

**Aus dem Bereich der klinischen Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
Homburg-Saar
Klinik für Innere Medizin III - Kardiologie, Angiologie und Internistische
Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm**

Prokollagen Propeptide: Marker für atriale Fibrose und Vorhofflimmern?

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2012**

**vorgelegt von
Angela Cacciatore
Geb. am 02.12.1980 in Charleroi (B)**

Deutscher Titel:

Prokollagen Propeptide: Marker für atriale Fibrose und Vorhofflimmern?

Englischer Titel:

Procollagen propeptides: markers for atrial fibrosis and atrial fibrillation?

Eidesstattliche Erklärung (Erklärung gemäß §7 Abs.1 Nr.4)

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Konzepte und Gedanken sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Merzig, 12.03.2012

Angela Cacciatore

DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Prof. Dr. M. Böhm danken, dass ich meine Experimente im kardiologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Homburg durchführen konnte.

Herrn Dr. Dr. H.-R. Neuberger danke ich besonders für die gute wissenschaftliche Betreuung und freundliche Betreuung.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Schäfers (Thorax- und Herzgefäßchirurgie des Universitätsklinikums Homburg) für die Bereitstellung der atrialen und myokardialen Herzproben und für die wissenschaftliche Kooperation bedanken.

Prof. Dr. R. M. Bohle (Pathologie des Universitätsklinikums Homburg) danke ich für die Bereitstellung der Paraffinschnitte.

Für die freundliche Betreuung im Labor danke ich allen Doktoranden, technischen Assistenten und Ärzten, insbesondere Andrey Kazakov, Simone Jäger, Nicole Hollinger und Jeannette Zimolong.

Für die uneingeschränkte Unterstützung und stete Motivation möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	10
2.	EINLEITUNG	13
2.1.	Definition und Geschichte des Vorhofflimmerns	13
2.2.	Epidemiologie des Vorhofflimmerns	14
2.3.	Ätiologie des Vorhofflimmerns	15
2.4.	Pathophysiologie des Vorhofflimmerns	16
2.5.	Klassifikation und Symptome des Vorhofflimmerns	18
2.6.	Komplikationen des Vorhofflimmerns	19
2.7.	Therapie des Vorhofflimmerns	19
2.8	Myokardiale Fibrose als Substrat für Vorhofflimmern	20
	2.8.1 Kardiales Remodelling	21
	2.8.2 Strukturelle Veränderungen des Myokards	22
2.9	Marker für myokardiale Fibrose	23
	2.9.1 Kollagenaufbau und Kollagensynthese	23
	2.9.2 Amino-terminales Propeptid von Typ-I Kollagen (PINP) und von Amino-terminalem Propeptid von Typ-III Kollagen (PIIINP) im Serum	25
	2.9.3 C-terminales Propeptid von Typ I Kollagen (PICP) im Serum	26
	2.9.4 Carboxy-terminales Telopeptid von Typ-I Kollagen (ICTP) im Serum	26
2.10	Fibrose und das Auftreten von Vorhofflimmern nach Herzoperationen	28
3.	GEGENSTAND DER ARBEIT	29
4.	MATERIAL	30
4.1	Geräte	30
4.2	Lösungen/Substanzen	30
4.3	Myokardiales Gewebe	30

5.	METHODEN	31	
5.1	Patientenpopulation	31	
	5.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien	31	
	5.1.2 Präoperative Diagnostik	32	
	5.1.3 Post-operatives Monitoring	32	
5.2	Biochemische Diagnostik	32	
	5.2.1 Bestimmung von Amino-terminalem Propeptid von Typ-I Kollagen (PINP) und von Amino-terminalem Propeptid von Typ-III Kollagen (PIIINP) im Serum	32	
	5.2.2 Bestimmung von C-terminalem Propeptid von Typ I Kollagen (PICP) im Serum	33	
	5.2.3 Bestimmung von Carboxy-terminalem Telopeptid von Typ-I Kollagen (ICTP) im Serum	34	
	5.2.4 Bestimmung des Amino-terminalen Fragments des natriuretischen Propeptids vom B Typ (NT-proBNP)	35	
5.3	Histomorphologie	36	
	5.3.1 Fixierung des myokardialen Gewebes	36	5.3.2
	Einbettung	36	5.3.3 Mikrotomie
	37	5.3.4 Sirius-Rot-Färbung	37
5.4	Quantifizierung von interstitiellem Kollagen	39	
6.	STATISTISCHE AUSWERTUNG	41	
7.	ERGEBNISSE	41	
7.1	Klinische Charakteristika der Studienpatienten	41	
7.2	Interstitielle Vorhof-Fibrose	43	
7.3	Korrelation von PINP mit atrialer Fibrose	47	
7.4	Korrelation von PIIINP und ICTP mit Vorhoffibrose	47	
7.5	Post-operatives Vorhofflimmern	49	

8.	DISKUSSION	50	
8.1	Mit atrialer Fibrose assoziierte Faktoren	50	
8.2	Atriale Fibrose und das Auftreten von Vorhofflimmern		52
9.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	52	
10.	LIMITATIONEN	53	
11.	LITERATURVERZEICHNIS	54	
12.	PUBLIKATIONEN	53	
13.	LEBENS LAUF	64	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ECM: Extrazelluläre Matrix

EF: Ejektionsfraktion

ICTP: Carboxy-terminales Telopeptid von Typ-I Kollagen

LA: linker Vorhof

NT-proBNP: Amino-terminales Fragment des natriuretischen Propeptids vom B Typ

PICP: C-terminales Propeptid von Typ I Prokollagen im Serum

PIIINP: Amino-terminales Propeptid von Typ-III Kollagen

PINP: Amino-terminales Propeptid von Typ-I Kollagen

POVHFli: Postoperatives Vorhofflimmern

RA: rechter Vorhof

r_s : Spearman Korrelationskoeffizient

VHFli: Vorhofflimmern

1. Zusammenfassung

Ziel

Diese Studie wurde entwickelt, um zu untersuchen, ob Serum-Marker des Kollagenumsatzes mit atrialer Fibrose korrelieren, und ob atriale Fibrose oder Serum-Marker des Kollagenumsatzes im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko des Auftretens von Vorhofflimmern (VHFli) nach Herzoperationen stehen.

Hintergrund

Atriale Fibrose wird als ein Substrat für die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern betrachtet. Während der Synthese und des Abbaus von Kollagen werden Kollagen-Propeptide und -Telo peptide in den Blutkreislauf freigegeben.

Methoden

Wir schlossen prospektiv 28 Patienten mit Sinusrhythmus ein, die sich im Verlauf einer Herzoperation unterzogen. Bestimmt wurde die präoperative Plasmakonzentration von Amino-terminalem-Propeptid des Typ I Prokollagens (PINP) und des Typ III Prokollagens (PIIINP) und von C-terminalem-Telo peptiden des Typ I Kollagens (ICTP). Die interstitielle Fibrose des linken (n = 10) und rechten Vorhofs (n = 28) wurde histologisch quantifiziert. Der Herzrhythmus wurde nach der Herzoperation 6 Tage lang engmaschig beobachtet.

Ergebnisse

Es fand sich sowohl im linken als auch im rechten Vorhof eine negative Korrelation zwischen der Serumkonzentration von PINP und dem Grad der Fibrose (linker Vorhof: $r_s = -0,65$, rechter Vorhof: $r_s = -0,42$ jeweils $p < 0,05$).

Alter, links atrialer Durchmesser, systolische linksventrikuläre Funktion und die Serumkonzentration von NT-proPIIINP, ICTP und BNP korrelierten nicht mit atrialer Fibrose.

Die Serumkonzentration von PIIINP war ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten von Vorhofflimmern nach Herzoperation. (odds ratio 5,6 pro $\mu\text{g/l}$ Erhöhung der PIIINP Konzentration, $p < 0,05$). Dagegen korrelierte die atriale Fibrose nicht mit dem Auftreten von VHFli.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Je geringer die Serum-Konzentration von PINP, desto höher war der Grad der atrialen interstitiellen Fibrose. Die Serumkonzentration von PIIINP sagte die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Vorhofflimmern nach Herzoperationen vorher. Marker des Kollagen-Umbaus können dazu dienen, das Risiko des Auftretens von Vorhofflimmern in bestimmten Patientengruppen abzuschätzen.

Schlüsselwörter

Vorhofflimmern, Kollagen, kardiale Fibrose, Biomarker, Herzoperation.

Summary

Objectives

This study was designed to investigate whether serum markers of collagen turnover correlate with atrial fibrosis, and whether atrial fibrosis or serum markers of collagen turnover are associated with an increased risk to develop atrial fibrillation after cardiac surgery.

Background

Atrial fibrosis is regarded as a substrate for the perpetuation of atrial fibrillation. During collagen synthesis and degradation, collagen propeptides and telopeptides are released into the blood.

Methods

We prospectively included 28 patients in sinus rhythm undergoing cardiac surgery. Plasma concentrations of the amino-terminal propeptide of procollagen type-I (PINP) and type-III (PIIINP), and the C-terminal telopeptide of type-I collagen (ICTP) were determined. Left (n = 10) and right atrial (n = 28) interstitial fibrosis was quantified histologically. Heart rhythm was closely monitored for 6 days after surgery.

Results

There was a negative correlation between the serum PINP concentration and the degree of fibrosis in both the left and the right atrium ($r_s = -0.65$ and $r_s = -0.42$, $p < 0.05$, respectively). Age, left atrial diameter, systolic left ventricular function and the serum concentration of PIIINP, ICTP, and B-type natriuretic peptide did not correlate with atrial fibrosis. Serum concentration of PIIINP independently predicted the development of atrial fibrillation (odds ratio 5.6 per $1\mu\text{g/l}$ increase in PIIINP serum concentration, $p < 0.05$), whereas a higher degree of atrial fibrosis was not related to the occurrence of AF.

Conclusions

The lower the serum concentration of PINP, the higher was the degree of interstitial atrial fibrosis. Serum PIIINP predicted the likelihood to develop AF after cardiac surgery. Markers of collagen turnover may be used to assess the risk to develop AF in defined patient populations.

Key words: atrial fibrillation, collagen, cardiac fibrosis, biomarkers, cardiac surgery

2. EINLEITUNG

2.1 Definition und Geschichte des Vorhofflimmerns

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung des Menschen. Vorhofflimmern ist durch eine schnelle und unkoordinierte atriale Aktivierung gekennzeichnet. Im Elektrokardiogramm fehlen P-Wellen, jedoch kann eine unruhige Grundlinie (F-Wellen) sichtbar sein.¹¹⁸ Die ventrikuläre Aktivierung ist unregelmäßig, meist schnell, und verursacht einen "Pulsus irregularis perpetuus" (Tachyarrhythmia absoluta).¹¹⁹



Library of Congress



The *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*

Abbildung 2.1

Der Erstbeschreiber des Vorhofflimmerns war William Harvey (1578-1657). Jean Baptist de Senac, ein französischer Arzt, beschäftigte sich zum ersten Mal mit der Klinik des Vorhofflimmerns. Er beschrieb den Zusammenhang zwischen Vorhofflimmern und Mitralklappenerkrankung. Er betrieb auch Forschungen über Chinarinde-Extrakt und Rhabarber für die Behandlung von Herzrhythmusstörungen.³⁵⁻³⁶ Danach beschrieb Arthur Cushny den Zusammenhang zwischen unregelmäßigem Puls und VHFli.³⁷

William Einthoven zeichnete 1906 das erste EKG auf, allerdings nicht in Zusammenhang mit Rhythmusstörungen. Erst später wurden durch Rothberger und Winterberger beim Vergleichen der EKG von Hunden, die Vorhofflimmern hatten, mit pulsus irregularis perpetuus bei Menschen Übereinstimmungen festgestellt.³⁸

2.2 Epidemiologie des Vorhofflimmerns

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung im Erwachsenenalter. In der Allgemeinbevölkerung wird seine Prävalenz auf 0,5-1,0% geschätzt.⁸⁵ Die Arrhythmie tritt selten bei Personen unter 60 Jahren auf, aber etwa 10% der 80-jährigen sind betroffen. Da VHFli vor allem bei strukturellen Herzerkrankungen auftritt, wird eine durch die Fortschritte der Medizin bedingte Erhöhung der kardialen Morbidität in Zukunft diesen Anteil sogar erhöhen (siehe Abbildung 2.2).⁸⁶ Darüber hinaus wird in einer alternden Gesellschaft das Vorhofflimmern mehr und mehr „epidemische“ Ausmaße annehmen. Daten des Statistischen Bundesamtes mögen als Beispiel dienen. Im Jahr 1950 war nur 1% der Bevölkerung bzw. 690.000 Personen 80 Jahre alt oder älter. Im Jahr 2001 war der Anteil dieser Bevölkerungsgruppe bereits auf 3,8% bzw. 3,2 Millionen gestiegen. Es wird erwartet, dass im Jahr 2050 etwa 9 Millionen Personen bzw. 12% der Bevölkerung 80 Jahre oder älter sein werden.⁸⁷ In der Bundesrepublik Deutschland sind mehr als 800.000 Einwohner vom Vorhofflimmern, also rund ein Prozent der Bevölkerung, betroffen. Männer sind in den jüngeren Altersstufen häufiger betroffen als Frauen. Durch die höhere Lebenserwartung der Frauen gibt es etwa gleich viele männliche und weibliche Patienten mit Vorhofflimmern.²⁵ Neben dem Alter wurden andere epidemiologische Risikofaktoren für VHFli identifiziert: männliches Geschlecht, Rauchen, Diabetes, Arterielle Hypertonie, linksventrikuläre Hypertrophie, Myokard-Infarkt, linksventrikuläre Funktionsstörungen, Herzinsuffizienz, Diuretika- Anwendung, Herz-Thorax-Operationen, Schlaganfälle.⁸⁸ Atriale Fibrose wird als ein Substrat für die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern betrachtet.⁶⁶

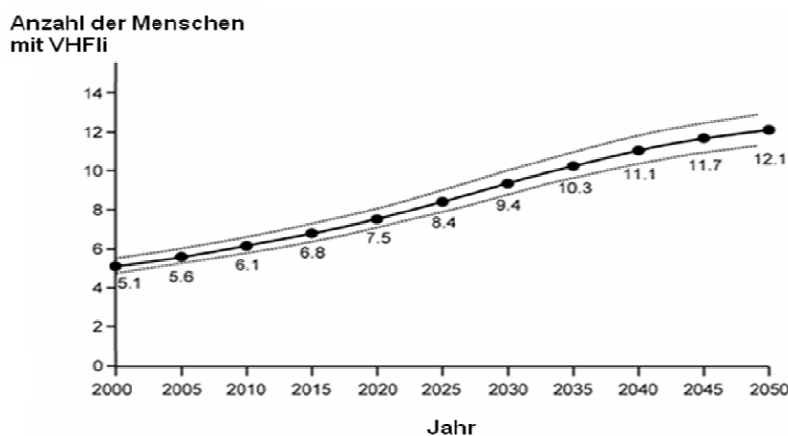


Abbildung 2.2

Prävalenz von Vorhofflimmern in den USA.¹²⁵

2.3 Ätiologie des Vorhofflimmerns

In der Regel ist Vorhofflimmern nicht als eigenständige Arrhythmie anzusehen, sondern als Folge einer zu Grunde liegenden Erkrankung. Risikofaktoren können kardialen und extrakardialen Ursprungs sein, wie z. B.: Alter, Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, usw.²⁷⁻²⁹ Bei jungen Menschen handelt es sich eher um eine Folge von rheumatischen Herzerkrankungen, vor allem bei Mitralstenose.³⁰⁻³¹ Vorhofflimmern kann auch als post-operative Komplikation nach Herzoperationen auftreten, nachdem der Patient an eine Herz-Lunge-Maschine angeschlossen war.²⁷ Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass Vorhofflimmern ohne bekannte Grunderkrankung auftritt.³²⁻³³ Dies wird als „lone atrial fibrillation“, also idiopathisches Vorhofflimmern bezeichnet und hat eine sehr gute Prognose (siehe Kapitel 2.6).³²

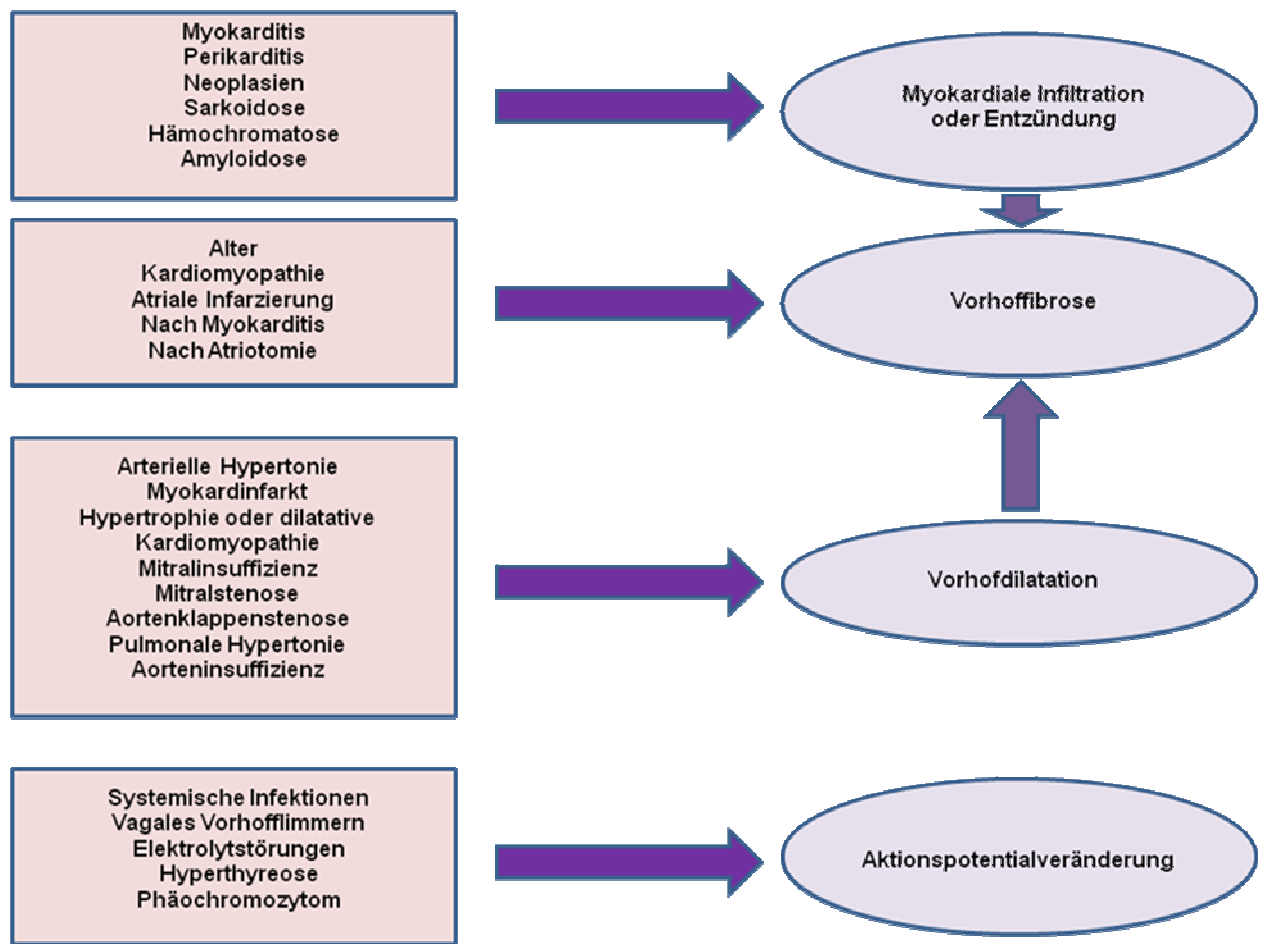


Abbildung 2.3:
Ätiologie des Vorhofflimmerns

2.4 Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

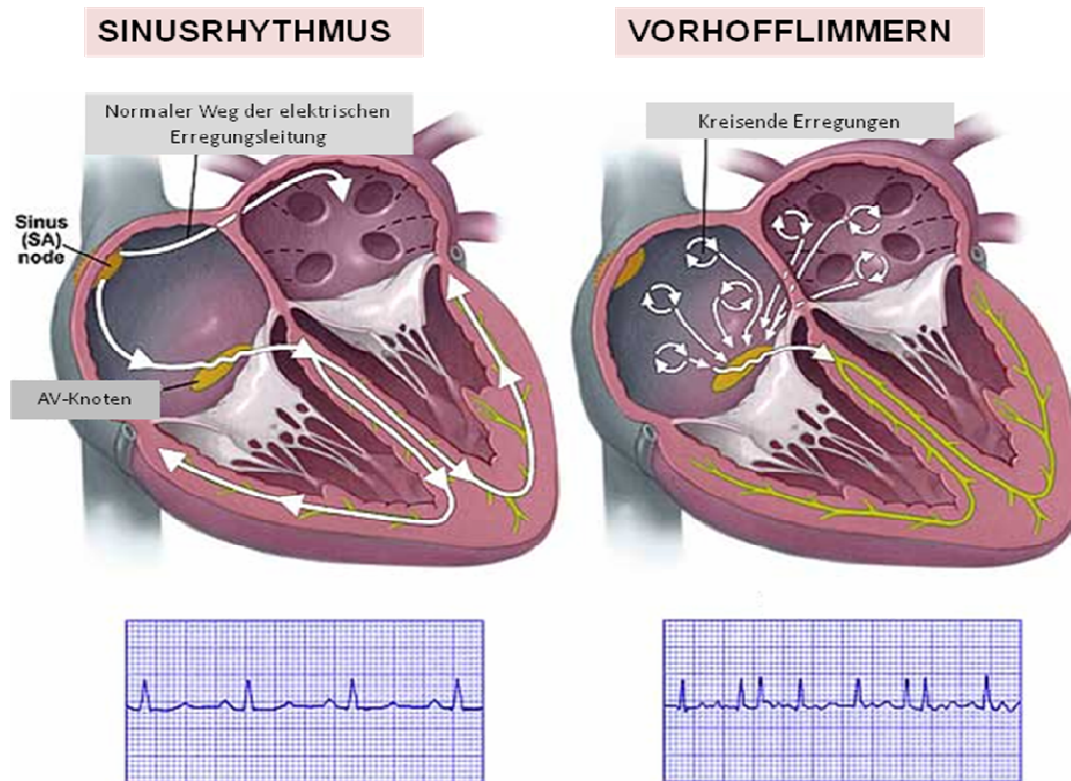


Abbildung 2.4:

Links normaler regelmäßiger Sinusrhythmus, darunter EKG. Rechts die schematische Darstellung des Vorhofflimmerns mit daraus resultierender absoluter Arrhythmie.

(UniversitätsSpital Zürich, Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, Direktor Prof. Dr. med. Volkmar Falk)

Internetadresse:

www.herzgefasschirurgie.usz.ch/HealthProfessionals/herzchirurgie/herzrhythmusstoerungen/Seiten/default.aspx

Die ersten Theorien zur Erklärung der raschen und unregelmäßigen Vorhof-Aktivierung während VHFli besagten, dass ein oder mehrere schnell depolarisierende atriale Foci verantwortlich sind.^{38;93-94} In der Tat kann dieser Mechanismus insbesondere bei Patienten mit paroxysmale VHFli der Arrhythmie zugrunde liegen. Foci scheinen vor allem in den Lungenvenen aufzutreten und können kurativ durch Ablation isoliert bzw. zerstört werden.^{95;46} Sie können VHFli nicht nur initiieren, sondern auch perpetuieren.^{97;98} Ein sich selbst erhaltender Mechanismus der Kreiserregung (reentry) ist die Basis für die andere grundlegende Theorie, die zuerst von Mayer im Jahr 1906 beschrieben und durch Mines,

Garrey und Lewis weiterentwickelt wurde.⁹⁹⁻¹⁰² Im Jahr 1959 führte Moe die Multiple-Wavelet-Hypothese ein, die durch Allesie 25 Jahre später experimentell evaluiert wurde.¹⁰³ Bis dahin wurden die Muster, die der unregelmäßigen Vorhoferregung während VHFli zugrunde liegen, als zufällig beschrieben. Jedoch führten Mapping-Studien am Menschen während VHFli zu einer Beschreibung verschiedener Grade der Desorganisation, die in 3 Gruppen unterteilt wurden: von sich wiederholenden, breit und schnell leitenden Wellenfronten bis zu multiplen, unregelmäßig und häufig blockierte Erregungsfronten unter der Mapping-Elektrode.¹⁰⁴

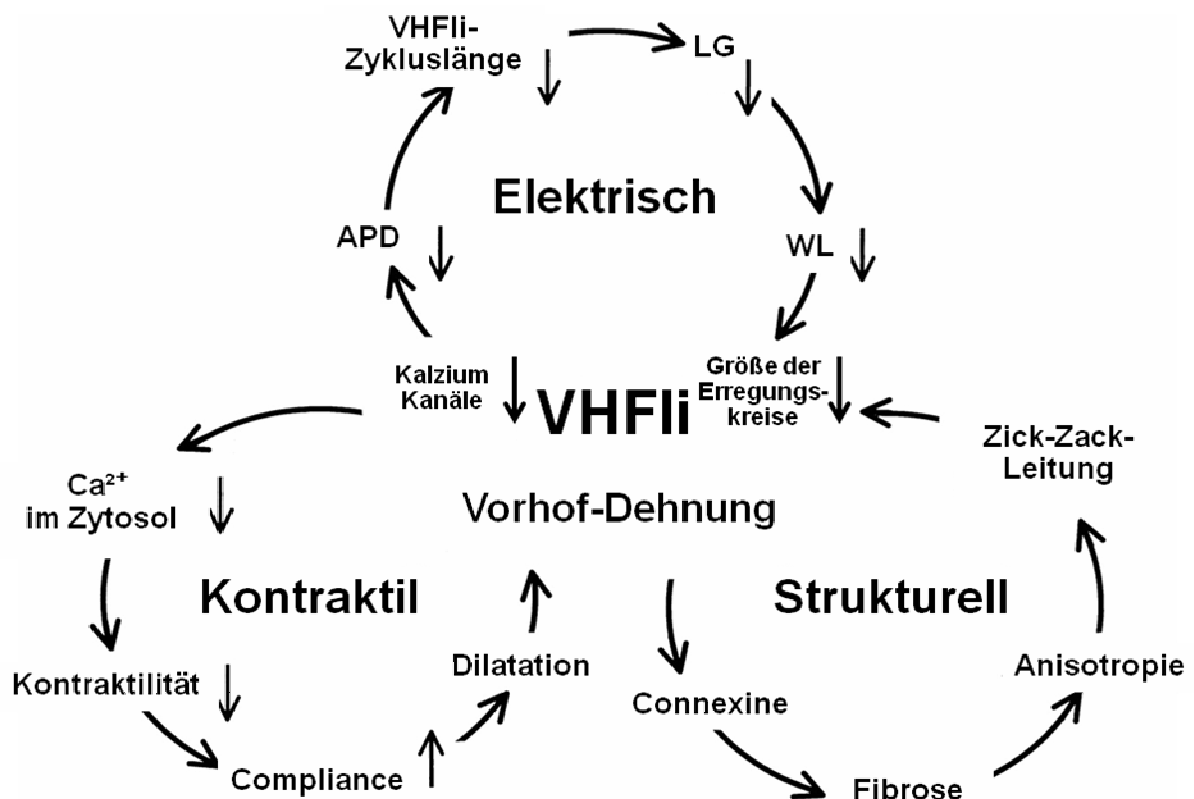


Abbildung 2.5

Drei potentielle positive Feedback-Schleifen des Vorhof-Remodellings bei VHFli. APD: Dauer des Aktionspotentials; WL: Wellenlänge; LG: Leitungsgeschwindigkeit ⁵³

Eine Down-Regulation der L-Typ Ca^{2+} - Kanäle bzw. des Kalzium-Einstroms gilt als wesentliche primäre Ursache für elektrische, kontraktile und strukturelle Veränderungen der Vorhöfe. Die Dehnung des atrialen Myokards ist die Folge des Verlusts der Kontraktilität und der Zunahme der Compliance der flimmernden Vorhöfe. Es wird angenommen, dass dies der Stimulus für den strukturellen Umbau der Vorhöfe ist. Das daraus resultierende elektroanatomische Substrat des VHFli besteht aus dilatierten Vorhöfen, die kleine intra-atriale Erregungskreise, durch eine Verringerung der Wellenlänge (Verkürzung der Refraktärzeit und Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit) und durch eine erhöhte ungleichförmige Gewebe Anisotropie (Zick-Zack-Leitung) ermöglichen. Dies stabilisiert die Perpetuierung der Arrhythmie. ⁵³

2.5 Klassifikation und Symptome des Vorhofflimmerns

Zur Klassifizierung der Symptome bei Vorhofflimmern wird der neue EHRA-Score für Symptome während des Vorhofflimmerns empfohlen. Er ermöglicht eine exakte Beschreibung der klinischen Arrhythmie. Die Einordnung hat therapeutische Konsequenzen.

EHRA-Score von Vorhofflimmern	
EHRA 1	Keine Symptome
EHRA 2	Milde Symptome: Alltagsaktivität nicht beeinflusst
EHRA 3	Ausgeprägte Symptome: Alltagsaktivität beeinträchtigt
EHRA 4	Invalidisierende Symptome: unfähig zu normaler Alltagsaktivität

Abbildung 2.6:

EHRA-Symptom-Score von Vorhofflimmern¹²⁰

Der EHRA (European Heart Rhythm Association) Score charakterisiert die schwere der Symptome von Patienten mit Vorhofflimmern. Der EHRA-Score beschreibt vier Stadien der funktionellen Beeinträchtigung. Die Klassifikation reicht von Stadium I (keine Symptome) bis zum Stadium IV (unfähig zu normaler Alltagsaktivität s. Abbildung 2.5)

2.6 Komplikationen des Vorhofflimmerns

Vorhofflimmern ist mit einer verdoppelten Gesamtmortalität assoziiert.^{19;107-108} Wenn die atrioventrikuläre Überleitung intakt ist, schlägt das Herz schnell (100-160 Schläge pro Minute), was eine Tachykardiomyopathie verursachen kann.^{109;110} Aufgrund der unregelmäßigen Herzschläge und/oder eines verringerten Herzzeitvolumens haben Patienten mit VHFli oft Symptome wie Palpitationen, Brustschmerzen, reduzierte Belastbarkeit, Atemnot, Schwindel, selten auch Synkopen. Jedoch bleibt ein erheblicher Anteil der Patienten bzw. der Episoden asymptomatisch.¹¹¹ Das größte klinische und sozioökonomische Problem von VHFli ist, dass es das Risiko für einen Schlaganfall ungefähr um das 5-fache (vor allem im fortgeschrittenen Alter) erhöht.^{112;113} Umgekehrt haben fast 90% aller Schlaganfälle eine ischämische Ursache, und die kardiale Thromboembolie ist der wichtigste Mechanismus.¹¹⁴ VHFli beeinträchtigt die atriale Kontraktilität, die sich langsam nach einer Kardioversion erholt.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Diese tachykardie-induzierte atriale kontraktile Dysfunktion ist ein wichtiger Mechanismus für die Thrombusbildung im linken Herzohr mit anschließenden embolischen Komplikationen.

2.7 Therapie des Vorhofflimmerns

Die Therapie von Patienten mit VHFli verfolgt zwei Ziele: zum einen die Verringerung der Symptome und zum anderen das Verhindern schwerer Komplikationen. Die Prävention von mit Vorhofflimmern assoziierten Komplikationen setzt sich aus antithrombotischer Therapie, Kontrolle der ventrikulären Frequenz und angemessener Therapie begleitender Herzerkrankungen zusammen.

Diese Maßnahmen können bereits Symptome lindern. Eine symptomatische Besserung kann zusätzlich durch eine Rhythmisierung mittels Kardioversion und eine Stabilisierung des Sinusrhythmus durch eine antiarrhythmische medikamentöse Therapie oder Ablationstherapie erreicht werden.¹²⁰

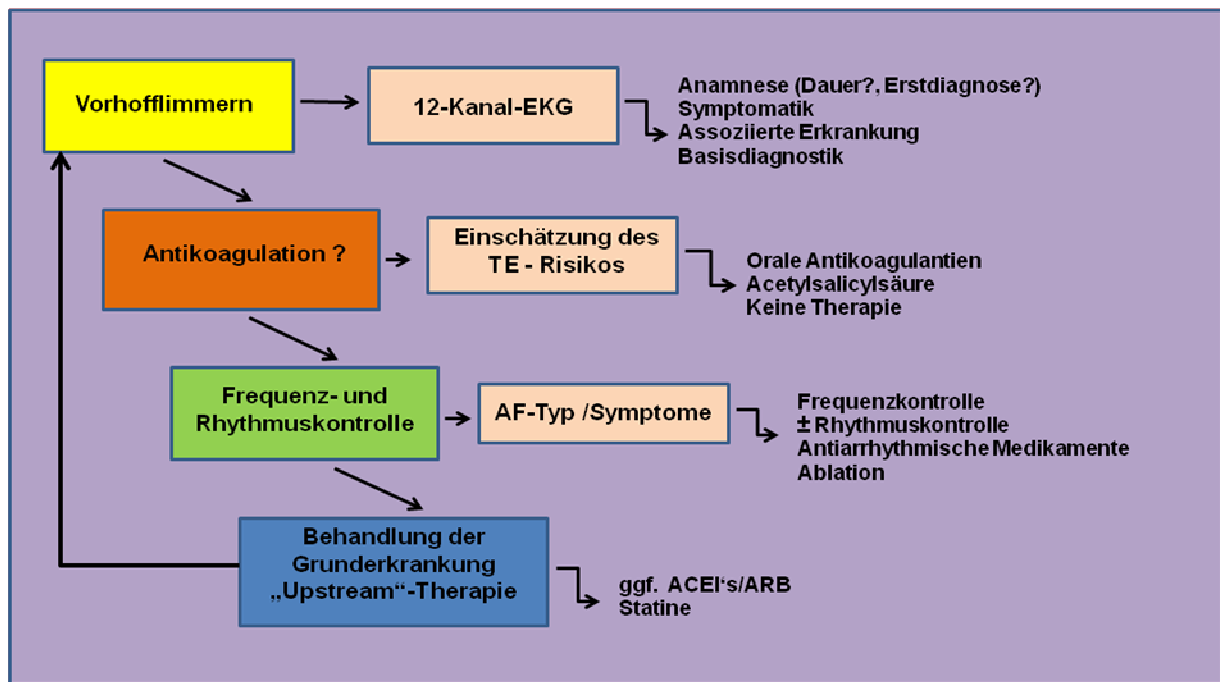


Abbildung 2.7:

Die Behandlungskaskade für Patienten mit Vorhofflimmern. ACEI = Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitor; ARB = Angiotensin-Rezeptor-Blocker; TE = Thrombo-Embolie, EHRA-Score = European Heart Rhythm Association : Score zur Klassifikation der Symptome bei Vorhofflimmern ¹²⁰ (s. Abbildung 2.7)

2.8 Myokardiale Fibrose als Substrat für Vorhofflimmern

Diese Arbeit legt ihr Hauptaugenmerk auf den strukturellen Umbau der Herzvorhöfe. Fibrose ist ein zentrales Merkmal dieses Strukturellen Remodellings.⁵⁴ Sie ist das Resultat einer Ansammlung von fibrillären Kollagenablagerungen, die am häufigsten als reparativer Prozess auftreten, um degeneriertes Herzmuskelparenchym zu ersetzen. Vorhoffibrose tritt als ein pathologischer Endzustand bei Alterungsprozessen sowie einer Vielfalt von Herzerkrankungen, wie ventrikuläre Pumpfunktionsstörung, Mitralklappenerkrankung und möglicherweise Herzmuskelschämie auf.^{2;58} Ein Verständnis der einer atrialen Fibrose zugrunde liegenden Mechanismen ist die Voraussetzung für die Entwicklung verbesserter Behandlungsstrategien.¹

2.8.1 Kardiales Remodelling

Um den Mechanismus der atrialen Fibrosierung zu verstehen, ist es wichtig, das Zustandekommen des so genannten kardialen Remodellings zu begreifen. Kardiales Remodelling kann definiert werden als eine Summe genexpressorischer, molekularer, zellulärer und interstitieller Veränderungen, welche sich klinisch als Änderungen von Größe, Form und Funktion des Herzens nach einer Schädigung manifestieren können.⁶⁰ Diese Veränderungen betreffen sowohl Myozyten (Phänotypänderung mit Hypertrophie und verminderter Kontraktilität, Nekrose, Apoptose) als auch die extrazelluläre Matrix (Kollagenabbau und Fibrose unter dem Einfluss von Metalloproteinasen).

Kardiales Remodelling wird beeinflusst durch hämodynamische Veränderungen, neurohormonale Aktivierung und andere Prozesse. Man unterscheidet beim kardialen Remodelling eine makroskopische von einer mikroskopischen Veränderung der Herzstruktur.^{61;62} Zu den makroskopischen Veränderungen zählen: Hypertrophie und Dilatation bei Druckbelastung, bei Volumenbelastung und nach Herzinfarkt.

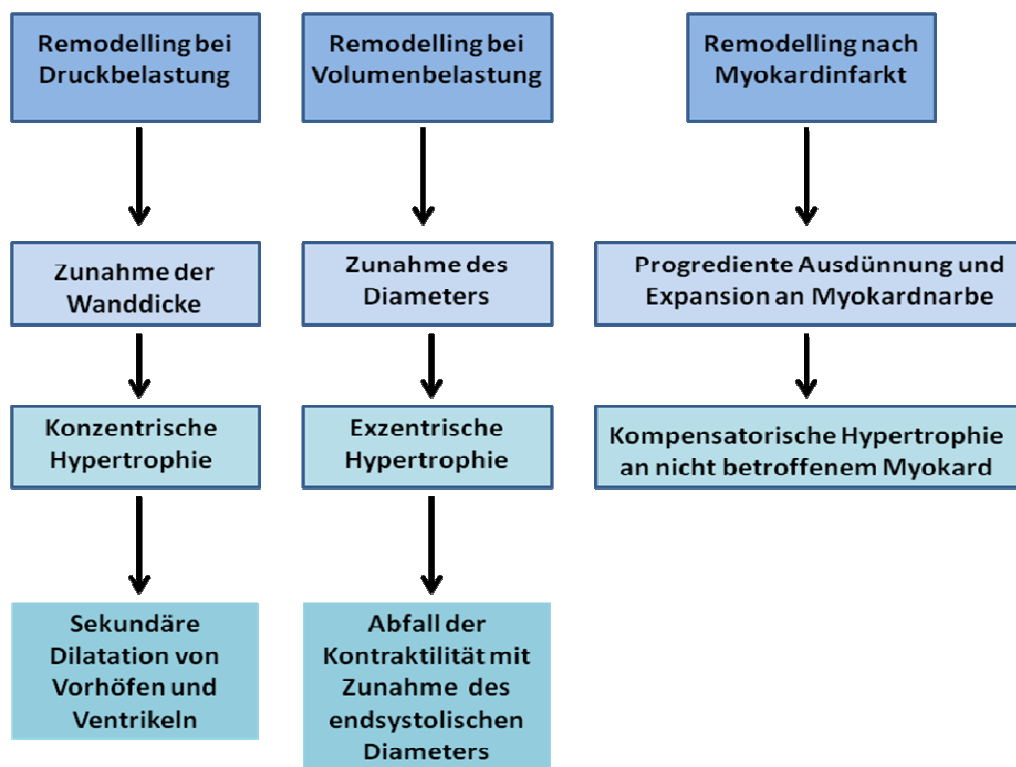


Abbildung 2.8

2.8.2 Strukturelle Veränderungen des Myokards

Die Hypertrophie des Myokards ist durch das Wachstum einzelner Zellen gekennzeichnet bzw. durch eine Zunahme des Myozyten-Durchmessers. Durch schwere Zellschädigung durch Hypoperfusion des Myokards oder schwerwiegende Überlastung der Kardiomyozyten kann ein Myozytenverlust durch Apoptose oder Nekrose verursacht werden.^{64;122} Die Kardiomyozyten sind einem erhöhten oxidativen Stress und einer Kalzium-Überladung ausgesetzt.⁹⁶ Die Zellhomöostase und Regulation des osmotischen Druckes kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Das hat ein Anschwellen der Zelle und die Zerstörung der Plasmamembran zur Folge.¹²¹ Der Zelltod ist meistens nekrotisch und durch eine irreversible Dysfunktion der Mitochondrien gekennzeichnet.⁹²

Abgestorbene Myozyten werden nicht ersetzt, die Wandspannung steigt weiter an. Abgestorbene Myozyten werden durch Bindegewebszellen ersetzt, was eine Fibrosierung in Gang setzt. Man unterscheidet eine reaktive und eine reparative Fibroseform. Die reparative Fibrose ersetzt degenerierende Herzmuskelzellen⁶⁵, während die koexistierende reaktive Fibrose eine Folge der erhöhten Wandspannung ist und eine Erweiterung des Interstitiums verursacht, wie in Abbildung 2.8 gezeigt. Pathologisch produziertes Kollagen unterscheidet sich vom natürlich vorhandenen Kollagen der gesunden Myozyten in seiner Dichte und in der Organisation der Kollagen-Fibrillen.^{66;67} Es kann ein Hindernis für die Ausbreitung der elektrischen Erregung im Myokard darstellen.

Die Kardiomyozyten werden durch interzelluläre elektrische Synapsen (Gap Junctions) verbunden. Die Fibrose unterbricht die Verbindung zwischen Kardiomyozyten in erkranktem Herzmuskelgewebe. Beide Muster (reaktive und reparative Fibroseform) der Kollagenbildung treten bei strukturellem Umbau auf.¹

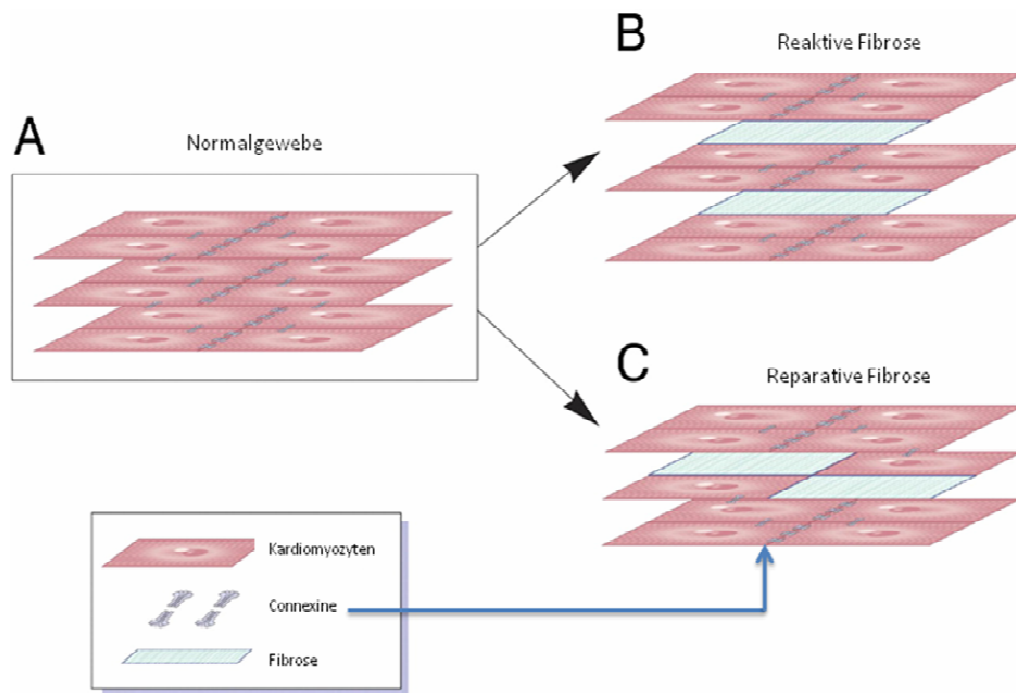


Abbildung 2.9:

Schematische Darstellung der Zerstörung der Myozytenverbindung durch Fibrose.¹

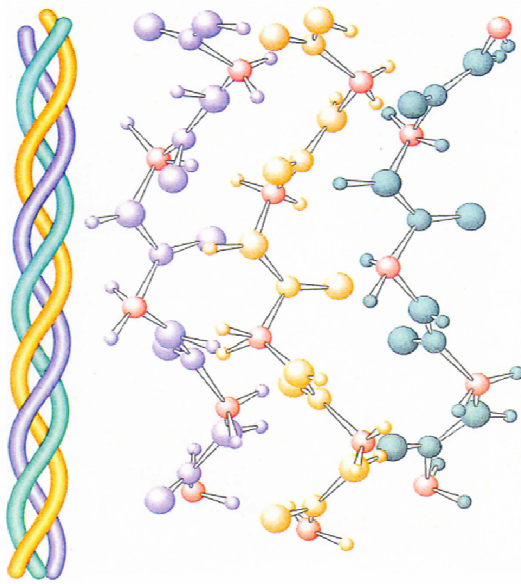
2.9 Marker für myokardiale Fibrose

Vorhoffibrose stellt ein Substrat insbesondere für die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern dar. Um Fibrose bestimmen zu können, müsste man eine Myokardbiopsie durchführen. Diese ist allerdings eine invasive Maßnahme mit möglichen Komplikationen; daher wäre es hilfreich, den Kollagengehalt der Herzvorhöfe nicht-invasiv bestimmen zu können. Dies könnte durch Serummarker der Kollagensynthese und degradation möglich sein.

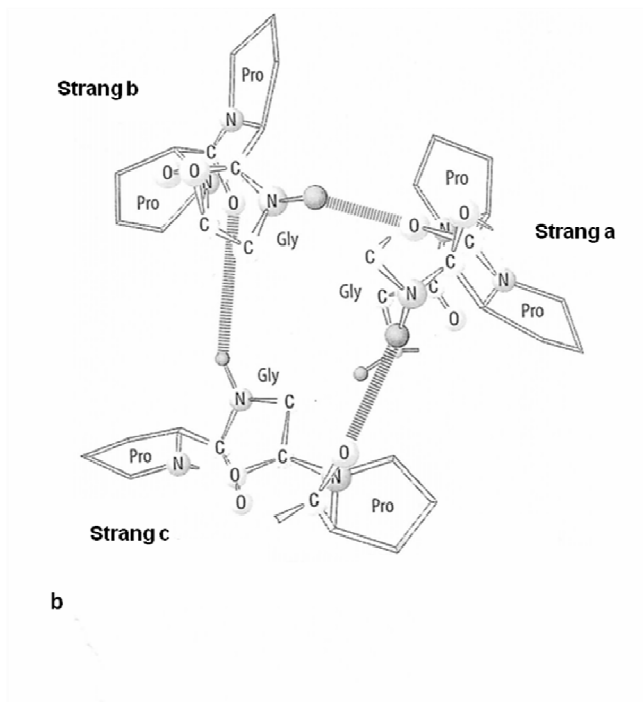
Kollagenaufbau und Kollagensynthese

Kollagenmoleküle sind aus drei Polypeptidketten aufgebaut, die identisch oder verschieden sein können. Gemeinsames Strukturmerkmal aller Kollagene ist das Vorkommen von stabförmigen Abschnitten, die eine tripelhelikale Konformation einnehmen. Drei linksgängige helikale Stränge (α -Ketten) bilden eine rechtsgängige Superhelix aus. Die Aminosäuresequenz des Kollagens ist relativ monoton und ist durch wiederholte Triplet

Sequenzen aus Glycin-X-Y bedingt, wobei X und Y häufig Prolin und Hydroxyprolin sind.
 Ferner tritt in Y-Position Hydroxylysin auf. (siehe Abbildung 2.10)



a



b

Abbildung 2.10:

Modell der Kollagentripelhelix. **a** Drei linksgängige Helices winden sich rechtsgängig umeinander. **b** Im Innern der Tripelhelix liegen die Glycinreste, die intermolekulare Wasserstoffbrücken bilden.⁵⁶

Amino-terminales Propeptid von Typ-I Kollagen (PINP) und von Typ-III Kollagen (PIIINP) im Serum

Kollagen ist das häufigste extrazelluläre Matrix-Protein im Herz. Es gibt davon 5 verschiedene Formen: Am häufigsten sind Kollagen Typ I und III im Insterstitium vorhanden. Kollagen Typ I macht etwa 80% des totalen Herzkollagengehalts aus, während Kollagen Typ III 10% ausmacht.²²

Typ I Kollagen besteht aus 2 $\alpha 1(I)$ -Ketten und einer $\alpha 2(I)$ -Ketten, während Typ III Kollagen bestehen aus $\alpha 1(III)$ -Ketten. Die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Kollagentypen bestehen in der Länge der Tripelhelikalen Abschnitte, kurzen Unterbrechungen in der Tripelhelix und in dem zusätzlichen Vorhandensein von globulären Domäne. Auf diese Weise erhalten die Kollagene unterschiedliche biologische Eigenschaften.⁵⁶ Typ I Kollagen entsteht aus dem von Fibroblasten (und im Knochen von Osteoblasten) synthetisierten Typ I Prokollagen. Typ I Prokollagen hat an den N-(Amino)- sowie auch an den C-(Carboxy)-terminalen-Enden Erweiterungen. Diese Erweiterungen (Propeptide) werden während der Umwandlung von Prokollagen zu Kollagen und seiner folgenden Einlagerung in die Knochenmatrix durch spezifische Proteasen entfernt. Amino-terminales Propeptid von Typ I Prokollagen (PINP) im Serum spiegelt die Bildungsrate des Typ I Kollagens wider. Amino-terminales Propeptid von Typ-I Kollagen wird während der Typ I Kollagenbildung in den interzellulären Raum und in der Folge auch in den Blutstrom abgegeben. Es scheint, dass PINP zunächst als Trimer, von der trimeren Kollagenstruktur abgeleitete Struktur, freigesetzt wird, dann aber schnell durch thermische Abbaueffekte in eine monomere Struktur umgewandelt wird.¹²³

Auch Typ III Kollagen stammt von einem größeren Protein ab, dem Typ III Prokollagen, das an beiden Enden seines Moleküls ein Propeptid trägt. Von den aminoterminalen Propeptiden werden einige bei der Synthese von Typ III Kollagen freigesetzt. Andere bleiben Bestandteil jener Moleküle, die an der Oberfläche der Kollagenfibrillen anheften. Der Nachweis des Antigens im Serum ist daher ein Hinweis entweder auf eine Neubildung von Typ III Kollagen (einschließlich dessen Umbaus) oder auf eine Degradation vorhandener Typ III Kollagenfibrillen. Der weitere Metabolismus von PIIINP ist nicht im Einzelnen bekannt. Kleinere, mit PIIINP verwandte Abbauprodukte können im Serum und im Urin nachgewiesen werden. Antigene mit einem höheren Molekulargewicht sind ebenfalls im Serum vorhanden. Ihre genaue Molekularstruktur ist unbekannt. Die PIIINP Serumkonzentration ist in

zahlreichen durch eine Vermehrung und/oder einen Abbau von Bindegewebe gekennzeichneten Zuständen erhöht, wie z.B. bei fibroproliferativen, hämatologischen, endokrinologischen und malignen Erkrankungen.¹²⁴

C-Terminales Propeptid von Typ I Prokollagen (PICP) im Serum

C-Terminales Propeptid von Typ I Prokollagen im Serum wird als biochemischer Marker für die Messung der Kollagenproduktion eingesetzt. PICP stammt aus dem Typ I-Prokollagen und besteht aus drei Polypeptidketten. Studien haben gezeigt, dass PICP mit der Volumen/Masse des Myokardialen Gewebe, der zum Teil aus Kollagenfibrillenablagerungen besteht, sowohl bei Ratten (spontaneously hypertensive rats) mit linksventrikulärer Herzhypertrophie als auch bei hypertensiven Patienten mit linksventrikulärer Herzhypertrophie assoziiert ist.^{8;129} Andere Studien besagen, dass Serum-PICP mit der Aktivierung des Enzyms PCPase im Myokard von Patienten mit hypertensiver Herzinsuffizienz assoziiert ist.¹³⁰ Nachgewiesen wurde auch, dass die Konzentration von PICP im Blut (aus der V. Cubitalis entnommen) sowohl mit der PICP-Konzentration im Blut aus dem Sinus Coronarius als auch mit dem Gehalt an Kollagenfibrillen im myokardialen Gewebe korreliert.¹²⁸ Somit wird die PICP-Konzentration im Serum als Indikator für das Ausmaß und den Schweregrad der Herzfibrose bei hypertensiven Patienten angesehen.¹²⁸

Carboxyl-Terminal Telopeptid vom Typ I Kollagen (ICTP) im Serum

Carboxyl-Terminal Telopeptid vom Typ I Kollagen (ICTP) entsteht durch die Spaltung von Kollagen Typ I durch Kollagenase und kann als ein Index für den Kollagen-Abbau verwendet werden. Osteoklasten synthetisieren aktiv lysosomale Enzymen, die Kollagen abbauen können. Der Kollagenabbau erfolgt mit Hilfe der Matrix-Metalloproteinase (MMP-1) und führt zur Bildung des ICTP. ICTP wird in die Blutzirkulation freigesetzt und über die Nieren ausgeschieden.⁵⁹ Studien haben gezeigt, dass die ICTP-Konzentration im Blut die Menge der Knochenresorption widerspiegelt. ICTP wird als Marker für die Knochenresorption, den Knochenstoffwechsel und für die Beurteilung von Knochenmetastasen bei bösartigen Tumoren eingesetzt.^{57;41}

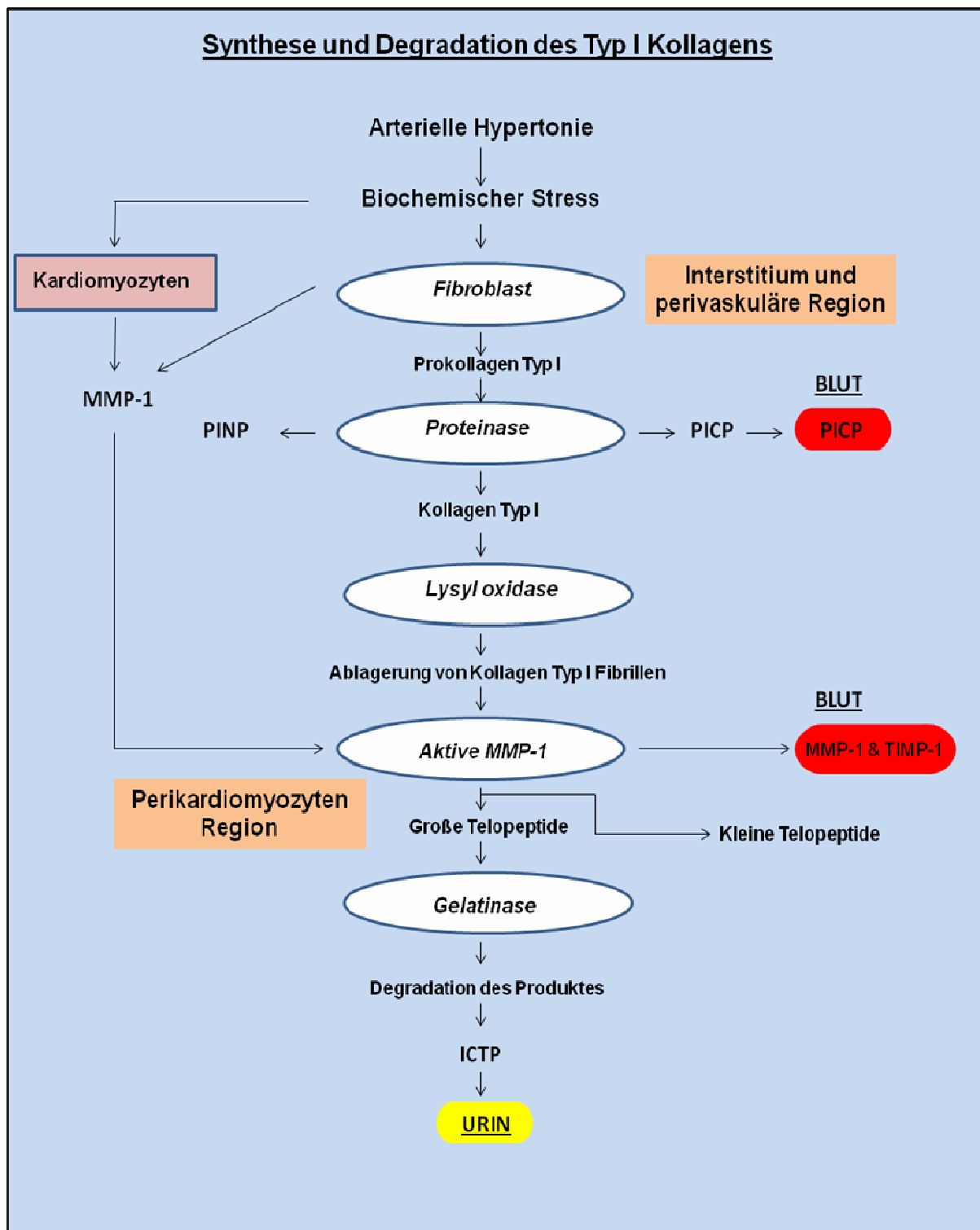


Abbildung 2.11:

Schematische Darstellung der Synthese und Degradation des Typ I Kollagens. PICP: C-Terminales Propeptid von Typ I Prokollagen im Serum; PINP: Amino-terminales Propeptid von Typ-I Prokollagen; MMP-1: Matrixmetalloproteinase 1; TIMP-1, Matrixmetalloproteinase-Inhibitor 1; aktive MMP-1: MMP-1 nicht an TIMP gebunden.¹²⁸

2.10 Fibrose und das Auftreten von Vorhofflimmern nach Herzoperationen

Vorhofflimmern ist eine der häufigsten Komplikationen, die nach einer Herzoperation bei Einsatz der Herz-Lunge-Maschine entstehen können. Es verlängert den stationären Aufenthalt und kann andere Komplikationen wie z. B. Schlaganfälle verursachen. Die Pathophysiologie des post-operativen Vorhofflimmerns wurde eingehend untersucht. Vorherige Studien haben gezeigt, dass Alter, perioperativer Stress und atriale Dimensionen wichtige unabhängige Prädiktoren das Auftreten von post-operativem Vorhofflimmern (POVHFli) sein können.⁶⁹

Die Inzidenz von POVHFli liegt bei ungefähr 30% nach Koronar-Bypass-Operationen, 40% nach Herzklappenoperationen und steigt auf 50% bei einer Kombination beider Operationen. POVHFli tritt meistens zwischen dem 2. und 4. Tag nach der Herzoperation, am häufigsten nach dem zweiten Tag auf. 70% der Patienten mit POVHFli entwickeln dies vor dem 5. Tag und 94% vor dem 7. Tag.¹⁵ Obwohl POVHFli im allgemeinen gut toleriert wird und als ein vorübergehendes Problem im Zusammenhang mit der Herzoperation gesehen wird, kann es mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität assoziiert sein, besonders bei älteren Patienten und bei Patienten mit einer linksventrikulärer Dysfunktion.¹⁵

Der wichtigste Risikofaktor für das Auftreten von POVHFli ist das fortgeschrittene Alter gefolgt von Vorhofflimmern in der Vorgeschichte, männliches Geschlecht, niedrige linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Herzklappenoperationen, COPD, chronische Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus.¹⁵

Die zugrunde liegenden Mechanismen für das Auftreten von POVHFli sind vielfältig. Dazu gehört eine perikardiale Entzündungsreaktion, exzessive Katecholamin-Ausschüttung, Bluthochdruck, interstitielle Ödeme mit resultierenden starken Volumenveränderungen usw. Diese Faktoren führen möglicherweise zu einer Verkürzung der atrialen Refraktärzeit und zu einer Verlangsamung der atrialen Erregungsleitung, was arrhythmogen wirkt. Eine alternative Erklärung ist, dass das Substrat von der Herzoperation selbst verursacht wird. Es ist in der Tat möglich dass die Veränderungen der kardialen Struktur, verursacht durch die Inzision des Vorhofs oder den perioperativen Stress, zu vermehrten Erregungsleitungsstörungen führen. Einige Studien haben gezeigt, dass Entzündungsreaktionen die atriale Erregungsleitung stören können.¹⁵

Adipositas ist mit einer höheren Herzzeitvolumen-Belastung, mit einer höheren linksventrikulären Muskelmasse und linkseitigen Vorhofdilatation assoziiert. Diese Risikofaktoren sind Prädiktoren für die Entwicklung von POVHFlI. ¹⁵

Die Genetische Disposition kann auch eine Ursache für das Auftreten von POVHFlI sein ¹⁵.

3. GEGENSTAND DER ARBEIT

Diese Studie wurde entwickelt, um zu untersuchen, ob 1.) Serum-Marker des Kollagenumsatzes mit atrialer Fibrose korrelieren, ob 2.) atriale Fibrose oder Serum-Marker des Kollagenumsatzes im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko des Auftretens von VHFlI nach Herzoperationen stehen und ob 3.) vordefinierte klinische Parametern (Alter, linker Vorhof-Durchmesser, linkesventrikuläre Ejektionsfraktion (EF), Amino-terminales Fragment des natriuretischen Propeptides vom B Typ (NT-proBNP) mit der Vorhoffibrose korrelieren.

4 MATERIAL

4.1 Geräte

Mikrotom: Leica RM 22 55

Zentrifuge: Heraeus, Megafuge 1.OR

Mikroskop: Nikon, digital camera DXM1200F

Trockenschrank : Heraeus-Kendro, Laboratory Products

Plasma (4,7-ml-Lithium-Heparin-Monovette)

Serum (4,7-ml-Serum-Monovette)

4.2 Lösungen/Substanzen

Flüssigstickstoff (Fa. air liquide Deutschland GmbH)

Formalin 4% (37% von der Fa. Roth + 1 x PBS Phosphate-Buffered-Saline)

Ethanol 70%, 85%, 100% (Fa. Merck)

Destilliertes Wasser (Fa. Braun)

Ampuwa (Acqua dest. Fa. Braun)

Pikrinsäure (Fa. Merck, pH 2,0 (1,2%), C₆H₃N₃O₇)

Sirius Rot (Fa. Sigma Aldrich, direct red 80, C.I. No. 35780)

Xylol (Reinst Xylol 100% Merck KgaA, Darmstadt)

Entellanlösung (Merck KgaA, Darmstadt)

4.3. Myokardiales Gewebe

Eine Gewebeprobe vom linken und vom rechten Vorhofohr (LA und RA) wurde von den ersten 10 Patienten asserviert, und danach wurde bei weiteren 18 Patienten nur rechtsatriales Gewebe verwendet. Zusätzlich wurde von 20 Patienten eine Gewebeprobe des linken Ventrikels asserviert.

5. METHODEN

5.1 Patientenpopulation

Wir schlossen prospektiv 28 aufeinander folgende Patienten mit Sinusrhythmus und ohne Vorhof-Arrhythmien in der Vorgeschichte ein, die sich einer elektiven Herzoperation unterzogen, bei der eine Herz-Lunge-Maschine zum Einsatz kam. Die Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes hatte das Protokoll der Studie (Ref. No. 131/00) genehmigt, und alle Patienten gaben eine schriftliche Einwilligung zur Teilnahme. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Grundsätzen der aktuellen Deklaration von Helsinki durchgeführt.

5.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Patienten mussten zum Einschluss in die Studie folgende Kriterien erfüllen

- Strukturelle Herzerkrankung mit elektiver Herzoperation unter Einsatz der Herz-Lunge-Maschine
- Sinusrhythmus, keine Vorhoffarrhythmie in der Vorgeschichte
- Ausführliche Information und schriftliche Einverständniserklärung des Patienten
- Alter > 18 Jahre

Patienten, auf die eines der folgenden Kriterien zutraf, wurden von der Studie ausgeschlossen:

- Vorhoffarrhythmien in der Vorgeschichte
- Niereninsuffizienz (Kreatinin-Wert > 1,2 mg/dl)
- Leberschaden (erhöhte Transaminasen/Cholestaseparametern)
- Metabolische Osteopathien (erhöhte Alkalische Phosphatase / Hyperkalzämie)
- Hyperthyreose
- Klinische Anzeichen einer Infektion
- CRP > 10 mg/l

5.1.2 Präoperative Diagnostik

Alle Patienten unterzogen sich einer standardisierten Echokardiographie, der linke Vorhofdurchmesser wurde anteroposterior in der parasternalen Längsachse gemessen. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion wurde durch Ventrikulographie im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung präoperativ bestimmt.

5.1.3 Post-operatives Monitoring

Der Herzrhythmus wurde kontinuierlich über 2 Tage nach der Operation überwacht. Von Tag 3-6 wurde täglich ein EKG aufgezeichnet und zusätzlich, wenn klinische Anzeichen von VHFli auftraten. Post-operatives Vorhofflimmern wurde als eine erste dokumentierte Episode von VHFli definiert, die mindestens 30 Sekunden dauert und innerhalb von 6 Tagen nach der Herzoperation auftritt.

5.2 Biochemische Diagnostik

Vorgehensweise

Blut wurde im Rahmen der ohnehin notwendigen Anlage eines zentralen Venenkatheters im Rahmen der Narkoseeinleitung entnommen.

Während des Transportweges wurde das Blut auf Eis gekühlt. Die Zentrifugation erfolgte bei 5°C mit 3826,1 G (relative Zentrifugalbeschleunigung RCF) für 15 Minuten. Nach Zentrifugation und Pipettierung des Überstandes erfolgte die Konservierung des so gewonnenen Serums bei -70°C.

5.2.1 Bestimmung von Amino-terminalem Propeptid von Typ-I Prokollagen (PINP) und von Amino-terminalem Propeptid von Typ-III Kollagen (PIIINP) im Serum

Einen Tag vor der geplanten Operation wurden die routinen Labortests durchgeführt. Die Plasmakonzentrationen des Amino-terminalen Propeptids des Prokollagen Typ I (PINP) und des Amino-terminalen Propeptids des Kollagen Typ III (PIIINP) wurden gesammelt und bei -70 °C aufbewahrt. Wochen später wurden PINP und PIIINP unter Verwendung eines

Radioimmunassay Kits (Cat. No. 67034 und 68570, Orion Diagnostica, Finland: nach Hersteller-Angabe, (in Kooperation mit Labor-Limbach)) bestimmt.

Testprinzip

Eine bekannte Menge an radioaktiv markiertem PINP oder PIIINP konkurriert in der Probe mit einer unbekannt Menge an nicht markiertem PINP oder PIIINP um die in einer limitierten Menge vorhandenen, hochaffinen Bindungsstellen der polyklonalen PINP- oder PIIINP-Antikörper vom Kaninchen. Ein zweiter gegen Kaninchen-IgG gerichteter und an Kaolinpartikel gebundener Antikörper dient der Trennung von AK-gebundenem PINP und freiem PINP oder PIIINP und freiem PIIINP. Die Radioaktivität von gebundenem Tracer-Antigen wird in einem Gammacounter gemessen. Die Menge an radioaktiv markiertem PINP/PIIINP ist umgekehrt proportional zur Menge an PINP/PIIINP in der Probe.

Referenzwerte PINP:

Frauen: 19 – 83 µg/l

Männer: 22 – 87 µg/l

Referenzwerte PIIINP:

Frauen und Männer: 2,3 – 6,4 µg/l

5.2.2 Bestimmung von C-terminalem Propeptid von Typ I Prokollagen (PICP) im Serum

Die PICP-Konzentration ist ein Indikator für die In-vivo-Kollagenproduktion. Der Metra-PICP-EIA ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von PICP im Serum. Kollagen ist ein zu einer Tripelhelix verdrehtes Molekül, das die fibrilläre Struktur aller Bindegewebe bildet. Gebildet wird es als Prokollagen, ein größeres Vorstufenmolekül. Prokollagen besteht aus reifem Kollagen mit carboxy- und aminoterminalen Extensionspeptiden. Diese auch als Propeptide bezeichneten Extensionspeptide werden vor der Einlagerung des Kollagens in die wachsenden Kollagenfibrillen durch spezifische Proteasen vom Kollagenmolekül abgespalten. Diese Freigabe von Peptiden in die Zirkulation dient als Maß für die Kollagenbildung.

Testprinzip:

Der Test dient zur quantitative Bestimmung von PICP im Serum, beruht auf dem so genannten Sandwichprinzip und wird auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Platte ist mit einem monoklonalen Anti-PICP-Antikörper, einem Anti-PICP-Antiserum vom Kaninchen, einem alkalischen Anti-Kaninchen-Phosphatasekonjugat von der Ziege und einem p-Nitrophenylphosphat (pNPP-Substrat) beschichtet.⁴⁰

Die Ergebnisse der Proben müssen für die vorgenommenen Verdünnungen korrigiert werden. Wurde die Probe im Verhältniss 1:12 verdünnt, den ng/ml-Wert mit dem Faktor 12 multipliziert, um die endgültige PICP-Serumkonzentration in ng/ml zu erhalten.

Referenzwerte:

Erwachsenen über 25 Jahre = 69-163 ng/ml

Kinder im Alter zwischen 4-18 Jahre = 110-966 ng/ml (Mittelwert:326 ng/ml)⁴⁰

5.2.3 Bestimmung von C-terminalem-Telopeptid von Typ I Kollagen (ICTP) im Serum

C-terminal-Telopeptid des Typ I Kollagens ist ein Abbauprodukt von Kollagen Typ I und kann im Serum nachgewiesen werden.

Testprinzip

Die Plasmakonzentrationen des C-Terminalen-Telopeptids des Typs I Kollagen (ICTP) wurden unter Verwendung eines Enzym-Immunoassay Kits (Cat. No. 05892, Orion Diagnostica, Finland) bestimmt. Die Methodik basiert auf der kompetitiven Immunoassay-Technik. Eine bekannte Menge peroxidasemarkierten ICTPs und eine unbekannte Menge unmarkierten ICTPs in der Prüfmenge konkurrieren um die begrenzte Anzahl Bindungsstellen mit hoher Affinität des primären Antikörpers. Ein Sekundär Antikörper, gerichtet gegen den primären, bindet den Antikörper-Antigen-Komplex, was die einfache Trennung von gebundenem und freiem Antigen ermöglicht. Nach dem Auswaschen des freien Antigens ist die Menge des markierten ICTP umgekehrt proportional zur Menge des ICTP in der Prüfmenge. Die Menge des markierten ICTP wird gemessen durch Inkubation mit einem Substrat (Tetramethylbenzidine), das ein gefärbtes Endprodukt produziert. Die

Konzentrationen in unbekanntem Prüfmengen erhält man aus einer „Eichkurve“, die mit Hilfe bekannter ICTP-Konzentrationen erstellt wurde. 59

Referenzwerte:

Frauen: 1,6-4,2 µg/l

Männer: 1,5-4,3 µg/l

5.2.4 Bestimmung des Amino-terminalen Fragments des natriuretischen Peptids vom B-Typ (NT-proBNP)

Die Plasmakonzentrationen von NT-proBNP wurden mittels eines im Handel erhältlichen Elektrochemolumineszenz Assays (Roche, Mannheim, Germany) bestimmt.

Verwendungszweck:

Der proBNP-Test gilt als Biomarker kardialer Funktionsstörungen. BNP wurde im Routine-Labor des Universitätsklinikums des Saarlandes bestimmt.

Testprinzip

Der Elektro-Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assay (ECLIA) ist ein immunologischer in vitro Test zur quantitativen Bestimmung von N-terminalem pro B-Typ natriuretischem Peptid in Humanserum und -plasma. Als Erstes erfolgte die Inkubation. Das Antigen aus 20 µl Probe, ein biotinylierter polyklonaler NT-proBNP-spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter polyklonaler NT-proBNP-spezifischer Antikörper bilden einen Sandwich-Komplex. Nach Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird der Komplex über Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an die Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Danach werden mit ProCell (System-Puffer (Firma Roche)) die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Ergebnisse werden anhand einer Eichkurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt-Kalibrierung und eine mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert.¹³¹

Der Referenzwert ist alters- und geschlechtsabhängig.

Männer:

< 45 Jahre	bis 62,9 pg/ml
45-54 Jahre	bis 83,9 pg/ml
55-64 Jahre	161 pg/ml
64-74 Jahre	241 pg/ml
> 75 Jahre	486 pg/ml

Frauen:

< 45 Jahre	bis 116 pg/ml
45-54 Jahre	bis 169 pg/ml
55-64 Jahre	bis 247 pg/ml
64-74 Jahre	bis 285 pg/ml
> 75 Jahre	bis 738 pg/ml

5.3 Histomorphologie

5.3.1 Fixierung des myokardialen Gewebes

Vorgehensweise:

Beim Kanülieren des rechten Vorhofs, einer notwendigen Maßnahme, um die Patienten an die Herz-Lunge-Maschine anschließen zu können, wird in der Regel ein Teil des rechten Herzhofs abgeschnitten. Bei 10 Patienten wurde im Rahmen der OP ein kleines Stück des linken Herzhofs entfernt. Die Biopsieproben des linken Ventrikels wurden bei Entlüftung der linken Hauptkammer gewonnen. Die gewonnenen Proben wurden während des Transports ins Labor mit Eis gekühlt. Die Hälfte aller Biopsien wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff konserviert und bis zur endgültigen Aufarbeitung bei einer Temperatur von -70°C aufbewahrt. Die andere Hälfte des Präparates wurde in 4%igem Formalin fixiert. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Organe in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom geschnitten (Schnittdicke 3,5µm) und mit Sirius Rot gefärbt.

5.3.2 Einbettung

Die fixierten und zugeschnittenen Gewebeproben wurden in Einbettungskassetten verschlossen. Löcher im Boden und im Deckel der Kassette erlauben den freien Zugang der Lösungsmittel zur Gewebeprobe. Der Einbettungsprozess erfolgt über Nacht. Die

eingekapselten Gewebeproben werden dabei durch mehrere Bäder mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe geführt und dabei entwässert. Das Gewebe wird anschließend mit Xylol entfettet. So kann die Immersion des Paraffins in das Gewebe erfolgen. Anschließend werden die Gewebe eingeblockt. Die 60°C warmen Gewebeproben werden in kleine wannenförmige Gießformen gesetzt und die Form mit Paraffin aufgefüllt. Wenn das Paraffin erkaltet ist, kann man den Block aus der Form nehmen. Das Gewebe hat jetzt eine weitgehend gleichmäßige Härte und kann geschnitten werden.

5.3.3 Mikrotomie

Für die histologische Untersuchung wurde das in Paraffin eingebettete Gewebe in 3,5 µm dicke Scheiben geschnitten. Die paraffinisierten Gewebestücke erreichten einen Durchmesser von 1 cm und wurden in der Folge mit Hilfe einer Schneidemaschine geschnitten. Der Paraffinblock wurde dazu fest in das Mikrotom eingespannt. Um eine ebene Oberfläche zu erhalten, wurden nun 50 µm starke Schnitte vorbereitet, so wurde der Block langsam in Richtung Mikrotom verschoben. Sobald jener auf einer Ebene mit diesem war, schnitt man 10 Scheiben ab. Dann verstellte man die Schittdicke auf 3,5 µm und nahm die nächsten Schnitte für die Auswertung vor. Dazu wurden die Gewebeschnitte zuerst in einen Behälter mit 20°C warmem Wasser gegeben. Ein Pinsel diente dem Transport des dünnen Schnittes. Die Schnitte wurden dann auf Glasobjektträger aufgezogen. Der Paraffinschnitt haftete durch elektrostatische Wechselwirkungen direkt am Glas. Anschließend wurden alle Objektträger bei 70°C getrocknet.

5.3.4 Sirius-Rot-Färbung

Vorgehensweise:

In einen 500 ml-Messkolben wurde 32 ml Ampuwa vorgelegt. Eine gesättigte wässrige Pikrinsäure-Lösung (1,2 %ig) wurde auf fast 480 ml aufgefüllt. Der pH wird auf 2,0 mit 10 N NaOH eingestellt und dann mit Pikrinsäure auf 500 ml aufgefüllt. Der pH wurde erneut auf 2,0 eingestellt. Anschließend wurde 0,5 g Sirius Rot in eine braune Flasche gegeben und mit 500 ml der eben hergestellten Lösung gelöst. Über Nacht wurde die neue Lösung permanent gerührt.

Prinzip

Zur Quantifizierung der Kollagenmenge im Gewebe wurden die Proben einer Sirius-Rot-Färbung unterzogen. Kollagenfasern stellen sich rot dar, während Muskelfasern und Zytoplasma gelb erscheinen.

Vorgehensweise

Entparaffinisierung:

Die im 50°C warmen Schrank aufbewahrten Objektträger (mit Präparat) wurden auf einer Heizplatte auf 70°C für 30 Minuten erhitzt. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger ohne einen Abkühlungsvorgang für 10 Minuten zum Entparaffinisieren in eine Xylol-Lösung getaucht. Als Wanne wurde hier die Küvette von Coplin Jars verwendet. Nach zehn Minuten wurde das Präparat in eine zweite Wanne für 10 weitere Minuten gegeben, die ebenfalls die Xylol-Lösung enthielt. Die Prozedur wurde nun erneut mit einer dritten Wanne mit Xylol-Lösung durchgeführt. Damit die Schnitte gewässert werden konnten, wurden die Präparate in eine absteigende Ethanolreihe getaucht. Man begann mit einer 100%igen Ethanollösung. Nach fünf Minuten erfolgte die Tauchung des Präparats in eine 85%ige Ethanollösung. Anschließend wurde das Präparat in eine 70%ige Lösung gegeben, ebenfalls für fünf Minuten. Nach der Wässerung des Präparats mit Ethanol wurde dieses mit destilliertem Wasser abgespült. Nun folgte die Färbung des Präparates. Verwendet wurde hier die hergestellte Sirius-Rot-Lösung. Der Färbung für 60 Minuten folgte eine Spülung für fünf Minuten mit destilliertem Wasser. Um die Schnitte zu entwässern, wurden die Präparate in eine aufsteigende Ethanolreihe getaucht. Die Entwässerung begann mit einer 70%igen Ethanollösung für eine Zeit von 5 Minuten. Nach Tauchen des Präparates in eine 100%ige Ethanollösung für 5 Minuten war die Färbung abgeschlossen. Zusätzliche störende Verunreinigungen, die während des Färbevorganges entstanden sind, lassen sich mittels 3-minütigem Eintauchen/Inkubation des Präparates in eine Xylol-Lösung entfernen. Nach Ablauf des o. g. Vorganges erfolgte eine Fixierung des Präparates auf dem Objektträger. Zum Eindecken von Präparaten wurden Deckgläser und Entellanlösung verwendet. Das Mittel lag zunächst in flüssiger Form vor. Durch das Verdunsten des Lösungsmittels nach 24 h erhärteten die Präparate mit dem Deckglas.

5.4 Quantifizierung von interstitiellem Kollagen

Von jedem Schnitt wurden 12 Blickfelder digital photographiert, die eine Gesamtfläche von etwa 20,0 mm² umfassten. Verwendet wurde hierfür die Nikon ACT-1-Software und ein Mikroskop Nikon DXM1200F. Diese Bilder wurden durch das Bildbearbeitungs-Programm LUCIA G (Lucia G on Dxm1200. Version 4.81) analysiert. Mit Hilfe des Lucia-Programms kann in jedem Bild die Kollagenmenge quantifiziert werden.

Bildbereiche mit endokardialem, perikardialem und perivaskulärem Kollagen wurden zuvor manuell ausgeschnitten, und das gesamte erfasste interstitielle Gewebe wurde mit Hilfe des Programms quantifiziert. Die interstitielle Kollagenfraktion wurde als Quotient der rot markierten Kollagenfläche und der Fläche des gesamten Gewebes (Myozyten + Kollagen) bestimmt. Diese 12 Messungen der interstitiellen Fibrose wurden gemittelt, und deren Standardabweichung wurde als räumliche Heterogenität der Fibrose definiert.

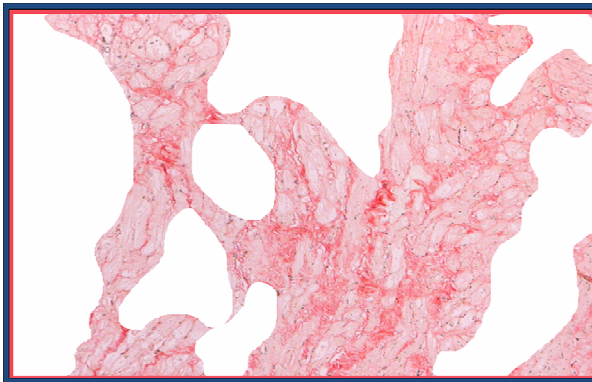
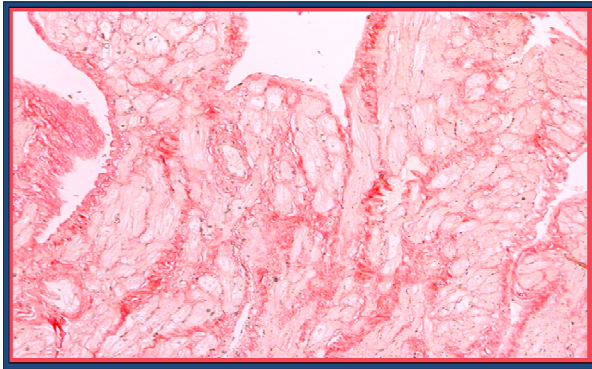


Abbildung 5.1:

Beispiel Re. Herzohr Patient Nr. 20

Oben:

Gewebefläche: (Myozyten + Kollagen + Gefäße + Endokard): 125692 μm^2

Kollagen: 38821,2 μm^2

Interstitielles Kollagen (Interstitielles Kollagen/Gewebefläche): 31%

Mitte:

Markierung und Entfernung von Endokardiale, perikardiale und perivaskuläre Kollagen-Gewebe

Unten:

Gewebefläche: (Myozyten + Kollagen ohne Gefäße und Endokard): 314350 μm^2

Kollagen: 50763 μm^2

Interstitielles Kollagen: (Interstitielles Kollagen/Gewebefläche): 16%

6. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Normalverteilte Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Im Fall von asymmetrischen Verteilungen sind der Median, das Minimum und das Maximum angegeben. Um die Unterschiede zwischen 2 Gruppen zu erkennen, wurde ein ungepaarter t-Test oder ein nicht parametrischer Test (Mann-Whitney U-Test) verwendet. Kategorische Variablen wurden mittels Fisher's exact Test verglichen. Die Assoziation zwischen klinischen Parametern oder Serum-Markern und atrialer Fibrose wurde mittels Spearman Korrelationsanalyse bewertet. Zur Identifizierung von Prädiktoren für interstitielles Kollagen des rechten Vorhofs wurde eine multivariable lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die Prädiktoren für post-operatives Vorhofflimmern wurden mittels unbedingter logistischer Regressionsanalyse identifiziert. Alle Analysen wurden mit SPSS Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

7 ERGEBNISSE

7.1 Klinische Charakteristika der Studienpatienten

18 von 28 Patienten (64%) waren männlich mit einem durchschnittlichen Alter von 65 Jahren. Die Operation am offenen Herzen war bei Patienten wegen koronarer Herzerkrankung (n = 16) und/oder Klappenerkrankungen (n = 15), Aortenstenose (n = 3) oder- insuffizienz (n = 3), Aortenaneurysma (n = 2) und Mitralinsuffizienz (n = 7) geplant. Eine detaillierte Beschreibung der Patientenmerkmale liefert in Tabelle 7.1. Bei den ersten 10 Patienten wurden LA Gewebeprobe (Aorto-Koronarer-Bypass n = 6 (60%), Klappenoperation n = 5 (50%)) gewonnen. 8 von 28 Patienten hatten eine linksventrikuläre EF $< 50\%$, bei den meisten Patienten war die systolische links ventrikuläre Funktion erhalten. Jedoch war der links-atriale Druck erhöht. Entsprechend waren die linken Vorhöfe dilatiert (Durchmesser $43,5 \pm 5,4$ mm). Die meisten Patienten bekamen einen ACE-Hemmer, einen β -Blocker und Statine (siehe Tabelle 7.1).

Parameter	Alle Patienten n = 28	Ohne post-operativem VHF n = 18	Mit post-operativem VHF n = 10	p-Wert
Alter (Jahre)	65,4±12,5	65,5±13,6	65,2±10,8	0,95
Anzahl der Männer	18 (64%)	14 (78%)	4 (40%)	0,10
Koronare-Bypass-OP	16 (57%)	11 (61%)	5 (50%)	0,70
Herzklappen-OP	15 (54%)	9 (50%)	6 (60%)	0,71
LV Ejektionsfraktion (%)	57,0±14,5	53,6±11,4	63,2±17,9	0,09
LVEDP (mmHg)	16,5±5,4	17,3±5,6	15,1±5,1	0,34
LA Durchmesser (mm)	43,5±5,4	43,5±5,9	43,5±4,9	1
LA interstitielles Kollagen (%)	6,1 (n = 10) (4,2-11,5)	8,0 (n = 6) (4,6-11,5)	5,0 (n = 4) (4,2-6,5)	0,11
RA interstitielles Kollagen (%)	5,6 (2,7-14,5)	7,1 (3,7-14,5)	4,4 (2,7-11,6)	0,04
ACE-I / ARB	18 (64%)	10 (56%)	8 (80%)	0,25
β-Blocker	17 (61%)	10 (55%)	7 (70%)	0,69
Statin	17 (61%)	10 (55%)	7 (70%)	0,69
NT-proBNP (pg/l)	252,7 (29,8-4747)	235,6 (29,8-2864)	299,1 (40,2-4747)	0,76
PINP (µg/l)	30,0±11,4	28,0±11,2	33,5±11,3	0,22
PIIINP (µg/l)	3,78±1,43	3,16±0,94	4,89±1,51	< 0,001

Tabelle 7.1:

Patientenmerkmale: Für kontinuierliche Variablen wird der Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Durch die nicht-normal Verteilung von atrialem Kollagen, NT-proBNP und ICTP Werten sind der Median, das Maximum und das Minimum angegeben. LV: linker Ventrikel, LA: linker Vorhof, LVEDP: linkes ventrikulärer enddiastolischer Druck, ACE-I: ACE-Hemmer, ARB: Angiotensinrezeptorblocker, RA: rechtes Vorhof. P-Werte wurden für den

Vergleich der Gruppe von Patienten mit vs. ohne die Entwicklung von postoperativem VHFli berechnet.

Um zu testen, ob die vordefinierten klinischen Parameter (Alter, LA-Durchmesser, linksventrikuläre EF, NT-proBNP) mit der Vorhof-Fibrose korrelieren, wurden diese Variablen gegen den individuellen atrialen Kollagengehalt aufgetragen. Alter, linker Vorhofdurchmesser, systolische links ventrikuläre Funktion und NT-proBNP korrelierten nicht signifikant mit atrialer Fibrose. (siehe Tabelle 7.2).

Korrelation	Interstitielles Kollagen			
	Linker Vorhof n = 10		Rechter Vorhof n = 28	
	r_s	p	r_s	p
Alter	0,52	0,12	-0,06	0,78
LA Durchmesser	0,32	0,48	-0,09	0,74
LV Ejektionsfraktion	-0,27	0,45	-0,14	0,47
NT-proBNP	0,54	0,11	-0,01	0,98

Tabelle 7.2:

Korrelationskoeffizienten (Spearman's rho: r_s) zwischen der linken bzw. rechten atrialen interstitiellen Kollagenfraktion und PINP, PIIINP, ICTP, Alter, LA Durchmesser, LV Ejektionsfraktion und NT-proBNP.

7.2 Interstitielle Vorhoffibrose

Der interstitielle Kollagengehalt des linken bzw. rechten Vorhofs war ähnlich und betrug 6,1% bzw. 5,6% ($p = 0,77$). (Siehe Abbildung 7.1 rechts)

Abbildung 7.1 links zeigt die positive intraindividuelle Korrelation zwischen dem linken und dem rechten Vorhof bezüglich des Kollagengehaltes.

($r_s = 0,79$, $p < 0,01$).

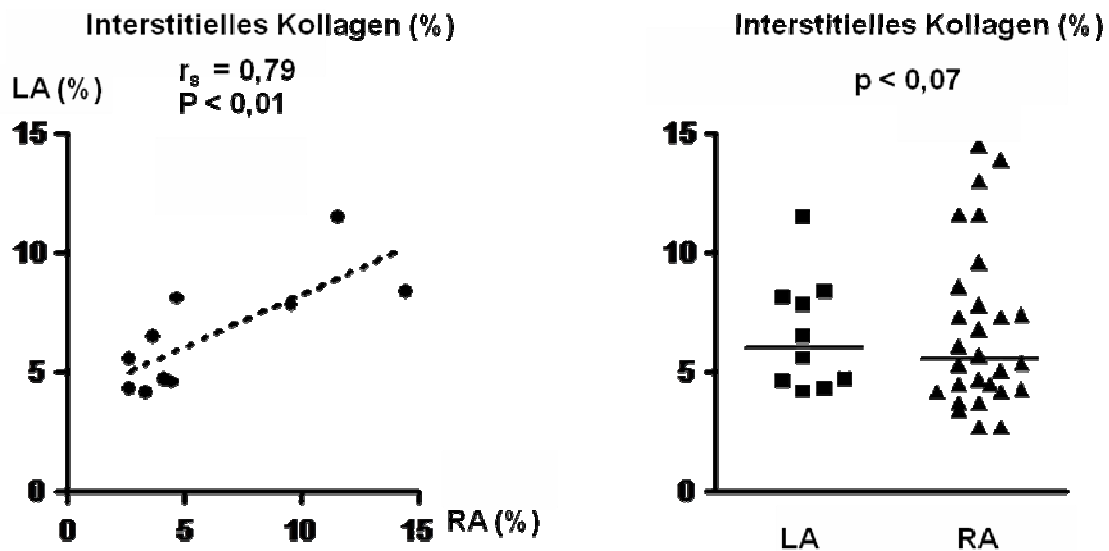
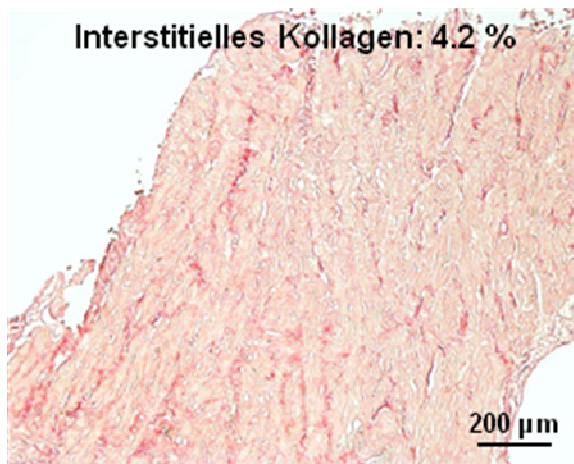
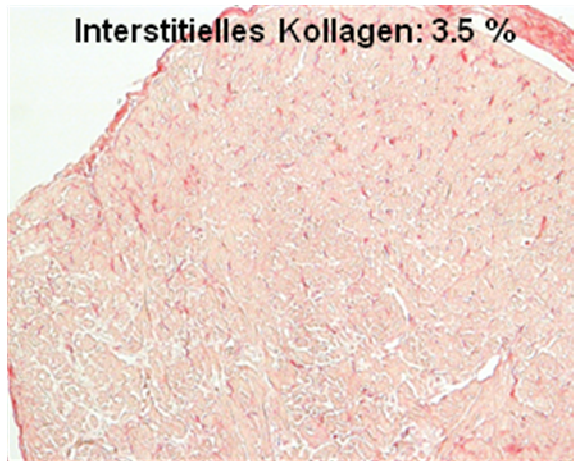


Abbildung 7.1

Interstitieller Kollagengehalt des linken (LA) und rechten (RA) Vorhofgewebes

Bei Patienten mit einem insgesamt eher niedrigen Grad der interstitiellen Fibrose innerhalb des gesamten Gewebeabschnitts stellten wir nur kleine Unterschiede zwischen den einzelnen Abschnitten (Gesichtsfelder) innerhalb der Probe fest (geringe räumliche Heterogenität). Im Gegensatz dazu wurden bei Patienten mit hohem Grad von interstitieller Fibrose größere Unterschiede zwischen den einzelnen Gesichtsfeldern gefunden (hohe räumliche Heterogenität, Abbildung 7.2).

Patient A



Patient B



Abbildung 7.2:

Mikrophotographien von Schnitten des rechten Vorhofs. Sirius-Rot wurde verwendet, um Kollagen darzustellen. *Links:* Beispiele von einem Patienten mit niedrigem interstitiellem Kollagengehalt. Dieser war in mehreren Gesichtsfeldern desselben Schnitts (oberes und unteres Feld) vergleichbar. *Rechts:* Beispiele von einem Patienten mit erhöhter Fibrose. Die Differenzen zwischen mehreren Gesichtsfeldern waren groß.

Der individuelle Mittelwert des Gehalts an interstitiellem Kollagen korrelierte eng mit der räumlichen Heterogenität der Fibrose innerhalb der Gewebeprobe.

Diese Korrelation wurde in beiden Vorhöfen gefunden (LA: $r_s = 0.88$, $p = 0.001$; RA: $r_s = 0.90$, $p < 0.001$; Abbildung 7.3)

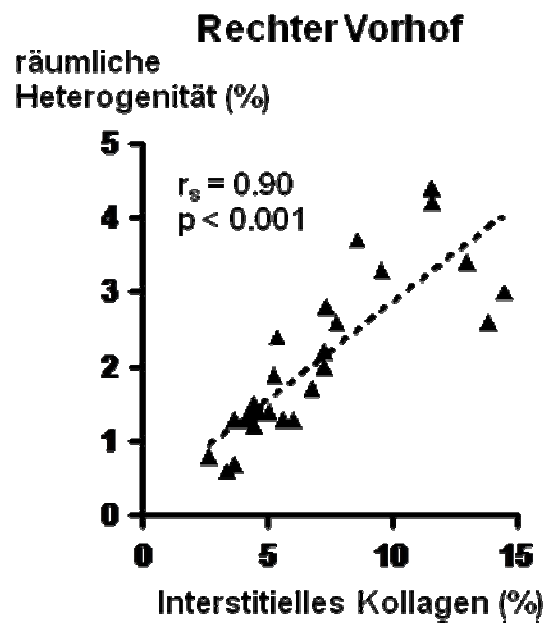
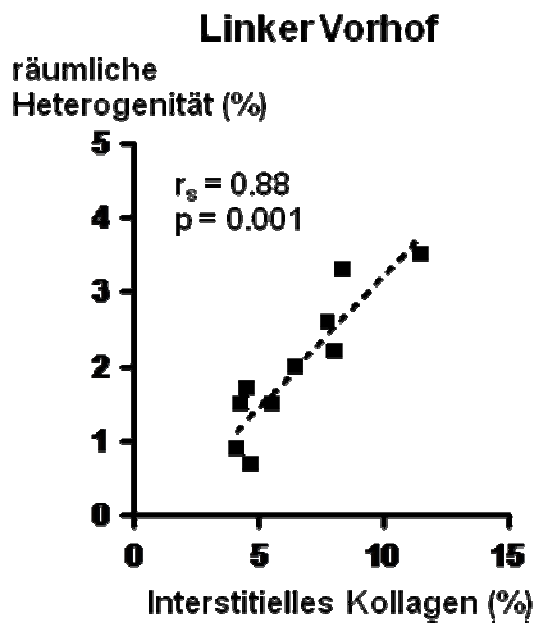


Abbildung 7.3:

Enge Korrelation zwischen dem relativen interstitiellen Kollageninhalt und seiner räumlichen Heterogenität im linken und rechten Vorhof.

7.3 Korrelation von PINP mit atrialer Fibrose

Um zu testen, ob Serum-Marker des Kollagengehaltes mit der Vorhof-Fibrose korrelieren, wurden diese Variablen graphisch gegen den individuellen atrialen Kollagengehalt aufgetragen. Es gab sowohl im linken als auch im rechten Vorhof eine negative Korrelation zwischen der Serumkonzentration von PINP und dem Grad der Fibrose ($r_s = -0.65$ and $r_s = -0.42$ bzw. $p < 0.05$). Eine niedrige PINP Konzentration im Serum korrelierte also mit einem interstitiellen Kollagengehalt. (LA: $r_s = -0.65$, $p = 0.04$; RA: $r_s = -0.42$, $p = 0.03$; siehe Abbildung 7.4).

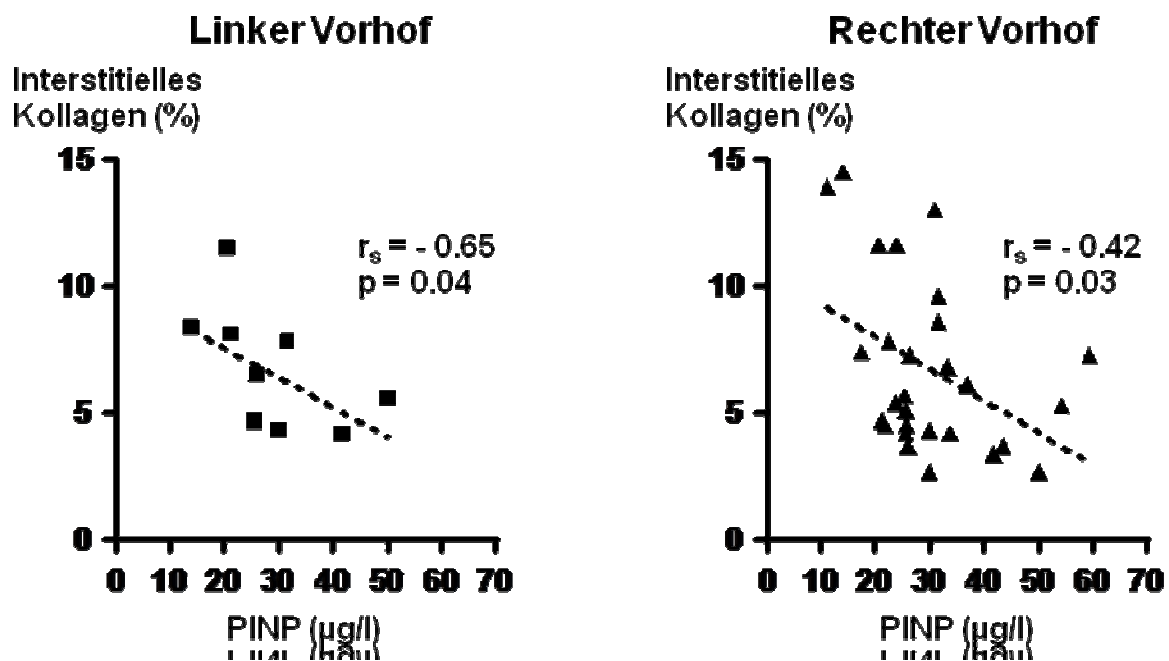


Abbildung 7.4

Negative Korrelation von PINP und dem relativen interstitiellen links- und rechts-atrialen Kollagengehalt.

7.4 Korrelation von PIIINP und ICTP mit Vorhoffibrose

Die Serumkonzentration von PIIINP war ein unabhängiger Prädiktor für die Entwicklung von VHF (odds ratio 5,6 pro µg/l höhere PIIINP Konzentration, $p < 0,05$), während ein höheres

Maß an atrialer Fibrose nicht im Zusammenhang mit dem Auftreten von postoperativem VHF stand.

Die Serumkonzentrationen von PIIINP und ICTP korrelierten nicht mit der interstitiellen Fibrose (LA: $r_s = 0.13$, $p = 0.73$ and $r_s = 0.06$, $p = 0.88$; RA: $r_s = -0.23$, $p = 0.24$ and $r_s = -0.17$, bzw. $p = 0.40$).

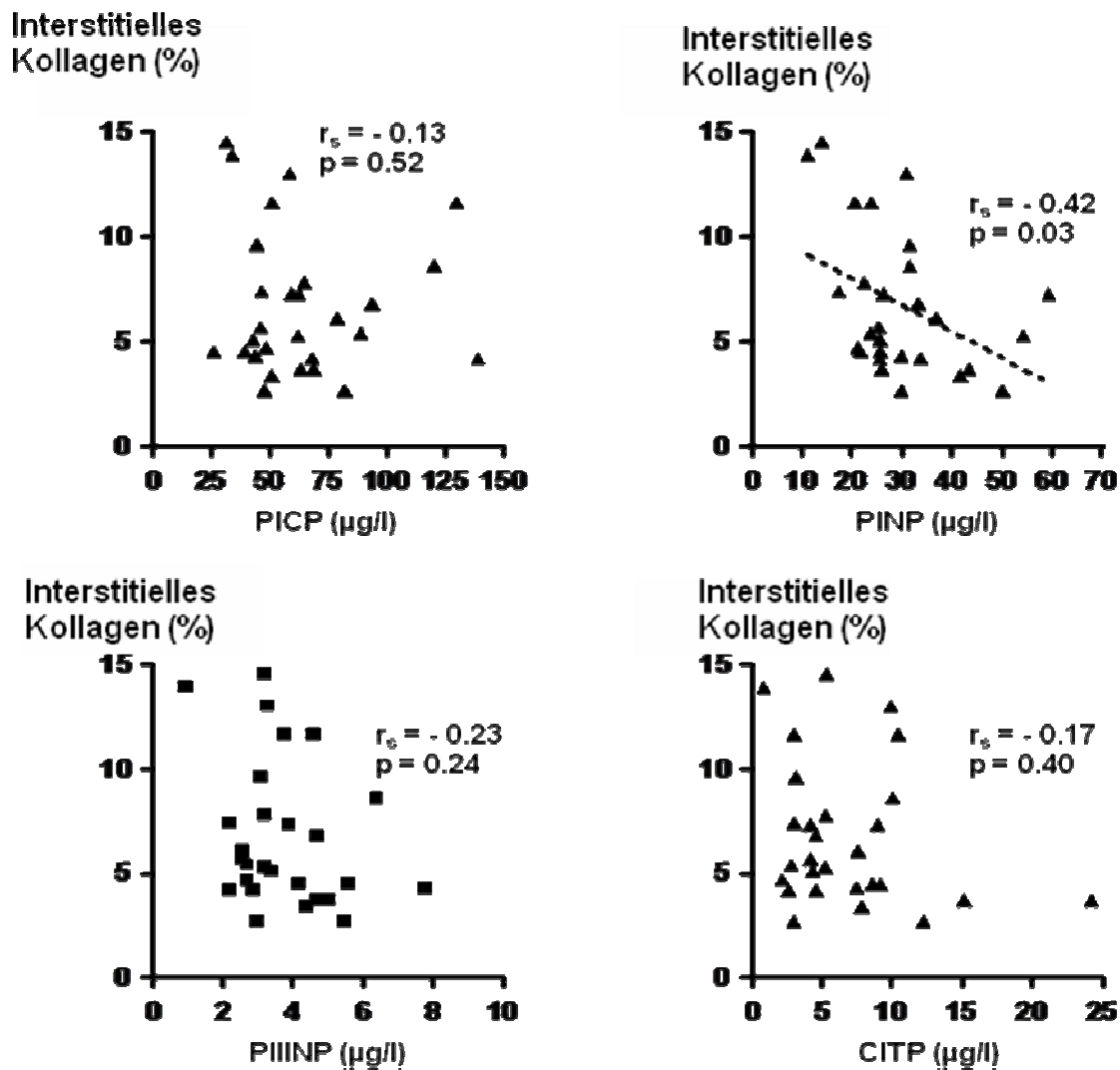


Abbildung 7.5:

Links oben: Keine Korrelation zwischen dem relativen interstitiellen Kollageninhalt und PICP im linken und rechten Vorhof. *Rechts oben:* Negative Korrelation von PINP und dem relativen interstitiellen links- und rechts-atrialen Kollagengehalt. *Links unten:* Keine Korrelation zwischen dem relativen interstitiellen Kollageninhalt und PIIINP im linken und rechten Vorhof. *Rechts unten:* Keine Korrelation zwischen dem relativen interstitiellen Kollageninhalt und CITP im linken und rechten Vorhof.

Eine multivariable lineare Regressionsanalyse wurde durchgeführt unter Verwendung von interstitiellem rechtem Vorhof-Kollagen als abhängiger Variable und PINP, PIIINP, ICTP, Alter, links-atrialem Durchmesser, EF und NT-proBNP (nach logarithmischer Transformation) als Prädiktoren. PINP blieb der einzige (unabhängige) Prädiktor für die rechts-atriale Fibrose ($p < 0,05$).

7.5 Post-operatives Vorhofflimmern

Vier von zehn Patienten (40%), bei denen links- und rechtsatriales Gewebe gewonnen wurde entwickelten VHFli innerhalb von 6 Tagen nach der Herzoperation. In der gesamten Gruppe ($n = 28$) entwickelten 10 Patienten VHFli (36%). Die meisten Basis-Parameter sind ähnlich, unabhängig davon, ob der Patient nach einer Herzoperation VHFli entwickelte oder nicht. Überraschenderweise war der interstitielle atriale Kollagengehalt niedriger bei Patienten, die VHFli entwickelten, wohingegen prä-operatives PIIINP bei diesen Patienten höher war.

Prä-operativ war PINP und ICTP bei beiden Gruppen nicht unterschiedlich. Um zu testen, ob atriales Kollagen oder die prä-operativen Serumkonzentrationen des PINP, PIIINP oder ICTP Hinweise auf ein AF-Risiko nach der OP geben, wurde die Studiengruppe jeweils unter Verwendung des Medians der Variablen, die von Interesse ist, zweigeteilt.

Bei Patienten mit relativ hohem rechts-atrialem Kollagengehalt (höher als der Median, i. e. $> 5,6\%$) war das relative Risiko (RR), ein Vorhofflimmern zu entwickeln, reduziert (RR = 0,25, 95% Konfidenzintervall (CI) 0,06-0,97, $p < 0,05$).

Andererseits stand eine relativ hohe prä-operative PIIINP Serumkonzentration ($> 3,4\mu\text{g/l}$) in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko von Vorhofflimmern (RR = 4,00, 95% CI 1,03-15,6, $p < 0,05$). Jedoch waren die prädiktiven Werte, die Sensitivität und die Spezifität dieser Parameter niedrig ($< 50\%$ für jeden Parameter). Hohe Konzentrationen von Serum-PINP und- ICTP ($> 26,15 \mu\text{g/l}$ oder bzw. $> 5,30 \mu\text{g/l}$) korrelierten nicht mit einem signifikant erhöhten Risiko, ein Vorhofflimmern zu entwickeln (RR = 1,5, 95% CI 0,5-4,2, $p = 0,69$ für beide Parameter). Unter Verwendung des rechts-atrialen interstitiellen Kollagengehalts, PINP, PIIINP und ICTP als unabhängigen Variablen in einer unbedingten logistischen Regressionsanalyse, blieb PIIINP der einzige statisch signifikante Prädiktor für die Entwicklung von Vorhofflimmern nach Herzoperation (odds ratio 5,6 (95% CI 1,2-25,4) pro $1\mu\text{g/l}$ Erhöhung der Serum PIIINP-Konzentration, $p < 0,05$).

8. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Serumkonzentration von PINP mit dem Grad der interstitiellen atrialen Fibrose negativ korreliert. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen der interstitiellen atrialen Fibrose und der Serumkonzentration von PIIINP, ICTP, dem Alter, dem linksatrialen Durchmesser, der linksventrikulären EF oder der Serumkonzentration von NT-proBNP. Die prä-operative Serumkonzentration von PIIINP sagte unabhängig das Auftreten von VHFli während der ersten 6 Tage nach der Herzoperation voraus. Ein erhöhter Grad atrialer Fibrose stand nicht in Zusammenhang mit dem Auftreten der Arrhythmie nach der Operation.

Atriale Fibrose ist assoziiert mit lokalen Erregungsleitungsstörungen und wird deshalb als ein Merkmal des arrhythmogenen strukturellen Umbaus des Gewebes betrachtet. Die Prävention und die Umkehrung des strukturellen atrialen Umbauprozesses durch nicht auf Ionen-Kanäle direkt einwirkende Medikamente ist von wachsendem Interesse für die Primär- und Sekundär-Prävention von VHFli.^{1;3;12}

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass es einen ähnlichen Grad an rechts- und linksatrialer interstitieller Fibrose bei Patienten mit einer relevanten strukturellen Herzerkrankung gibt. Das impliziert, dass systemische Faktoren wie eine neurohumorale Aktivierung eine wichtige Rolle in der Pathogenese einer atrialen Fibrose bei Patienten mit Herzerkrankungen spielen. Für die Perpetuierung von Reentry-Arrhythmien ist nicht nur die Menge des interstitiellen Kollagens relevant, sondern auch seine räumliche Heterogenität, weil diese zu einer räumlichen Heterogenität der Erregungsleitung führen kann. Interessanterweise wurden bei atrialen Gewebeproben mit einem hohen Grad von interstitieller Fibrose große Unterschiede zwischen den verschiedenen Regionen gefunden und umgekehrt. Folglich gab es eine enge Beziehung zwischen dem Grad der interstitiellen Fibrose und ihrer räumlichen Heterogenität in beiden Vorhöfen.

8.1 Mit atrialer Fibrose assoziierte Faktoren

Diese Arbeit beschreibt erstmals eine negative Korrelation zwischen der Serumkonzentration von PINP und dem interstitiellen Kollagengehalt bei Patienten ohne VHFli in der Anamnese, welche sich einer Herzoperation unterzogen. Dieser Zusammenhang wurde für den linken und

rechten Vorhof gefunden. Die Serum-Konzentration von PIIINP und ICTP korrelierte nicht signifikant mit atrialer Fibrose. In Abwesenheit von Niereninsuffizienz, Leberinsuffizienz oder metabolischen Osteopathien gelten die Serum-Konzentration von PINP, ICTP und PIIINP als Marker des kardialen und vaskulären Kollagenumsatzes. Ob sie in unmittelbarem Zusammenhang zur Herz-Fibrose stehen, ist weniger klar. Bei Patienten mit essentieller Hypertonie und erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion, wurde eine positive und mäßige Korrelation zwischen der Serumkonzentration von CACP und dem linksventrikulären Kollagengehalt beschrieben.⁸ Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, die einer Herztransplantation unterzogen wurden, wurde eine positive Korrelation zwischen der Serumkonzentration von PIIINP und ventrikulärem Kollagen gefunden.¹³ Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass diese Ergebnisse nicht direkt auf menschliche Vorhöfe übertragen werden können. Uusimaa et al. beschrieben, dass während ventrikulärer Narbenbildung innerhalb von 10 Tagen nach Herzinfarkt die Serum-Konzentration von PIIINP signifikant anstieg.⁹ Jedoch fanden Sie auch während des Zeitraums der ventrikulären Narbenbildung, dass die PINP-Konzentration im Serum tendenziell abnahm. Interessanterweise zeigten Timonen et al. bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, dass niedrigere PINP-Konzentrationen mit der Prävalenz von VHFli in Zusammenhang standen.¹⁴ Nach den hier vorgelegten Daten spiegeln niedrige PINP-Serum-Konzentrationen ein höheren Grad der atrialen Fibrose wider und können folglich in Zusammenhang mit dem Vorliegen eines Substrats für atriale Arrhythmien stehen. Wir fanden keine statistisch signifikante Korrelation zwischen atrialer Fibrose und Alter, linker Vorhofgröße, linksventrikulärer EF oder NT-proBNP im Serum. Das schließt solche Korrelationen nicht aus und steht im Widerspruch zu Ergebnissen einiger experimenteller Modelle. Jedoch hatten pathologische Veränderung in diesen Modellen eine einzige gemeinsame Ursache (z.B. schnelle Ventrikelstimulation), während in der Patientengruppe, die hier beschrieben wurde, mehrere Faktoren (z.B. schwere primäre Klappenvitien und koronare Herzkrankheit) wahrscheinlich einen kombinierten Effekt auf die atriale Struktur haben. Ohtani et al. fanden eine Korrelation zwischen linksventrikulärer EF und links atrialer Fibrose bei Patienten nach Herzinfarkt, aber nicht bei Patienten mit dilatativer oder hypertropher Kardiomyopathie.⁴ Folglich müssen klinische Variablen, die möglicherweise den atrialen Kollagengehalt beeinflussen, auf der Basis der zugrunde liegenden Erkrankung interpretiert werden.

8.2 Atriale Fibrose und das Auftreten von Vorhofflimmern

Perioperativer Stress ist einer der stärksten Auslöser für VHFli. Die Inzidenz nach Herzoperation betrug 36% in unserer Studie vergleichbar mit den Inzidenzen die zuvor berichtet wurden (20% bis 50%).^{15;16} Alter, Vorhofdilatation und eine reduzierte linksventrikuläre Funktion wurden als prädisponierende Risikofaktoren für das Auftreten von postoperativem VHFli identifiziert. Diese Arbeit untersuchte, ob diese Faktoren mit einem strukturellen Substrat für die Arrhythmie, das durch atriale Fibrose charakterisiert ist, assoziiert ist. Bemerkenswerterweise war ein hoher Grad atrialer Fibrose in dieser Studie nicht mit einem erhöhten Risiko verbunden, VHFli nach Herzoperationen zu entwickeln. Ganz im Gegenteil zeigte in der univariablen Analyse ein hoher Grad atrialer Fibrose sogar ein niedrigeres Risiko von postoperativem VHFli an. In der multivariablen Analyse war nur die prä-operative Serum-Konzentration von PIIINP unabhängig mit einem erhöhten Risiko für das post-operative Auftreten der Arrhythmie assoziiert. Da dies nicht im Zusammenhang mit einem höheren Maß an atrialer Fibrose stand, ist es fraglich, ob die Assoziation von PIIINP und VHFli einen pathophysiologischen Mechanismus widerspiegelt.

Mehrere Studien berichteten, dass erhöhte Serum-Konzentrationen von PIIINP ein erhöhtes Sterberisiko für Patienten mit Herzinsuffizienz anzeigen.^{13;17;18} Möglicherweise sind post-operatives VHFli sowie die Serum-Konzentration von PIIINP Marker für schwerer erkrankte Herzen und / oder Patienten, die schlechter die verschiedenen intraoperativen oder post-operativen Faktoren, wie akute Volumenänderungen, Hypotonie, Ischämie, Entzündung oder oxidativen Stress kompensieren können.

9. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Je geringer die Serum-Konzentration von PINP, desto höher ist der Grad der atrialen interstitiellen Fibrose. Serum PIIINP sagt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von VHFli nach Herzoperationen vorher. Die Serum-Konzentration von Markern des Kollagenumsatzes können verwendet werden, um das Risiko der Entwicklung von VHFli in bestimmten Patientengruppen abzuschätzen.

10. LIMITATIONEN

Die Daten wurden bei Patienten erhoben, die sich einer Herzoperation unterzogen. Deshalb sind Rückschlüsse auf andere Patientengruppen nur eingeschränkt möglich. Jedoch legen unsere Ergebnisse nahe, dass bei Patienten mit struktureller Herzerkrankung Serum-Marker des Kollagenumsatzes in Beziehung zu atrialer Fibrose (PINP) und dem Auftreten von postoperativem VHFli (PIIINP) stehen. In Anbetracht der mäßigen Korrelationen, die andere und wir gefunden haben, und in Anbetracht der zahlreichen möglichen Quellen für Serum-Marker des Kollagenumsatzes, können diese auf kardiale oder sogar atriale Fibrose hinweisen, aber diese nicht direkt widerspiegeln. Eine Atriotomie während der Herzoperation induziert die atriale Narbenbildung, und die Perikardiotomie kann eine entzündliche Reaktion verursachen, die die Kollagensynthese induziert. Deswegen können unsere histologischen Befunde möglicherweise nicht der atriale Histologie zum Zeitpunkt des Auftretens von postoperativem VHFli entsprechen. Nach den hier vorgelegten Daten könnten auch andere Faktoren als Fibrose, wie z.B. Katecholamin-Wirkung in der akuten Stresssituation, signifikant zum Auftreten von postoperativem VHFli beitragen. Dies könnte Gegenstand weiterer klinischer Untersuchungen sein.

11. LITERATURVERZEICHNIS

1. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:802-9
2. Anyukhovskiy EP, Sosunov EA, Chandra P et al. Age-associated changes in electrophysiologic remodeling: a potential contributor to initiation of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2005; 66:353-63
3. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999; 100:87-95
4. Ohtani K, Yutani C, Nagata S, Koretsune Y, Hori M, Kamada T. High prevalence of atrial fibrosis in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:1162-9
5. Verheule S, Wilson E, Everett T, Shanbhag S, Golden C, Olgin J. Alterations in atrial electrophysiology and tissue structure in a canine model of chronic atrial dilatation due to mitral regurgitation. *Circulation* 2003; 107:2615-22
6. Neuberger HR, Schotten U, Verheule S et al. Development of a substrate of atrial fibrillation during chronic atrioventricular block in the goat. *Circulation* 2005; 111:30-7
7. Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R, Diez J. The use of collagen-derived serum peptides for the clinical assessment of hypertensive heart disease. *J Hypertens* 2005; 23:1445-51
8. Querejeta R, Varo N, Lopez B et al. Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation* 2000; 101:1729-35
9. Uusimaa P, Risteli J, Niemela M et al. Collagen scar formation after acute myocardial infarction: relationships to infarct size, left ventricular function, and coronary artery patency. *Circulation* 1997; 96:2565-72
10. Risteli J, Elomaa I, Niemi S, Novamo A, Risteli L. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clin Chem* 1993; 39:635-40
11. Neuberger HR, Schotten U, Blaauw Y et al. Chronic atrial dilation, electrical remodeling, and atrial fibrillation in the goat. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:644-53
12. Neuberger HR, Mewis C, Van Veldhuisen DJ et al. Management of atrial fibrillation in patients with heart failure. *Eur Heart J* 2007; 28:2568-77
13. Klappacher G, Franzen P, Haab D et al. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995; 75:913-8
14. Timonen P, Magga J, Risteli J et al. Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodeling in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008; 124:293-300
15. Echahidi N, Pibarot P, O'Hara G, Mathieu P. Mechanisms, prevention, and treatment of atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:793-801

16. Jung W, Meyerfeldt U, Birkemeyer R. Atrial arrhythmias after cardiac surgery in patients with diabetes mellitus. *Clin Res Cardiol* 2006; 95 Suppl 1:i88-i97
17. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000; 102:2700-6
18. Modena MG, Molinari R, Rossi R et al. Modification in serum concentrations of aminoterminal propeptide of type III procollagen in patients with previous transmural myocardial infarction. *Am Heart J* 1998; 135:287-92
19. Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation. The Framingham study. *N Engl J Med* 1982; 306:1018-1022
20. Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM. Coronary heart disease and atrial fibrillation: The Framingham study. *Am Heart J* 1983; 106:389-396
21. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population- based estimates. *Am J Cardiol* 1998; 82:2N-9N
22. Bolt A. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease, *Heart* 2004; 90:400-405
23. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med* 1995; 155:469-473
24. Sack S. Epidemiologie des Vorhofflimmerns. *Herz* 2002; 27:294-300
25. Aus www.Kompetenznetz-Vorhofflimmern.de
26. Akar FG, Nass RD, Hahn S, Cingolani E, Shah M, Hesketh GG, Di Silvestre D, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. Dynamic changes in conduction velocity and gap Junction properties during development of pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293:H1223-H1230
27. Almassi GH, Schowalter T, Nieves AC, Aggerwal A, Moritz TE, Henderson WG, Tarazi R, Shroger AL, Sethi GK, Grover FL, Hammermeister KE. Atrial fibrillation after cardiac surgery: a major morbid event? *Ann Surg* 1997; 226:501-511
28. Camm AJ. Electrophysiology, pacing and Arrhythmia. *Clin Cardiol* 1997; 20:640-650
29. Jung J, Böhm M. Vorhofflimmern-Diagnostik. *Dtsch med Wschr* 2001; 126: 1469-1471
30. Cuddy TE. Chronic and paroxysmal atrial fibrillation: course, prognosis, and stroke risk. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 1999; 7(1): 7-11
31. Godtfresen J. Atrial fibrillation: Etiology, course and prognosis, a follow up study of 1212 cases. *Doctor of medicine thesis, University of Copenhagen, Munksgaard* 1975

32. Ezekowitz M. Clinical spectrum of atrial fibrillation: epidemiology, pathophysiology and natural history of atrial fibrillation. *ACC Current Journal Review* September/Oktober 1997;45-46
33. Kopecky SL. Idiopathic atrial fibrillation: Prevalence, course, treatment, and prognosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 1999; 7: 27-31
34. Moe GK, Rheinboldt WC, Abidskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964; 67: 200-220
35. De senac B. Traite de la structure du coeur, de son action et de ses maladies, Paris, Jaques vincent, 1749
36. Fazekas T, liszakai G, Bielik H, lüderitz B: History of atrial fibrillation, *Z kardiol* Feb 2003; 92(2):122-7
37. Cushny A, Edmunds R. Paroxysmal irregularity oft heart and auricular fibrillation. *Am J Med Sci* 1907; 133:67-77
38. Rothberger C, Winterberg JH. Vorhofflimmern und Arrhythmia Perpetua. *Wien Klein Wochenschr* 1909; 22:839-44
39. Gallagher MM, Camm J, Classification of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 1998; 82:18N-28N
40. Metra-PICP. Ein Enzym-Immunoassay zur quantitative Bestimmung von C-terminalem Propeptid in Typ I Kollagen (PICP) in Serum
41. Tähtelä R, Thölix E. Serum concentrations of type I collagen carboxyterminal telopeptide (ICTP) and type I procollagen carboxy- and aminoterminal propeptides (PICP, PINP) as marker of metastatic bone disease in breast cancer. *Anticancer Res* 1996; 16(4B):2289-93
42. Dobrev D, Ravens U. Remodelling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2003; 98:137-48
43. Moller S, Hansen M, Hillingsø J, Jensen J, Henriksen J. Elevated carboxy terminal cross linked telopeptide of typ I collagen in alcoholic cirrhosis: relation to liver and kidney function and bone metabolism. *Gut* 1999; 44:417-423
44. Tsai CF et al. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the superior vena cava: electrophysiological characteristics and results of radiofrequency ablation. *Circulation* 2000; 102:1640-6
45. Yeh HI, Lai YJ, Lee SH, Lee YN, Ko YS, Chen SA, Severs NJ, Tsai CH. Heterogeneity of myocardial sleeve morphology and gap junctions in canine superior vena cava. *Circulation* 2001; 104:3152-3157
46. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah MD, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998; 339:659-666

47. Kumagai K, Ogawa M, Noguchi H, Yasuda T, Nakashima H, Saku K. Electrophysiologic properties of pulmonary veins assessed using a multielectrode basket catheter. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:2281-2289
48. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002; 415(6868):219-26
49. Hennersdorf MG, Perings C, Kelm M, Strauer BE. Vorhofflimmern. *Der Internist* 2001; 42(12):1631-40
50. Nattel S, Opie LH. Controversies in atrial fibrillation. *Lancet* 2006; 367:262-72
51. Beyerbach DM, Zipes DP. Mortality as an endpoint in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2004; 1:8-18
52. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation (a study in awake chronically instrumented goats). *Circulation* 1995; 92:1954-1968
53. Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; 54:230-246
54. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999; 100:87-95
55. Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Rivard L. Mechanism of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis* 2005; 48:9-28
56. Löffler-Petrides: Biochemie & Pathobiochemie. Auflage 7
57. Horiguchi T, Tachikawa S, Kondo R, Hirose M, Teruya S, Ishibashi A, Banno K. Usefulness of serum carboxy-terminal telopeptide of typ I collagen (ICTP) as a marker of bone metastasis from lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2000; 30(4):174-179
58. Sinno H, Derakhchan K, Libersan D, Merhi Y, Leung TK, Nattel S. Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 2003; 107:1930-1936
59. Orion Diagnostica, UNIQ - ICTP EIA. C-terminal telopeptide of type I collagen Enzymeimmunoassay Kit, Cat. No. 05892
60. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. On behalf of an international forum on cardiac remodeling. Cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:569-82
61. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev* 2000; 5:271-280
62. Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C, Rappaport L. The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart Fail Rev* 2000; 5:239-250
63. Colucci WS. In vivo studies of myocardial beta-adrenergic receptor pharmacology in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1990; 82:44-51

64. Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung TK, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and -independent pathways. *Cardiovasc Res* 2003; 60:315–325
65. Bing OH, Ngo HQ, Humphries DE et al. Localization of alpha1(I) collagen mRNA in myocardium from the spontaneously hypertensive rat during the transition from compensated hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:2335–2344
66. Xu J, Cui G, Esmailian F, Plunkett M, Marelli D, Ardehali A, Odim J, Laks H, Sen L. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* 2004; 109:363–368
67. Grammer JB, Bohm J, Dufour A, Benz M, Lange R, Bauernschmitt R. Atrial fibrosis in heart surgery patients decreased collagen III/I ratio in postoperative atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2005; 100:288–294.
68. Rossi MA. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J Hypertens* 1998; 16:1031–1041
69. Nakai T, Chandy J, Nakai K, Bellows WH, Flachsbart K, Lee RJ, Leung JM. Histologic Assessment of right atrial appendage myocardium in patients with atrial fibrillation after coronary artery bypass graft surgery. *Cardiology* 2007; 108:90-96
70. López SB, Ravassa AS, Arias GT, González MA, Querejeta R, Diez MJ. Altered fibrillar collagen metabolism in hypertensive heart failure. Current understanding and future prospect. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59:1047-1057
71. Battle M, Pérez-Villa F, Lázaro A, Garcia-Pras E, Ramirez J, Ortiz J, Orús J, Roqué M, Heras M, Roig E. Correlation between mast cell density and myocardial fibrosis in congestive heart failure patients. *Transplantation Proceedings* 2007; 39:2347-2349
72. Li P, Wang D, Lucas J, Oparil S, Xing D, Cao X, Novak L, Renfrow MB, Chen YF, Atrial natriuretic inhibits transforming growth factor β -induced smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblast. *Circ Res* 2008; 102:185-192
73. Ming H, Yu S, Ke P. Fibrosis of collagen I and remodelling of connexin 43 in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Cardiology* 2007; 107:248-253
74. Burkhard J, Böhm J, Dufour A, Benz M, Lange R, Bauerschmitt R. Atrial fibrosis in heart surgery patients. *Basic Res Cardiol* 2005; 100:288-294
75. Saba S, Janczewski A, Baker L, Shusterman V, Gursoy E, Feldman A, Salama G, McTiernan C, London B. Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H1456-H1467
76. Tang M, Zhang S, Sun Q, Huang C. Alterations in electrophysiology and tissue structure of the left atrial posterior wall in a canine model of atrial fibrillation caused by chronic atrial dilatation. *Circ J* 2007; 71:1636-1642
77. Jung J, Böhm M. Vorhofflimmern- Therapie. *Dtsch med Wschr* 2001; 126:1472-1475

78. Kagiya S, Matsumura K, Fukuhara M, Sakagami K, Fujii K, Lida M. Aldosterone-and-salt-induced cardiac fibrosis is independent from angiotensin II type 1a receptor signaling in mice. *Hypertens Res* 2007; 30(10):979-989
79. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodelling and atrial fibrillation: mechanism and implications. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2008; 1:62-73
80. Neuberger HR, The effects of chronic atrial dilatation on atrial electrophysiology and contractility.
81. Freeman GL, LeWinter MM. Pericardial adaptations during chronic cardiac dilatation in dogs. *Circ Res* 1984; 54:294-300
82. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003; 65:45-79
83. Thomas L, Levett K, Boyd A, Leung DY, Schiller NB, Ross DL. Compensatory changes in atrial volumes with normal aging: is atrial enlargement inevitable?. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:1630-1635
84. Khankirawatana B, Khankirawatana S, Porter T. How should left atrial size be reported? Comparative assessment with use of multiple echocardiographic methods. *Am Heart J* 2004; 147:369-374
85. Chugh SS, Blackshear JL, Shen WK, Hammill SC, Gersh BJ. Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:371-378
86. Tsang TS, Petty GW, Barnes ME, O'Fallon WM, Bailey KR, Wiebers DO, Sicks JD, Christianson TJ, Seward JB, Gersh BJ. The prevalence of atrial fibrillation in incident stroke cases and matched population controls in Rochester, Minnesota: changes over three decades. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:93-100
87. Pötzsch O, Sommer B. Bevölkerung Deutschlands bis 2050. 2003. Wiesbaden, *Statistisches Bundesamt*.
88. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001; 103:769-777
89. Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Kronmal RA, Cushman M, Fried LP, White R, Furberg CD, Rautaharju PM. Incidence of and risk factors for atrial fibrillation in older adults. *Circulation* 1997; 96:2455-2461
90. Vasan RS, Larson MG, Levy D, Evans JC, Benjamin EJ. Distribution and categorization of echocardiographic measurements in relation to reference limits: the Framingham Heart Study: formulation of a height- and sex-specific classification and its prospective validation. *Circulation* 1997; 96:1863-1873
91. Vaziri SM, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1994; 89:724-730

92. Ferrari R. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J Cardiovasc Pharm* 1996; 28:S1-S19
93. Engelmann TW. Über den Einfluss der Systole auf die motorische Leitung in der Herzkammer, mit Bemerkungen zur Theorien allorhythmischer Herzstörungen. *Archiv für die gesamte Physiologie* 1896; 62:543-566
94. Lewis T, Schleiter HG. The relation of regular tachycardias of auricular origin to auricular fibrillation. *Heart* 1912; 3:173-193
95. Haissaguerre M, Marcus FI, Fischer B, Clementy J. Radiofrequency catheter ablation in unusual mechanisms of atrial fibrillation: report of three cases. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994; 5:743-751
96. Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Visioli O. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19(Suppl. B):B2-11
97. Oral H, Knight BP, Ozaydin M, Chugh A, Lai SW, Scharf C, Hassan S, Greenstein R, Han JD, Pelosi FJ, Strickberger SA, Morady F. Segmental ostial ablation to isolate the pulmonary veins during atrial fibrillation: feasibility and mechanistic insights. *Circulation* 2002; 106:1256-1262
98. Todd DM, Skanes AC, Guiraudon C, Krahn AD, Yee R, Klein GJ. Role of the posterior left atrium and pulmonary veins in human lone atrial fibrillation: electrophysiological and pathological data from patients undergoing atrial fibrillation surgery. *Circulation* 2003; 108:3108-3114
99. Mayer AG. Rhythmical pulsation in scyphomedusae. Washington DC, *Carnegie Institute of Washington* 1906; 47:1-62
100. Mines GR. On dynamic equilibrium in the heart. *Journal of Physiology* 1913; 46:349-383
101. Garrey WE. The nature of fibrillary contraction of the heart: its relation to tissue mass and form. *Am J Physiol* 1914; 33:397-414
102. Lewis T, Feil HS, Stroud WD, Lewis T, Feil HS, Stroud WD. Observations upon flutter and fibrillation. II. The nature of auricular flutter. *Heart* 1920; 7:191-233
103. Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM et al. Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. In: Zipes DP, Jalife J, editors. *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. NY: Grune & Stratton, 1985; 265-275
104. Konings KT, Kirchhof CJ, Smeets JR, Wellens HJ, Penn OC, Allessie MA. High-density mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation* 1994; 89:1665-1680
105. Fuster V, Ryden LE, Asinger RW, Cannom DS, Crijns HJ, Frye RL, Halperin JL, Kay GN, Klein WW, Levy S, McNamara RL, Prystowsky EN, Wann LS, Wyse DG, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK, Russell RO, Smith SCJ, Alonso-Garcia A, Blomstrom-Lundqvist C, de Backer G, Flather M, Hradec J, Oto A, Parkhomenko A, Silber S, Torbicki A. ACC/AHA/ESC

- Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation. *Circulation* 2001; 104:2118-2150
106. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera C, Albertini A, Visioli O. Intracellular effects of myocardial ischemia and reperfusion: role of calcium and oxygen. *Eur Heart J* 1986; 7:A3-A12
 107. Cameron A, Schwartz MJ, Kronmal RA, Kosinski AS. Prevalence and significance of atrial fibrillation in coronary artery disease (CASS registry). *Am J Cardiol* 1988; 61:714-717
 108. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death. The Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 98:946-952
 109. Shinbane MD, Wood MD, Jensen DVM, Ellenbogen MD. Tachycardia induced cardiomyopathy: A review of animal models and clinical studies. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:709-715
 110. Kasper EK, Agema WR, Hutchins GM, Deckers JW, Hare JM, Baughman KL. The causes of dilated cardiomyopathy: a clinicopathologic review of 673 consecutive patients. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:586-590
 111. Levy S, Maarek M, Coumel P, Guize L, Lekieffre J, Medvedowsky JL, Sebaoun A. Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The college of french cardiologists. *Circulation* 1999; 99:3028-3035
 112. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991; 22:983-988
 113. Petersen P, Godtfredsen J. Embolic complications in paroxysmal atrial fibrillation. *Stroke* 1986; 17:622-626
 114. Petty GW, Brown RD, Jr., Whisnant JP, Sicks JD, O AEFallon WM, Wiebers DO. Ischemic stroke subtypes: A population-based study of incidence and risk factors. *Stroke* 1999; 30:2513-2516
 115. Manning WJ, Leeman DE, Gotch PJ, Come PC. Pulsed doppler evaluation of atrial mechanical function after electrical cardioversion of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:617-623
 116. Manning WJ, Silverman DI, Katz SE, Riley MF, Come PC, Doherty RM, Munson JT, Douglas PS. Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1535-1540
 117. Schotten U, Duytschaever M, Ausma J, Eijsbouts S, Neuberger HR, Allessie M. Electrical and contractile remodelling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation* 2003; 107:1433-1439
 118. Hering HE. Das Elektrokardiogramm des irregularis perpetuus. *Deutsches Archiv für Klinische Medizin* 1908; 94:205-208

119. Hering HE. Analyse des pulsus irregularis perpetuus. *Prager Medizinische Wochenschrift* 1903; 28:377-381
120. Guidelines for the management of atrial fibrillation; developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA). *European Heart Journal*.doi:10.1093/eurheartj/ehq278
121. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol. Today* 1993; 44: 126-129
122. Anversa P, Kajstura J. Myocyte cell death in the diseased heart. *Circ Res* 1998; 82:1231-1233
123. Orion Diagnostica Oy P.O. Box 83. Textanleitung: Intaktes N-terminales Propeptid von Typ I Prokollagen Radioimmunoassay Kit. Finnland 2005; Artikel-Nr. 67034
124. Orion Diagnostica Oy P.O. Box 83. Textanleitung: Intaktes N-terminales Propeptid von Typ III Prokollagen Radioimmunoassay Kit. Finnland 2005; Artikel-Nr. 68570
125. Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP, Seward JB, Tsang TS. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 2006; 114:119–125.
126. Alexander G.G. Turpie. New oral anticoagulants in atrial fibrillation. *European Heart Journal* 2008; 29(2):155-165
127. Eleftherios M, Kallergis MD, Emmanuel G, Manios MD, Emmanuel M Kanoupakis MD, Hercules E, Mavrakis MD, Dimitris A, Arfanakis MD, Niki E, Maliaraki MD, Chrisovalantis E, Lathourakis MD, Gregory I, Chlouverakis PhD, Panos E, Vardas MD. Extracellular matrix alterations in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation biochemical assessment of collagen type-I. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:211-215
128. González A, López B, Ravassa S, Beaumont J, Arias T, Hermida N, Zudaire A, Díez J. Biochemical markers of myocardial remodelling in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res* 2009; 81:509-518
129. López B, Querejeta R, Varo A, Larman M, Martínez Ubago JL et al. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of prokollagen typ I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104:286-291
130. López B, González A, Beaumont J, Querejeta R, Larman M, Díez J. Identification of a potential cardiac antifibrotic mechanism of torasemide in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:859-867
131. N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid 03121640 122, Immun-PPE2-proBNP-MET-081 V-3: Methoden-SOP.

12. PUBLIKATIONEN

1. Neuberger HR, Cacciatore A, Reil JC, Gräber S, Schäfers HJ, Böhm M, Mewis C. Procollagen propeptides: Markers for atrial fibrosis? *Clin Res Cardiol* 2012; [DOI: 10.1007/s00392-012-0440-6]
2. Neuberger HR, Cacciatore A, Reil JC, Schäfers HJ, Böhm M, Mewis C. Procollagen Type I Propeptide: A Serum Marker for Atrial Fibrosis? *Heart Rhythm* 2009; Boston, (PO06-54)
3. Neuberger HR, Cacciatore A, Reil JC, Schäfers HJ, Böhm M, Mewis C. Prokollagen Typ I-Propeptid: Ein Serum-Marker für Vorhof-Fibrose? Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Frühjahrstagung 2009, Mannheim. *Clin Res Cardiol* 98; Suppl 1 (2009)