Mikroskopie. A und C zeigen die jeweiligen Färbungen, B und D zeigen die ImageJ-Berechnung. Bei A, B, C und D handelt es sich um einen Patientenfall.
- Abbildung 7:** grafische Darstellung der Werteverteilung der Dichten von T-Lyphozyten (CD3-positiv), Makrophagen (CD-68-positiv) und Neutrophilen Granulozyten (MPO-positiv) auf einer logarithmischen Y-Achse mit Markierung entsprechender Schwellenwerte (orangefarbige Linie), die die Grenzwerte für Entzündung darstellen (orangefarbige Zahlen) (Dominguez et al., 2016). Der Schwellenwerte für Neutrophile wurde bei 0 eingezeichnet. Einzeln als Kreise bzw. Sternchen dargestellten Messwerte stellen *outliers* beziehungsweise Extremwerte dar.

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Typen kardialer Amyloidose (Martinez-Naharro et al., 2018).
Tabelle 2:	Klinische Manifestation von ATTR-Amyloidosen, angelehnt an (Gertz et al., 2020) und (Maurer et al., 2019).
Tabelle 3:	Auflistung der untersuchten Amyloidtypen und der klinisch-pathologischen Patientencharakteristika mit entsprechenden Fallzahlen.
Tabelle 4:	Korrelationen des Myozytendurchmessers mit dem Amyloidgehalt insgesamt (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), Amyloidgehalt vom Typ AL, Amyloidgehalt vom Typ ATTR sowie klinischen Parametern (NYHA-Klasse, NTproBNP, LA <i>size</i> , TDIs, MAPSE, <i>precord. voltage</i> und <i>limb voltage</i>). Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in <i>low</i> und <i>high</i> sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) <i>Fisher's exact test</i> (*) <i>Not significant after multiple testing correction</i>)).
Tabelle 5:	Korrelationen des Amyloidgehalts insgesamt (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), Amyloidgehalt vom Typ AL und Amyloidgehalt vom Typ ATTR mit klinischen Parametern (NYHA-Klasse, NTproBNP, LA <i>size</i> , TDIs, MAPSE, <i>precord. voltage</i> und <i>limb voltage</i>). Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in <i>low</i> und <i>high</i> sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) <i>Fisher's exact test</i>).
Tabelle 6:	Korrelationen des Nachweises C9-positiver Myozyten mit dem Amyloidgehalt insgesamt (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), Amyloidgehalt vom Typ AL und Amyloidgehalt vom Typ ATTR. Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in <i>low</i> und <i>high</i> . Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) <i>Fisher's exact test</i>).
Tabelle 7:	Korrelationen des Anteils des C9-positiven und Caspase 3-positiven mit dem Amyloidtyp, Amyloidgehalt insgesamt (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), Amyloidgehalt vom Typ AL und Amyloidgehalt vom ATTR. Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in <i>low</i> und <i>high</i> sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) <i>Fisher's exact test</i>).
Tabelle 8:	Korrelationen der Dichte der CD68-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe insg. (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), sowie vom der Dichte der CD68-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe vom Typ AL und der Dichte der CD68-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe vom Typ ATTR mit klinischen Parametern (NYHA-Klasse, NTproBNP, LA <i>size</i> , TDIs, MAPSE, <i>precord. voltage</i> und <i>limb voltage</i>). Die Einteilung erfolgte

entsprechend am Median in *low und high* sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) *Fisher's exact test*).

Tabelle 9: Korrelationen der Dichte der CD3-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe insg. (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps), sowie MPO-positiven Zellen in amyloidbefallenem Herzmuskelgewebe insg. (ohne Berücksichtigung des Amyloidtyps) mit klinischen Parametern (NYHA-Klasse, *NTproBNP*, *LA size*, TDIs, MAPSE, *precord. voltage* und *limb voltage*). Die Einteilung erfolgte entsprechend am Median in *low und high* sowie der NYHA-Klassen in 1-4 sowie 1 / 2 und 3 / 4. Patientenfallzahlen (n) und p-Werte (p) wurden entsprechend angegeben ((1) *Fisher's exact test*).

9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Philip Edward Simon, geboren am 30.08.1997 in Lauf an der Pegnitz, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und mich keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Ort, Datum

Philip Simon

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an all jene richten, die mich während der Entstehung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Röcken, für seine herausragende fachliche Betreuung, seine inspirierende wissenschaftliche Anleitung und die beständige Förderung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die mir in vielerlei Hinsicht eine wertvolle Unterstützung waren. Mein tief empfundener Dank gilt insbesondere Herrn Dr. rer. medic. Behrens, dessen fachlicher Rat und unermüdliche Hilfsbereitschaft mir eine wertvolle Stütze waren.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner damaligen Freundin und heutigen Ehefrau, deren Verständnis, Geduld und Unterstützung mir in dieser intensiven Zeit stets Kraft und Halt gegeben haben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern meinen tiefsten Dank aussprechen. Ihre unerschütterliche Unterstützung und Ermutigung haben nicht nur diese Arbeit, sondern meinen gesamten Werdegang möglich gemacht.

Diese Dissertation ist all den genannten Personen gewidmet, deren Unterstützung ich in großer Dankbarkeit erkenne und wertschätze.

11 Publikation

Simon, P., Behrens, H.-M., Kristen, A. & Röcken, C. (2024). Myocardial inflammatory cells in cardiac amyloidosis. *Scientific Reports*, 14, 23313