

Nachweis von Autoantikörpern gegen kardiale β 1-Rezeptoren im
Serum von gesunden und an Dilatativer Kardiomyopathie
erkrankten Dobermann Pinschern

von Anna Kaja Fritscher

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Nachweis von Autoantikörpern gegen kardiale β_1 -Rezeptoren im
Serum von gesunden und an Dilatativer Kardiomyopathie
erkrankten Dobermann Pinschern

von Anna Kaja Fritscher
aus Schwäbisch Hall

München 2017

AUS DEM ZENTRUM FÜR KLINISCHE TIERMEDIZIN

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Gerhard Wess

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wess

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K Straubinger

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

AUS DEM ZENTRUM FÜR KLINISCHE TIERMEDIZIN

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann Pinscher	2
1.1.	Allgemeines zu Signalement und Prävalenz	2
1.2.	Ätiologie.....	2
1.3.	Verlauf, Stadien, Symptome und Klinik	6
1.4.	Diagnostik	8
1.4.1.	Allgemeine und spezielle kardiovaskuläre Untersuchung	8
1.4.2.	Echokardiographie	9
1.4.3.	Elektrokardiographie	10
1.4.4.	Röntgen	11
1.4.5.	Biomarker.....	12
1.5.	Therapie.....	13
1.6.	Prognose	16
2.	Autoantikörper gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren	17
2.1.	Allgemeines zu Autoimmunerkrankungen und Autoantikörpern	17
2.2.	Ätiologie und Prävalenz der humanen idiopathischen DCM.....	18
2.3.	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs).....	19
2.4.	Autoantikörper gegen β 1-Rezeptoren	23
2.4.1.	Ätiologie.....	23
2.4.2.	Pathogenese der durch AAK gegen β 1-Rezeptoren ausgelösten DCM	24
2.4.3.	Klinische Bedeutung der AAK gegen β 1-Rezeptoren beim Menschen	25
2.4.4.	Diagnostische Möglichkeiten	25
2.4.5.	Therapieoptionen.....	27
III.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Patientenauswahl.....	29
1.1.	Vorbemerkungen	29
1.2.	Einschlusskriterien	29

1.3.	Fragestellungen und Gruppeneinteilung	30
1.4.	Ausschlusskriterien	34
2.	Kardiologische Untersuchung.....	34
2.1.	Vorbemerkungen	34
2.2.	Signalement und Anamnese	34
2.3.	Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung.....	34
2.4.	EKG (Kurzzeit- und Langzeit EKG).....	35
2.5.	Echokardiographie	36
2.6.	Blutprobenentnahme, Verarbeitung und Lagerung	37
3.	Messung der Autoantikörper mittels Kardiomyozyten-Kontraktions-	
	Assay (Bioassay)	37
3.1.	Vorbemerkungen	37
3.2.	Zellpräparation und Kultivierung der Kardiomyozyten.....	38
3.3.	IgG Präparation der Serumproben.....	39
3.4.	Durchführung der Messung.....	41
3.5.	Nachbehandlung der Kardiomyozyten.....	43
3.6.	Auswertung der Messergebnisse	43
4.	Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien.....	44
5.	Statistische Auswertung.....	47
IV.	ERGEBNISSE	48
1.	Zusammenfassung der Studienpopulation	48
2.	Ergebnisse nach Gruppen	52
2.1.	Ergebnisse der Gruppe „DoCM“	52
2.2.	Ergebnisse der Gruppe „Initial-gesund“ und der Kontrollgruppe.....	54
2.3.	Ergebnisse der Verlaufsgruppe	54
3.	Ergebnisse der Regressionsanalyse.....	56
3.1.1.	Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Gesamtpopulation.....	56
3.1.2.	Ergebnisse der binären logistischen Regressionsanalyse der Gesamtpopulation	56
3.1.3.	Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse zum Risiko	57
V.	DISKUSSION	58

VI.	ZUSAMMENFASSUNG	68
VII.	SUMMARY.....	70
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
IX.	DANKSAGUNG	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAK	Autoantikörper
ACE-Inhibitor	Inhibitor des Angiotension konvertierendes Enzyms (Angiotension-Converting-Enzyme-Inhibitor)
Ao	Aorta
AS	Ammoniumsulfat
bpm	Schläge pro Minute (beats per minute)
BSA	Körperoberfläche (body surface area)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosinmonophosphate)
CCA	Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay (Cardiomyocyte Contraction Assay)
CHF	Kongestives Herzversagen (Congestive Heart Failure)
CI	Konfidenzintervall (Confidenzintervall)
cTnI	kardiales Troponin I (cardiac troponin I)
cw-Doppler	Spektraldoppler CW-Typ (continuous-wave-Doppler)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie (Dilated Cardiomyopathy)
DoCM	Dobermann Kardiomyopathie (Doberman Cardiomyopathy)
DP	Dobermann Pinscher
Echo	Herzultraschalluntersuchung, Echokardiographie
EF	Auswurfraction (ejection fraction)
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	Enzymatisch verbundenes Immunadsorptionsverfahren zum Antigennachweis (Enzym-linked Immunosorbent Assay)
EPSS	E-Point to Septal Separation
FR	maximale Schlag-zu-Schlag-Frequenz (fastest rate)
FRET	Floureszenz- Resonanz-Energie-Transfer
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-Protein-couplet receptors)
Holter-EKG	Langzeit-EKG
IA	Immunadsorption
IgA, IgG, IgM	Immunglobulin des Typ A, G oder M
KFZ	Kapilläre Füllungszeit
LA	Linkes Atrium
LA/Ao	Das Verhältnis von linkes Atrium zur Aorta
LVIDd	Innerer Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole (left ventricular inner diameter in diastole)

LVIDs	Innerer Durchmesser des linken Ventrikels in der Systole (left ventricular inner diameter in systole)
M-Mode	Motion Mode
NaCl	Natriumchlorid
NCS	Serum von neugeborenen Kälbern (New Born Calf Serum)
NT-proBNP	Natriuretisches Peptid des Typ B
OR	Odds Ratio
PBS	Pufferlösung (Phosphate Buffered Saline)
PDK 4	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4
pw-Doppler	Spektraldoppler PW-Typ (pulsed-wave-Doppler)
RAAS	Renin-Angiotension-Aldosteron-System
SD	Plötzlicher Herztod, Sekudentod (sudden death)
SMOD	Simpsons-Scheibchen-Summationsmethode (Simpson´s method of discs)
SMOD/BSA	Simpsons-Scheibchen-Summationsmethode normalisiert auf die Körperoberfläche (Simpson´s method of disc to body surface area)
SMODd/BSA	Simpsons-Scheibchen-Summationsmethode normalisiert auf die Körperoberfläche in der Diastole (Simpson´s method of disc to body surface area)
SMODs/BSA	Simpsons-Scheibchen-Summationsmethode normalisiert auf die Körperoberfläche in der Systole (Simpson´s method of disc to body surface area)
β1-Rezeptor	adrenerger beta-1-Rezeptor
T. cruzi	Trypanosoma cruzi
VES	Ventrikuläre Extrasystolen
VHS	Wirbelkörper zu Herz Scala (Vertebral Heart Score)
VTACH	Ventrikuläre Tachykardie

I. EINLEITUNG

Die idiopathische Dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste Ursache für schweres Herzversagen beim Menschen (MOZAFFARIAN et al., 2015) und auch die häufigste Herzerkrankung bei großen Hunden (TIDHOLM & JONSSON, 1997). Von den großen Hunderassen entwickelt der Dobermann, auch Dobermann Pinscher (DP) genannt, besonders häufig eine DCM (WESS et al., 2010b), auch Dobermann Kardiomyopathie (DoCM) genannt, die oft einen schwereren Verlauf als bei anderen Hunderassen nimmt (CALVERT et al., 1997a). Nach aktuellem Kenntnisstand geht man von einer genetischen Ursache für die DoCM aus (MEURS et al., 2007), (MAUSBERG et al., 2011). In der Humanmedizin sind seit ihrer Entdeckung im Jahre 1976 (STERIN-BORDA et al., 1976) funktionell wirkende Autoantikörper (AAK) gegen kardiale Rezeptoren als mögliche autoimmunbedingte Ursache für die bisher als idiopathisch eingestufte DCM im Fokus der Forschung. Speziell agonistisch wirkende AAK gegen kardiale β 1-Rezeptoren wurden vielfach im Serum von humanen DCM Patienten nachgewiesen (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987a) und sind nach heutigem Wissenstand als pathogen anerkannt (JAHNS et al., 2004), (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Mehrere Studien, die sich mit der Entfernung der AAK mittels Immunadsorption (IA) befassten, zeigten eine deutliche Verbesserung der DCM (WALLUKAT et al., 1996) sowie deutlich längere Überlebenszeiten (MULLER et al., 2000) bei humanen Patienten, was den kausalen Zusammenhang zwischen der DCM beim Menschen und AAK gegen β 1-Rezeptoren bestätigte. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen der humanen DCM und der DoCM, ist es von wissenschaftlichem Interesse herauszufinden, ob AAK gegen β 1-Rezeptoren auch bei der DoCM vorkommen. Der DP könnte somit nicht nur als mögliches Humanmodell von Forschungsinteresse sein (SMUCKER et al., 1990), sondern auch selbst von der Entwicklung neuer Therapiemethoden profitieren, da es bis zum heutigen Tage keinen kausalen Therapieansatz der DoCM gibt. Das Ziel der vorliegenden Studie war es somit herauszufinden, ob der DP analog zum humanen DCM Patienten AAK gegen β 1-Rezeptoren entwickelt und zu evaluieren, ob diese auch beim DP eine pathogene Wirkung haben könnten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann Pinscher

1.1. Allgemeines zu Signalement und Prävalenz

Die DCM ist die häufigste Herzerkrankung bei großen Hunderassen (TIDHOLM & JONSSON, 1997). Dabei ist der DP besonders überrepräsentiert (O'GRADY & HORNE, 1998), (WESS et al., 2010b). In einer Studie von WESS et al. 2010 lag die kumulative Prävalenz bei 58,2 %. Dies deckt sich mit den bisherigen Studienergebnissen aus den USA und Kanada, mit Prävalenzen zwischen 45 und 63 % (HAZLETT et al., 1983), (O'GRADY & HORNE, 1998). Nachdem CALVERT et al. 1982 noch von einer deutlichen Geschlechtsprädisposition für männliche DP ausgegangen waren, konnte in neueren Studien (MEURS et al., 2007), (WESS et al., 2010b) kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern bezüglich der Häufigkeit des Auftretens der Erkrankung dargestellt werden. Es bleiben dennoch Hinweise auf gewisse geschlechtsspezifische Unterschiede im Verlauf der DoCM. Gemäß einer Studie von WESS et al. scheinen weibliche Tiere früher Arrhythmien zu entwickeln, im Gegensatz zu den männlichen, die früher echokardiografische Veränderungen zeigen (WESS et al., 2010b). Ebenso scheint die Progression der DoCM bei männlichen Tieren schneller voranzuschreiten, sie entwickeln früher als weibliche Tiere ein kongestives Herzversagen (CHF) (WESS et al., 2010b). Unabhängig vom Geschlecht beginnt die Erkrankung meist im erwachsenen Alter, die meisten Hunde werden zwischen 5 und 10 Jahren klinisch auffällig (CALVERT et al., 1997a). Die Progression der DoCM ist, ab dem Zeitpunkt des CHF, deutlich rapider als bei anderen Hunderassen, die an DCM erkranken (CALVERT et al., 1997a), (PETRIC et al., 2002).

1.2. Ätiologie

Für die DCM beim Hund gibt es eine Vielzahl an möglichen Ursachen. Beim DP erscheint nach aktuellem Wissensstand eine genetische Ursache am wahrscheinlichsten (MAUSBERG et al., 2011). Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass weitere Ursachen beim DP, wie auch bei anderen Hunderassen, eine Rolle spielen. Diese haben einen unterschiedlichen Einfluss auf

die Entwicklung oder den Schweregrad der DCM. Neben der vermuteten genetischen Ursache sind z. B. Defizite in der Nährstoffversorgung oder im Stoffwechsel (wie z. B. Hypothyreose), infektiöse Ursachen, herzmuskelschädigende Toxine, tachykarde Rhythmusstörungen und nicht zuletzt autoimmun-medierte Prozesse weitere mögliche Ursachen, die beim Hund zu einer DCM führen können oder die Ausprägung der Erkrankung verschlechtern können (TIDHOLM et al., 2001). Im Folgenden wird auf die wichtigsten Gründe näher eingegangen.

Gendefekt. Aufgrund der hohen Prävalenz der DoCM und auffallend vielen betroffenen Hunden in einzelnen Linien wurde schon früh der Verdacht auf eine genetische Ursache der DoCM ausgesprochen (CALVERT et al., 1982). In einer Studie in Slowenien 2002 wurde erstmals eine deutliche Häufung über mehrere Generationen nachgewiesen (PETRIC et al., 2002), jedoch ohne erkennbares Vererbungsmuster. Seit einer Studie von MEURS et al. 2007 wird eine autosomal dominante Vererbung für den DP angenommen (MEURS et al., 2007). In einer Studie konnte eine Mutation auf dem Chromosom 5 mit der DoCM assoziiert werden (MAUSBERG et al., 2011). Der Hinweis auf eine Mutation der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4 (PDK4) auf Chromosom 14 (MEURS et al., 2012) in einer anderen Studie mit einer amerikanischen DP Population, konnte zumindest in Europa nicht bestätigt werden (OWCZAREK-LIPSKA et al., 2013).

Autoimmunbedingte DCM. In der Humanmedizin ist es inzwischen allgemein anerkannt, dass AAK gegen verschiedene Rezeptoren am Herzmuskel, vor allem gegen den β 1-Rezeptor, pathologische Wirkungen haben und zu einer DCM führen können (JAHNS et al., 2004). Die Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung wird in Abschnitt 2.4.2 ausführlich beschrieben. In den bisherigen Studien in der Tiermedizin wurde versucht, die AAK mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blots auch beim Hund nachzuweisen (COBB et al., 1994). Diese Tests erlaubten in diesen Studien allerdings keine Differenzierung zwischen den AAK gegen Myokardrezeptoren oder anderen Immunglobulinen und waren deshalb nicht aussagekräftig (COBB et al., 1994). In einer weiteren Studie wurde eine Kolonie von englischen Cocker Spaniels auf diverse autoimmune Prozesse, unter anderem AAK gegen kardiale Mitochondrien, untersucht (DAY, 1996). In dieser Studie konnten bei 30 % der Spaniels mit DCM antimitochondriale Antikörper, ein reduzierter Immunglobulin

A (IgA)-Gehalt im Serum und das Vorhandensein der Komplementkomponente C4 nachgewiesen werden (DAY, 1996). Diese Komplementkomponente gilt in der Humanmedizin als Marker bei Autoimmunerkrankungen und wird auch mit der DCM in Verbindung gebracht (DAY, 1996). In einer anderen Studie konnten im Serum von erkrankten DP mittels *Enzyme-linked-immunosorbent-Assay* (ELISA) keine erhöhten Konzentrationen von den Immunglobulinen G (IgG) oder M (IgM) sowie keine Antikörper gegen Myosin oder Laminin nachgewiesen werden (BRAZ-RUIVO, 1999). Bis heute fehlt ein empirischer Beweis für den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von kardialen AAK und DCM beim Hund. Ein möglicher Grund dafür könnte der bisherige Mangel an geeigneten Testmethoden sein (siehe Abschnitt 2.4.4). Somit können auch beim Hund AAK als Ursache der DoCM oder zumindest als Teil der Pathogenese nach dem heutigen Forschungsstand nicht ausgeschlossen werden.

Tachykardie-induzierte DCM. Tachykarde Rhythmusstörungen, wie ventrikuläre und supraventrikuläre Tachykardien oder Vorhofflimmern, die dauerhaft oder auch intermittierend auftreten, führen zur Entwicklung einer DCM. Dies wurde in mehreren Studien (ARMSTRONG et al., 1986), (O'BRIEN et al., 1990) experimentell bewiesen, indem Versuchshunden Herzschrittmacher implantiert wurden, die dann dauerhaft mit einer Herzfrequenz von z. B. 250/min schlugen. Dies führte zu einer systolischen Dysfunktion (ARMSTRONG et al., 1986). Der Effekt ist teilweise reversibel, wobei dies von der Dauer der Tachyarrhythmien und vom Grad der dadurch verursachten Myokardschädigung abhängt. Hunde, die durch eine Herzschrittmacher-induzierte Tachykardie an DCM erkrankten, entwickelten nach ca. 3–4 Wochen Symptome von CHF (ARMSTRONG et al., 1986). Somit liegt es nahe, dass auch spontan auftretende Tachyarrhythmien, wie z. B. bei der DoCM, zu einer Myokardschädigung führen können und dadurch die Progression der Erkrankung beschleunigen können. Zur Detektion dieser auch intermittierend auftretenden Rhythmusstörungen ist das Holter-EKG essentiell.

Taurinmangel-induzierte DCM. Taurin ist eine für den Myokardstoffwechsel wichtige Aminosäure. Hunde sind im Gegensatz zu Katzen normalerweise in der Lage, Taurin im Körper ausreichend zu synthetisieren. Nehmen Katzen nicht genug Taurin über die Nahrung auf, kommt es zu einem Taurinmangel, der zu einer fulminanten DCM führen kann. Eine solche DCM ist durch

Supplementation von Taurin jedoch potentiell reversibel (PION et al., 1987). Auch der Cocker Spaniel neigt zur Entwicklung einer Taurinmangel-induzierten DCM (KRAMER et al., 1995), (KITTLESON et al., 1997). Die meisten anderen Hunde mit DCM, darunter auch einige DP, wiesen in einer Studie von KRAMER et al. jedoch normale Taurin-Konzentrationen im Plasma auf (KRAMER et al., 1995). Daher ist nicht grundsätzlich davon auszugehen, dass ein DP mit DoCM an Taurinmangel leidet.

Carnitinmangel. Carnitin ist ein wichtiger Bestandteil des mitochondrialen Stoffwechsels der Herzmuskelzellen. Ein Carnitinmangel wurde daher zuerst von KEENE et al. in Zusammenhang mit DCM gebracht. Ein echter Carnitinmangel ist nur über eine Herzmuskelbiopsie nachzuweisen, da die Carnitin-Konzentration im Plasma nicht aussagekräftig ist. In einer humanmedizinischen Studie wurde echter myokardialer Carnitinmangel in Patienten mit schwerem CHF, auch aufgrund von DCM, nachgewiesen (REGITZ et al., 1990). Dies ist vermutlich mehr als Folge des CHF, denn als echte Ursache zu bewerten. In der Tiermedizin gibt es bisher keinen Konsens, ob Carnitinmangel einen Einfluss auf die DCM beim Hund hat, mehrere Studien zum Thema zeigen konträre Ergebnisse. Im Gegensatz zu KEENE et al. (KEENE et al., 1991) konnten COSTA und LABUC keine Verbesserung der DCM durch Carnitinsupplementation bei Hunden beobachten (COSTA & LABUC, 1994).

Hypothyreose. Da die Schilddrüsenhormone positiv inotrope und positiv chronotrope Wirkungen haben und die Hypothyreose die häufigste endokrine Störung ist, wurde früher davon ausgegangen, dass Hypothyreose eine mögliche Ursache für die Entwicklung oder zumindest Verschlechterung einer DCM sein könnte (SCOTT-MONCRIEFF, 2007). Auch die Hypothyreose kommt beim DP gehäuft vor (DIXON et al., 1999), was diesen Verdacht bestätigen könnte. Eine neuere Studie von BEIER et al. 2014 konnte diesen Verdacht jedoch widerlegen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass beide Erkrankungen zwar beim DP gehäuft vorkommen, aber die Hypothyreose keinen Einfluss auf die Entstehung oder Verschlechterung der DoCM hat (BEIER et al., 2015).

Toxische Ursachen. Es gibt nur wenige für den Hund relevante Toxine, die eine DCM auslösen können. Eines davon ist das Chemotherapeutikum Doxorubicin: Dieses führt dosisabhängig zur Entwicklung einer DCM (SOLCIA et al., 1981).

Für die Bedeutung von anderen kardiotoxischen Stoffen, wie z. B. Cobalt, gibt es bisher keine dokumentierten Fälle in der Tiermedizin.

Infektiöse Ursachen. Akute Myokarditis kann sich im weiteren Verlauf zu einer DCM entwickeln (DEC et al., 1985). Die in der Humanmedizin beschriebenen Ursachen sind vielfältig. Sowohl Viren, z. B. Enteroviren wie das Coxsackie Virus (CAMBRIDGE et al., 1979), (ARCHARD et al., 1987), als auch Bakterien, z. B. Borrelien (STANEK et al., 1990), und Protozoen, z. B. Trypanosoma cruzi (BARR et al., 1989), sind mögliche Ursachen einer Myokarditis und nachfolgender DCM. Borrelien (JANUS et al., 2014) und Trypanosomen (BARR et al., 1989) sind auch beim Hund als mögliche Krankheitserreger beschrieben. Beim Hund ist die Diagnose Myokarditis eine Ausschlussdiagnose, da der Erregernachweis durch Herzmuskelbiopsie kein Standarddiagnostikum ist. Daher gibt es weniger Fallberichte als in der Humanmedizin, die meisten Wissenschaftler nutzen Fallbeispiele beim Hund als Humanmodell, wie z. B. BARR et al. 1989 (BARR et al., 1989). 1980 beschrieben sowohl ATWELL und KELLY wie auch CARPENTER et al. einen Zusammenhang zwischen Parvovirus und Myokarditis (ATWELL & KELLY, 1980), (CARPENTER et al., 1980). Abgesehen von der bisher angenommenen relativ niedrigen Inzidenz von Myokarditis beim Hund, ist es tatsächlich fraglich, ob die kanine DCM einen viralen Ursprung hat. Pathohistologisch gibt es keine Hinweise auf massive Zellschäden oder Entzündungsprozesse im Herzmuskel bei an DCM erkrankten Hunden (CALVERT et al., 1982), (TIDHOLM & JONSSON, 2005), welche nach den Dallas-Kriterien (ARETZ et al., 1987) bei einer infektiösen Ursache vorhanden sein müssten. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass eine unentdeckte, chronische Myokarditis im späteren Verlauf möglicherweise als DCM interpretiert wird, vor allem aufgrund der eingeschränkten diagnostischen Möglichkeiten beim Hund. Zusätzlich ist ein Zusammenhang zwischen Infektionen und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beschrieben (CUNNINGHAM et al., 1992), was eine weitere Erklärung für eine autoimmune Komponente der DCM sein könnte.

1.3. Verlauf, Stadien, Symptome und Klinik

Die DoCM verläuft in 3 Stadien (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004), wie in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Stadien der DoCM, nach O'GRADY (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004)

Stadium I	Stadium II Okkultes Stadium	Stadium III Overtes Stadium
<p>Normales Herz:</p> <p>Keine feststellbaren echokardiographischen oder elektrokardiographischen Veränderungen</p> <p>Keine klinischen Symptome</p>	<p>Abnormales Herz:</p> <p>Echokardiographische Veränderungen</p> <p>UND/ODER</p> <p>Arrhythmien</p> <p>Keine klinischen Symptome</p>	<p>Abnormales Herz:</p> <p>Echokardiographische Veränderungen</p> <p>UND/ODER</p> <p>Arrhythmien</p> <p>Klinische Symptome (CHF und/oder Synkopen)</p>

Im Stadium I ist der Hund komplett unauffällig, sowohl klinisch als auch in der kardiologischen Untersuchung. Im Stadium II, dem okkulen (verdeckten) Stadium, können morphologische Veränderungen des Herzens nachgewiesen werden. Die Hunde sind weiterhin klinisch unauffällig. Zu den Veränderungen zählen eine echokardiographisch nachweisbare Vergrößerung des Herzens und/oder auch nachweisbare Arrhythmien im 24-Stunden-EKG (Holter-EKG), vor allem ventrikuläre Extrasystolen (VES) (CALVERT et al., 1997b), (CALVERT & BROWN, 2004), (CALVERT et al., 2000b). Zum Teil treten auch supraventrikuläre Tachyarrhythmien, wie Vorhofflimmern oder supraventrikuläre Extrasystolen, auf. Bereits in diesem Stadium sterben bereits ca. ein Drittel der erkrankten Hunde am plötzlichen Herztod (engl. *sudden death* (SD)) (O'GRADY & HORNE, 1998), teilweise ohne vorangehende Symptome. SD wird wahrscheinlich durch Tachyarrhythmien ausgelöst, die in Kammerflimmern übergehen und im Herzstillstand enden (CALVERT et al., 1997b). Im Stadium III, dem overten (offenkundigen) Stadium, führen die progressiven morphologischen Veränderungen zur Entstehung der Symptomatik. Der betroffene Hund zeigt klinische Symptome eines Linksherzversagens, wie Dyspnoe aufgrund von Lungenödem, Leistungsschwäche, Gewichtsverlust,

und/oder (Prä-)Synkopen, also Taumeln oder Ohnmachtsanfälle. Im Falle eines beidseitigen CHF kann noch Aszites oder Thoraxerguss hinzukommen. Rhythmusstörungen sind bei den meisten DP im overten Stadium vorhanden. Fast alle DP zeigen VES bis hin zu paroxysmalen ventrikulären Tachykardien (Vtach) (CALVERT et al., 1997b). Auffälligkeiten der klinischen Untersuchung können unter anderem ein schwacher Femoralispuls, Arrhythmien, ein Pulsdefizit, ein systolisches Herzgeräusch, ein Galloprhythmus und, im Fall eines CHF mit Lungenödem, ein sogenanntes Crackeln sowie verschärfte Lungengeräusche bei der Lungenauskultation sein (CALVERT et al., 1982), (CALVERT, 1986). In diesem Stadium ist die Erkrankung schon sehr weit fortgeschritten und der weitere Verlauf ist meist fatal. Pathohistologisch konnten beim DP im overten Stadium post mortem Veränderungen des Myokards dargestellt werden, meistens eine bindegewebig-fettige Degeneration des Myokards (CALVERT et al., 1982), in manchen Fällen auch das Muster der sogenannten „*attenuated wavy fibers*“ was eine Ausdünnung sowie eine wellige Anordnung der Myokardfasern beschreibt (TIDHOLM et al., 1998).

1.4. Diagnostik

1.4.1. Allgemeine und spezielle kardiovaskuläre Untersuchung

Eine gründliche allgemeine Untersuchung ist auch beim vermutet herzkranken DP von äußerster Wichtigkeit, um auf mögliche systemische Erkrankungen aufmerksam zu werden. Besonders relevant erscheint dies im Hinblick auf die Interpretation der Befunde der Hunde mit VES, da z. B. schwere systemische Erkrankungen oder Traumata VES auslösen können (MACINTIRE & SNIDER, 1984), die nicht primär einer strukturellen Herzerkrankung zuzuordnen sind.

Die spezielle kardiovaskuläre Untersuchung legt besonderen Wert auf die Schleimhautfarbe und kapilläre Füllzeit (KFZ), die Auskultation von Herz und Lunge, sowie die Erfassung der Pulsqualität an der Arteria femoralis. Die Schleimhäute sollten rosarot und feucht sein, die KFZ unter 2 Sekunden liegen. Auskultatorisch sollte das Herz regelmäßig und deutlich zu hören sein, ohne Herzgeräusche oder Arrhythmien, die Lunge sollte frei sein und der Puls sollte beidseits kräftig und herzsynchron sein. Für abnormale Befunde der klinischen Untersuchung, wie auch unter Abschnitt 1.3 beschrieben, gibt es eine Vielzahl an Differentialdiagnosen für kardiale und nicht kardiale Ursachen, die im Einzelfall

durch weitere diagnostische Tests ausgeschlossen werden müssen.

1.4.2. Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung (Echo) ist neben dem Holter-EKG einer der beiden unverzichtbaren Bestandteile der kardiologischen Untersuchung beim DP. Im Echo können die Herzgröße, Pumpkraft (systolische Funktion), mögliche Klappenundichtigkeiten sowie der Blutfluss evaluiert werden. Hinweisend auf eine DoCM sind subjektive Befunde wie eine verschlechterte systolische Funktion, linksventrikuläre Volumenüberladung mit eventueller Dilatation des linken Atriums, morphologisch unauffällige Herzklappen, und nur gering- bis mittelgradige Herzklappeninsuffizienzen. Wichtig ist natürlich der Ausschluss anderer möglicher kardialer Ursachen einer Volumenüberladung, wie z. B. angeborene Shunterkrankungen (Persistierender Ductus Arteriosus, Ventrikelseptumdefekt) und primäre Herzklappenerkrankungen. Zur Diagnosestellung der DoCM im Echo sind objektive Messungen unverzichtbar. Im Folgenden werden die Wichtigsten kurz dargestellt.

Scheibchen-Summationsmethode nach Simpson. Der Goldstandard (HOLLER & WESS, 2014) zur Diagnosestellung der DoCM ist momentan die Scheibchen-Summationsmethode nach Simpson (engl. *Simpson's method of disc*, SMOD) (WESS et al., 2010d), die der bisher ursprünglich hauptsächlich gebrauchten *Motion-Mode* (M-Mode) Messung beim DP überlegen ist (WESS et al., 2010d). Bei dieser Methode wird das Volumen des linken Ventrikels, enddiastolisch und endsystolisch, mittels der Summation von einzelnen parallelen, elliptischen Scheiben berechnet. Die ermittelten Werte werden ins Verhältnis zur Körperoberfläche (BSA) gesetzt und in ml/m² angegeben. Die Referenzwerte für DP sind wie folgt: Enddiastolisches Volumen (SMODd/BSA): < 95 ml/m², endsystolisches Volumen (SMODs/BSA): < 55 ml/m² (WESS et al., 2010d).

M-Mode. Obwohl die SMOD der Goldstandard zur Diagnostik der DoCM im Echo darstellt, ist der M-Mode noch lange nicht obsolet. Nicht alle Ultraschallgeräte sind mit der Option zur SMOD Messung ausgestattet. Zudem gelingt es nicht bei jedem Hund, z. B. aufgrund fehlender Kooperation des Hundes, ein für die SMOD-Messung essentielles, qualitativ hochwertiges 2D-Bild der parasternalen Längsachse aufzunehmen. Es gibt verschiedene Quellen und Studien für rassespezifische Referenzwerte des M-Modes für den DP. Die

wichtigsten Werte der M-Mode Messungen sind die für den inneren linksventrikulären Durchmesser in der Diastole (LVIDd) und den inneren linksventrikulären Durchmesser in der Systole (LVIDs). Referenzwerte für beide Geschlechter sind LVIDd: < 4,7 cm und LVIDs: < 3,8 cm (CALVERT et al., 2000b), (CALVERT & BROWN, 2004). In einer neueren Studie konnten geschlechterspezifische Referenzwerte erstellt werden, einen relevanten Unterschied machte dies vor allem für LVIDd (für weibliche Tiere: LVIDd < 4,6 cm, für männliche Tiere: LVIDd 4,8 cm), nicht aber für LVIDs (< 3,6 cm für beide Geschlechter) (MÄURER, 2010).

E-Point-to-Septal-Separation. Ein weiterer Parameter für die Beurteilung der linksventrikulären Füllung und Funktion ist die „*E-Point-to-Septal-Separation*“ (EPSS) (CALVERT & BROWN, 1986), (HOLLER & WESS, 2014). Die EPSS korreliert sehr gut mit der Auswurffraktion (*engl. ejection fraction* (EF)) des linken Ventrikels (MASSIE et al., 1977), dem in der Humanmedizin wichtigen Parameter für die systolische Funktion. Die Messung der EPSS ist vor allem dann hilfreich, wenn keine Möglichkeit zur SMOD-Messung vorhanden ist, da auch die EPSS frühzeitige Veränderungen eher anzeigt als die konventionellen M-Mode Messungen der linksventrikulären Diameter (LVIDd und LVIDs) (CALVERT & BROWN, 1986), (HOLLER & WESS, 2014). Somit ist die EPSS ein hilfreicher Parameter zur Ergänzung der M-Mode-Diagnostik. Mit der Methode wird der kleinste Abstand der Mitralklappenspitze (*E-Point*) zum interventrikulären Septum, während der Öffnung der Mitralklappe, gemessen. Aktuell gelten Werte über 6,5 mm als abnormal und somit verdächtig für DCM (HOLLER & WESS, 2014).

1.4.3. Elektrokardiographie

Die zweite unabdingbare Säule der Diagnostik ist die Elektrokardiographie (EKG). Beim DP ist es von großer Wichtigkeit, zusätzlich zum Echo sowohl ein Kurzzeit-EKG als auch Holter-EKG durchzuführen. Ohne das EKG wäre eine Diagnosestellung der arrhythmogenen Form der DCM nicht möglich.

Kurzzeit-Elektrokardiographie. Mit dem Kurzzeit-EKG beurteilt man meist nur wenige Minuten des Rhythmus. Daher ist es schwierig, intermittierende Rhythmusstörungen zu erfassen. Dennoch findet das Kurzzeit-EKG in der Diagnostik der DoCM seine Anwendung, da das Holter-EKG deutlich

aufwändiger, kostenintensiver und nicht überall verfügbar ist. In einer neueren Studie von WESS et al. im Jahre 2010 wurde die prognostische Aussagekraft eines 5-Minuten-EKGs im Verhältnis zum Holter-EKG untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass ein unauffälliges Kurzzeit-EKG intermittierende Rhythmusstörungen, wie sie bei einer okkulten DoCM vorkommen, nicht ausschließt. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei mindestens einer VES im Kurzzeit-EKG die Wahrscheinlichkeit auf mehr als 100 VES im Holter-EKG (in 24 Stunden), und damit auf eine okkulte DoCM, hoch ist (positiv prädiktiver Wert: 85,6 %) (WESS et al., 2010a).

24-Stunden-Elektrokardiographie (Holter-EKG). Das Holter-EKG ist der Goldstandard in der Diagnostik der arrhythmogenen Form der DoCM (CALVERT et al., 2000b), (CALVERT et al., 2000a), (CALVERT & WALL, 2001), (MEURS et al., 2001). VES sind die am häufigsten festgestellten Rhythmusstörungen (CALVERT et al., 1982), (CALVERT & WALL, 2001). Als diagnostisches Kriterium wird meist die absolute Anzahl der VES in 24 Stunden verwendet (CALVERT et al., 1997b). CALVERT et al. 1997 konnte in seiner Studienpopulation nachweisen, dass alle DP, die mehr als 100 VES in 24-Stunden aufwiesen, im weiteren Verlauf eine DoCM entwickelten (CALVERT et al., 1997b). Zusätzliche Malignitätskriterien waren in dieser Studie das Auftreten von Couplets (2 VES hintereinander), Triplets (3 VES hintereinander), oder Salven (> 4 VES hintereinander) bis hin zu Vtach. Vtach sind die als am gefährlichsten eingestuften Tachyarrhythmien, da sie ins Kammerflimmern übergehen können und im Verdacht stehen den SD auszulösen (CALVERT et al., 1997b). Bei den meisten an DoCM erkrankten Hunden werden insgesamt weit mehr als 100 VES in 24-Stunden im Holter-EKG festgestellt, in einer Studie von CALVERT et al. 2000 hatten 65 % der erkrankten Hunde mehr als 1000 VES/24 Stunden (CALVERT et al., 2000b).

1.4.4. Röntgen

Das Röntgen ist weiterhin ein unverzichtbares Diagnostikum zur Feststellung des CHF. Die Grundlagen zur radiografischen Thoraxdiagnostik beim Hund legte BURK 1983, der erstmals die subjektive Beurteilung der kardialen Dimensionen beschrieb (BURK, 1983). In einer Studie von BUCHANAN und BUCHELER 1995 wurde erstmals die objektive Messmethode des „Vertebral Heart Score“ (VHS) eingeführt (BUCHANAN & BUCHELER, 1995). In dieser Methode wird

die Herzgröße im Verhältnis zur Breite der thorakalen Wirbelkörper gesetzt, um einen objektiven Messwert zur Herzgröße zu erhalten. Mit dieser Methode und dem Thoraxröntgenbild an sich können jedoch nur weit fortgeschrittene kardiale Veränderungen aufgedeckt werden. Aufgrund der Pathogenese der DoCM ist das Echo dem Röntgen weit überlegen, da es eine frühere Erkennung funktioneller Störungen erlaubt (CALVERT, 1986).

1.4.5. Biomarker

Biomarker sind im gesunden wie im kranken Organismus vorkommende Stoffe, die messbar sind und mit einzelnen Erkrankungen korrelieren. Ein messbarer Anstieg eines Biomarkers kann z.B. Hinweise geben auf die Entwicklung oder Verschlechterung einer Erkrankung. Kardiale Biomarker in der Tiermedizin werden vor allem zur Diagnostik und für prognostische Aussagen eingesetzt. Besonders wichtig sind dabei bisher das kardiale Troponin I (engl. *cardiac troponin I* (cTnI)) und das natriuretische Peptid Typ B (NT-proBNP) (LEWANDROWSKI et al., 2002), (CHEN & BURNETT, 1999), die beide im Blut gemessen werden können. Nachfolgend wird kurz auf die Bedeutung beider Biomarker, in Bezug auf die DoCM eingegangen.

cTnI. Das cTnI ist ein spezifischer Marker für die Zerstörung von Myokardzellen (MORROW, 2001), (FISHBEIN et al., 2003), da es physiologisch intrazellulär vorkommt. Bei einer Zerstörung von Myokardzellen wird es in den Blutkreislauf freigesetzt und ist dort messbar. OYAMA und SISSON stellten 2004 fest, dass die cTnI-Konzentrationen im Blut bei Hunden mit Herzerkrankungen erhöht sind und auch mit der Herzgröße und der Überlebenszeit korrelieren. Der Grenzwert in dieser Studie war 0,2 ng/ml (OYAMA & SISSON, 2004). WESS et al. konnten 2010 einen ähnlichen Grenzwert (0,22 ng/ml) in einer Population mit DP bestätigen. In dieser Studie konnte herausgestellt werden, dass das cTnI ein sinnvoller Biomarker zur frühzeitigen Diagnostik von okkulten DoCM bei sonst klinisch unauffälligen DP ist, da der cTnI-Wert bei den DP, die zum Zeitpunkt der Messungen keine Auffälligkeiten in der kardiologischen Untersuchung zeigten, aber im späteren Verlauf eine DoCM entwickelten, bereits erhöht war (WESS et al., 2010c). Dennoch ist aufgrund der zwar hohen, aber im Verhältnis zum Goldstandard (kardiologische Untersuchung mit Echo und Holter-EKG) zu niedrigen, Spezifität der cTnI Messung (70,5 % für VES, 86,6 % für echokardiographische Veränderungen) die kardiologische Untersuchung zur

Diagnosestellung bisher unverzichtbar (WESS et al., 2010c).

NT-proBNP. Das NT-proBNP ist ein Marker für den Wandstress des Ventrikelmyokards (LEVIN et al., 1998) Es wird also vermehrt produziert, wenn das Myokard besonderen Belastungen ausgesetzt ist, wie bei einer Volumenüberladung infolge einer Herzerkrankung (HAMA et al., 1995). MACDONALD und KITTELSON stellten 2003 einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten NT-proBNP-Spiegel im Blut und weiter fortgeschrittenen Stadien der Mitralklappenendokardiose her (MACDONALD et al., 2003). OYAMA et al. zeigten 2007, dass auch bei Hunden mit okkulten DCM die NT-proBNP-Messung ein hilfreicher diagnostischer Marker sein kann (OYAMA et al., 2007a). In neueren Studien beim DP konnten sowohl praxisrelevante Grenzwerte (okkulte DoCM in allen Stadien: NT-proBNP > 400 pmol/l, mit echokardiographischen Veränderungen: NT-proBNP > 550 pmol/l) erarbeitet (WESS et al., 2011), als auch prognostische Aussagen zur DoCM gemacht werden (kürzere Überlebenszeit bei DoCM mit NT-proBNP > 900 pmol/l) (SINGLETERY et al., 2012). In einer Multicenterstudie (SJOSTRAND et al., 2014) konnte gezeigt werden, dass es deutliche rassespezifische Unterschiede bei der NT-proBNP Konzentration im Blut von gesunden Hunden gibt, außerdem hohe Variationen innerhalb einer Rasse, die die bisherigen Grenzwerte deutlich übersteigen. Daher, und weil das NT-proBNP durch andere systemische Erkrankungen falsch hoch sein kann (z.B. eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate infolge Nierenfunktionsstörungen), ist es als alleiniger Parameter zur Diagnosestellung der DoCM ungeeignet (OYAMA et al., 2013).

1.5. Therapie

Je nach Stadium der DoCM gibt es verschiedene Therapieempfehlungen. Zur ausführlicheren Beschreibung der Stadien siehe auch Abschnitt 1.3. Die Therapie der DoCM im okkulten Stadium hat vor allem die Verlängerung der asymptomatischen Zeit zum Ziel, also das Herausögern des Beginns der klinischen Symptome. Denn ab diesem Zeitpunkt, dem Beginn der overt Phase, verschlechtert sich der klinische Zustand ohne Therapie drastisch. Die Therapie zielt dann auf die Revision der Symptome durch das CHF, eine Verbesserung der Lebensqualität und, wenn möglich, auf eine längere Überlebenszeit bei guter Lebensqualität ab. Allen Stadien gemein ist, dass bis zum heutigen Tag keine kausale Therapie möglich ist. Vor allem die Therapie der Arrhythmien stellt nach

wie vor eine große Herausforderung dar.

Pimobendan. Der Wirkstoff Pimobendan ist aktuell einer der wichtigsten, wenn nicht sogar der wichtigste Wirkstoff zur Behandlung der DoCM. 1989 veröffentlichten POULEUR et al. eine der ersten Studien zur positiv inotropen Wirkung von Pimobendan (POULEUR et al., 1989). Pimobendan ist ein Hemmer der Phosphodiesterase-III und -V, der als Calcium-Sensitizer sowohl eine starke positiv inotrope Wirkung auf den Herzmuskel ausübt als auch eine periphere Vasodilatation und damit eine Reduktion der Nachlast bewirkt (VAN MEEL & DIEDEREN, 1989). In einer Studie von FUENTES et al. 2002 konnte bereits eine deutlich verlängerte Überlebenszeit bei DP, zusätzlich zur damaligen Standardtherapie (Furosemid, Enalapril und Digoxin) mit Pimobendan behandelt wurden, nachgewiesen werden (FUENTES et al., 2002). 2008 konnte die Gruppe um O'GRADY den therapeutischen Nutzen von Pimobendan bei DP im overtren Stadium, ohne die zusätzliche Therapie mit Digoxin, eindeutig belegen (O'GRADY et al., 2008). In der sogenannten PROTECT-Studie (SUMMERFIELD et al., 2012), einer großen Multicenterstudie, konnte dann auch der positive Effekt von Pimobendan im okkulten Stadium bei DP mit systolischer Dysfunktion nachgewiesen werden, da es den Übertritt ins overte Stadium zwar nicht verhinderte, aber im Vergleich zum Placebo deutlich herauszögerte (median 718 Tage mit Pimobendan vs. 441 Tage mit Placebo). Außerdem konnte insgesamt eine deutlich längere Überlebenszeit der Hunde, die Pimobendan erhalten hatten, nachgewiesen werden (median 623 Tage mit Pimobendan vs. 466 Tage mit Placebo) (SUMMERFIELD et al., 2012). Somit ist Pimobendan Mittel der ersten Wahl zur Behandlung der DoCM, bereits ab dem okkulten Stadium.

ACE-Inhibitoren. Unverzichtbar in der Therapie des CHF ist die Gruppe der Wirkstoffe, die sich hemmend auf das Angiotension-konvertierende Enzym auswirken (ACE-Inhibitoren). Durch die Blockade des im Herzversagen aktivierten Renin-Angiotension-Aldosteron-Systems (RAAS) bewirken diese Wirkstoffe eine Reduktion der Vor- und Nachlast und erleichtern somit die Herzarbeit. Auch in der Tiermedizin wurden schon mehrere große Studien zur Effektivität der Therapie und der positiven Auswirkungen auf die Überlebenszeit verschiedener ACE-Inhibitoren durchgeführt, wobei die Wirkstoffe Enalapril und Benazepril im Fokus standen (GROUP, 1995a), (GROUP, 1995b), (ETTINGER et al., 1998), (GROUP, 1999). Seitdem werden ACE-Inhibitoren als

Standardmedikament neben Furosemid im overten Stadium beim DP eingesetzt. Anders sieht es aus in Bezug auf den Einsatz von ACE-Inhibitoren im okkulten Stadium. Hier ist der Nutzen der Therapie, im Gegensatz zur Humanmedizin, wo ein positiver Effekt von Enalapril im asymptomatischen Stadium nachgewiesen werden konnte (INVESTIGATORS, 1992), nicht eindeutig geklärt. In einer retrospektiven Studie von O'GRADY et al. 2009 konnte eine signifikant längere Zeit bis zur Entwicklung von overter DoCM im okkulten Stadium durch die Therapie mit Benazepril dargestellt werden (O'GRADY et al., 2009). Prospektive, Placebo-kontrollierte Studien zur Bestätigung des positiven Effekts von ACE-Inhibitoren im okkulten Stadium fehlen jedoch noch.

Diuretika. Das Diuretikum der ersten Wahl zur Behandlung des akuten und chronischen CHF ist der Wirkstoff Furosemid, aus der Klasse der Schleifendiuretika (CALVERT, 1986). Im Falle der Ausbildung einer diuretischen Resistenz im Krankheitsverlauf stehen noch weitere, potentere Wirkstoffe, wie z.B. Torasemid, zur Verfügung. Die deutlich stärkere Wirkung von Torasemid wurde auch bei Hunden bereits nachgewiesen. Doch auch das Risiko für mögliche Nebenwirkungen, wie Azotämie und Elektrolytverschiebungen, steigt beim Einsatz von Torasemid, weshalb es unter guter klinischer Kontrolle eingesetzt werden sollte (PEDDLE et al., 2012).

Spirolacton. Der Aldosteron-Antagonist Spironolacton wird häufig zusätzlich zu Furosemid und einem ACE-Inhibitor eingesetzt, und hat sich als sichere und gute Ergänzung in der Therapie des kongestiven Herzversagens bewiesen (THOMASON et al., 2014). Die potentiell antifibrotische Wirkung durch die Blockade von Aldosteron, das die Fibrosierung des Myokards fördert, konnte in einer aktuellen Studie bestätigt werden (ESPOSITO et al., 2013). Damit hat der Wirkstoff Potential, zur Vorbeugung oder Verzögerung der Fibrosierung des Myokards im Rahmen der DCM eingesetzt zu werden und damit die Entwicklung von Arrhythmien zu verhindern (ESPOSITO et al., 2013).

Antiarrhythmische Therapie. Ventrikuläre Arrhythmien treten beim DP sowohl in der okkulten als auch in der overten Phase auf. Als besonders maligne, und damit behandlungsbedürftig, gelten Vtach sowie das Auftreten von Couplets und Triplets (CALVERT, 1986). CALVERT und BROWN konnten 2004 in einer Studie zur Überlebenszeit von DP mit oder ohne antiarrhythmische Therapie eine

signifikant längere Überlebenszeit für die Gruppe der mit Antiarrhythmika behandelten Hunde nachweisen (CALVERT & BROWN, 2004). Den Sekudentod konnten die eingesetzten Therapeutika in jener Studie aber nicht verhindern, lediglich herauszögern (CALVERT & BROWN, 2004). Auf die Frage, welches Antiarrhythmikum die beste Wahl zur Therapie maligner ventrikulärer Arrhythmien ist, gibt es bisher keine eindeutige Antwort. Amiodaron, ein Klasse-III-Antiarrhythmikum, ist ein möglicher Wirkstoff um gerade diese gefährlichen Arrhythmien behandeln zu können (CALVERT, 1986), der aber auch die Gefahr von Nebenwirkungen, wie z.B. Leberschädigung (JACOBS et al., 2000), (KRAUS et al., 2009) mit sich bringt. Prospektive, Placebo-kontrollierte Studien zum Thema Therapieeffizienz von Antiarrhythmika stehen bis heute noch aus.

Betablocker. In der Humanmedizin ist der Einsatz von Betablockern bei Patienten mit DCM, auch im Stadium des kongestiven Herzversagens, weit verbreitet, da in mehreren großen Studien ein Zusammenhang zwischen der Gabe von Betablockern (Carvedilol, Metoprolol, Bisoprolol) und einer reduzierten Sterberate hergestellt werden konnte (GARG & SORRENTINO, 2001). In der Tiermedizin konnte bisher keine Studie diesen Effekt auch beim Hund beweisen (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). In einer Studie von OYAMA et al. 2007 konnte auch kein Unterschied zwischen Hunden die Carvedilol erhalten hatten und der Placebogruppe dargestellt werden (OYAMA et al., 2007b). Vor allem aufgrund der negativ chronotropen und negativ inotropen Wirkung von Betablockern sollten diese, wenn bei DoCM angewandt, immer langsam dosissteigernd und unter gutem Monitoring eingesetzt werden, da sonst die Gefahr der Dekompensation besteht (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Der tatsächliche Nutzen der Betablockade beim Hund bleibt noch zu beweisen.

1.6. Prognose

Die DCM ist eine progressive, degenerative Herzerkrankung mit einer generell schlechten Prognose (TIDHOLM et al., 1997). Die mittlere Überlebensrate von allen Hunden mit DCM wurde in einer Studie mit 17,5 % für 1 Jahr und nur 7,5 % für 2 Jahre ab dem Zeitpunkt der Diagnose angegeben (TIDHOLM et al., 1997). Für DP im speziellen ist die Prognose sogar noch schlechter, in einer Studie war die mittlere Überlebenszeit bei DP 52 Tage, nach dem Eintritt ins overte Stadium, im Vergleich zu 240 Tagen bei anderen Rassen (PETRIC et al., 2002). Die DoCM

scheint schneller progressiv zu verlaufen als die DCM bei anderen Hunden, auch die Studienergebnisse von anderen Autoren bestätigen dies (CALVERT et al., 1997a). Vor allem der Sekudentod ist nach wie vor ein großes Problem, ca. 20–30 % Prozent aller DP, sowohl im okkulten als auch im overten Stadium, sterben am Sekudentod (CALVERT et al., 1997a), (O'GRADY & HOME, 1998), (PETRIC et al., 2002). Eine bedeutende Verbesserung der Prognose kann inzwischen durch die Therapie mit Pimobendan erreicht werden, vor allem zur Verlängerung des okkulten Stadiums (SUMMERFIELD et al., 2012). Denn ab dem Eintritt ins overte Stadium ist die Prognose trotz der Behandlung mit Pimobendan zwar besser als ohne, aber insgesamt immer noch schlecht, mit einer mittleren Zeit von 130 Tagen bis zum Zeitpunkt des Therapieversagens (ohne Pimobendan 14 Tage) (O'GRADY et al., 2008). Prognostische Faktoren für die Vorhersage einer kürzeren Überlebenszeit waren in bisherigen Studien Alter und beidseitiges Herzversagen (Aszites und Dyspnoe aufgrund von Lungenödem) (TIDHOLM et al., 1997), Vorhofflimmern (CALVERT et al., 1997a) oder auch ein im Blut gemessener NT-proBNP Wert von > 900 pmol/l (SINGLETERY et al., 2012). In einer aktuellen Studie von KLÜSER et al. 2016 war die Herzgröße (das enddiastolische Volumen, LVEDV/BSA $> 91,3$ ml/m²) der wichtigste prognostische Faktor zur Vorhersage des Sekudentods. Zusätzliche Faktoren waren ein erhöhter cTnI-Wert, eine Schlag-zu-Schlag-Frequenz der VES (FR) > 260 /min und das Vorhandensein von Vtach (KLÜSER et al., 2016). Diese Ergebnisse zeigen einmal mehr, wie wichtig beim DP Vorsorgeuntersuchungen sind, um eine Herzvergrößerung möglichst früh zu entdecken und behandeln zu können, da keine kausale Therapie der DoCM möglich ist.

2. Autoantikörper gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren

2.1. Allgemeines zu Autoimmunerkrankungen und Autoantikörpern

Autoimmunerkrankungen im klassischen Sinne sind Erkrankungen, bei denen sich das Immunsystem gegen körpereigene Antigene richtet und durch eine Aktivierung der Immunantwort AAK bildet, die zur Zerstörung oder Entzündung des Zielorgans führen (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Beispiele für systemische Autoimmunerkrankungen sind die rheumatoide Arthritis oder autoimmunhämolytische Anämie sowie organspezifische Erkrankungen wie Myasthenia gravis oder Diabetes mellitus Typ 1 (ROSE & BONA, 1993).

Abgesehen von diesen klassischen Autoimmunerkrankungen gibt es noch eine weitere Gruppe von AAK, die keine zerstörende, sondern eine funktionelle Wirkung ausüben (SCHULZE et al., 2005). Diese Gruppe von AAK haben G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) als Zielorgan und üben eine meist agonistische Wirkung aus (SCHULZE et al., 2005). Die erste Beschreibung von AAK mit agonistischer Wirkung stammt von STERIN-BORDA et al. 1976, die die agonistische Wirkung des Serums von Patienten, die an der Chagas Krankheit erkrankt waren, auf isolierte Vorhofmyokardzellen von Ratten nachweisen konnten (STERIN-BORDA et al., 1976). 1984 schrieb die selbe Arbeitsgruppe um BORDA diesen zuvor beobachteten Effekt der agonistischen Aktivität von zirkulierenden AAK gegen den adrenergen β 1-Rezeptor im Myokard zu (BORDA et al., 1984). VENTER et al. beschrieb 1980 das Vorhandensein von AAK gegen den adrenergen β 2-Rezeptor im Serum von an Asthma und Rhinitis erkrankten Menschen (VENTER et al., 1980). Den möglichen Zusammenhang zwischen DCM und AAK gegen den adrenergen β 1-Rezeptor zeigten WALLUKAT UND WOLLENBERGER 1987 erstmals auf (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987a). Das nachfolgende Kapitel soll eine Übersicht über die Bedeutung dieser AAK gegen β 1-Rezeptoren im Hinblick auf kardiale Erkrankungen, mit dem Fokus auf DCM, geben.

2.2. Ätiologie und Prävalenz der humanen idiopathischen DCM

Die idiopathische DCM beim Menschen ist die häufigste Ursache von schweren Herzversagen bei jungen Erwachsenen (MOZAFFARIAN et al., 2015), ausgenommen der Fälle, die durch ischämische Herzerkrankungen verursacht sind. Von allen Fällen der idiopathischen DCM werden Genmutationen und der Einfluss von kardiotoxischen Substanzen, wie z. B. Alkohol oder Antracycline (Doxorubin), für ca. 1/3 der Fälle als Ursache verantwortlich gemacht (MORITA et al., 2005). Für die restlichen 2/3 der Fälle ist die Ätiologie unklar. Da bei an DCM erkrankten Menschen häufig Veränderungen der normalen Immunreaktion nachgewiesen werden konnten (LIMAS, 1997), (LUPPI et al., 1998), liegt die Vermutung auf autoimmune Krankheitsmechanismen nahe. Dabei ist das Vorhandensein von AAK an sich noch kein Beweis für eine Autoimmunerkrankung, da AAK mit niedrigen Titern auch bei gesunden Individuen vorkommen und als natürlicher Teil des Immunsystems angesehen werden (ROSE, 2001). Nach mehr 30 Jahren intensiver Forschung zum Thema

funktionelle AAK und ihre mögliche Pathogenität, gilt speziell die Pathogenität der AAK gegen β 1-Rezeptoren nach aktuellem Wissenstand als bestätigt (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Dies wurde sowohl im Tiermodell bewiesen (JAHNS et al., 2004), also auch in Studien der Humanmedizin, in denen eine deutliche Verbesserung der Symptomatik nach Entfernung der AAK durch Immunadsorption gezeigt werden konnte (DANDEL et al., 2012). Daher sollte die durch AAK gegen β 1-Rezeptoren ausgelöste DCM als eigene Autoimmunerkrankung betrachtet werden (FREEDMAN & LEFKOWITZ, 2004). Die Prävalenzen bei Patienten mit DCM schwanken dabei in verschiedenen Studien zwischen ca. 30 % (JAHNS et al., 1999), 20-65 % (LIMAS et al., 1992) und bis zu 95 % (WALLUKAT et al., 1995), was möglicherweise auch mit den unterschiedlichen Testmethoden zusammenhängen könnte (JAHNS et al., 2006). Die bisher eingesetzten Testmethoden sind eingehender beschrieben in Kapitel 2.4.4.

2.3. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

GPCRs sind Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche, sie bilden die größte Rezeptorenfamilie des menschlichen Körpers (FREDRIKSSON et al., 2003). GPCRs sind an fast allen regulatorischen Prozessen des Körpers beteiligt (PIERCE et al., 2002) und damit auch Zielorgan von funktionell agierenden AAK, wie bereits vielfach beschrieben. Diese AAK können eine stimulierende, hemmende oder synergistische Wirkung ausüben (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Tabelle 2: gibt eine Übersicht über verschiedene GPCRs und die durch funktionell agierende AAK ausgelösten Erkrankungen (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Die agonistisch wirkenden AAK binden an der ersten oder zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors (WALLUKAT et al., 1995). Die hemmend wirkenden AAK binden an die dritte extrazelluläre Schleife und blockieren den Rezeptor für die physiologischen Agonisten (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1991). Synergistisch wirkende AAK haben alleine weder stimulierende noch hemmende Aktivität, können aber die Effekte eines physiologischen oder pharmakologischen Agonisten deutlich verstärken (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). AAK gegen den muskarinergen M2-Rezeptor üben eine hemmende Wirkung aus und wurden vor allem bei Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie nachgewiesen (GOIN et al., 1994).

Tabelle 2: Übersicht über Erkrankungen, mediiert durch AAK gegen GPCRs, eine Auswahl (modifiziert nach (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014)). Kardiale Erkrankungen sind in fett markiert.

Rezeptor	Assoziierte Erkrankung
β 1- Adrenoceptor	DCM, Peripartum Kardiomyopathie, Myokarditis, Chagas-Kardiomyopathie, Störungen der kardialen Leitungsaktivität, Ventrikuläre Tachykardie, Arrhythmien, plötzlicher Herztod (SD), Peridontitis
β 2-Adrenoceptor	Chagas-Kardiomyopathie, allergisches Asthma, Glaukom, Alzheimer, regionales Schmerz Syndrom, Orthostatische Hypotension
α 1-Adrenoceptor	Hypertension, Pulmonale Hypertension, Diabetes mellitus Typ 2, Alzheimer
Muskarinerge M2- Rezeptor	Chagas-Kardiomyopathie, DCM, regionales Schmerzsyndrom,

Aufbau des β 1-Rezeptors. Der β 1-Rezeptor gehört zur Familie der GPCRs und ist mit einem Anteil von ca. 70-80 % aller β -Rezeptoren am Herz der wichtigste kardiale Adrenoceptor (FRIELLE et al., 1987). Das Rezeptormolekül besteht aus 7 Transmembrandomänen, die allgemeine Struktur entspricht der des Rhodopsinrezeptor (PALCZEWSKI et al., 2000). Diese Transmembrandomänen bilden einen hydrophoben Bereich in der Zellmembran, an dem die Rezeptorbotenstoffe binden können (BYWATER, 2005). Die 7 Transmembrandomänen sind verbunden durch 3 extrazelluläre und 3 intrazelluläre Schleifen (siehe Abbildung 1), wobei die intrazellulären Schleifen mit den stimulierenden G-Proteinen gekoppelt sind (PALCZEWSKI et al., 2000).

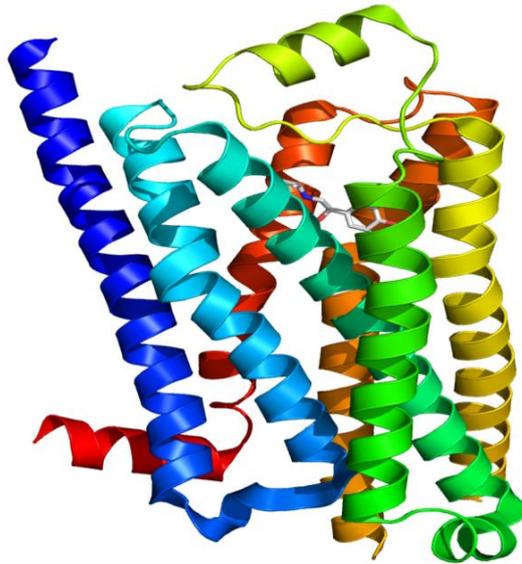


Abbildung 1: Schematische Darstellung des β 1-Rezeptors, gebunden an Isoprenalin (Quelle: Wikipedia)

Physiologische Stimulation des β 1-Rezeptors. Die physiologische Stimulation des β 1-Rezeptors wird durch Adrenalin und Noradrenalin (bzw. Noradrenalin-Derivate wie z. B. Isoprenalin) vermittelt. Die Bindung dieser Liganden an den Rezeptor aktiviert eine Signalkaskade, die zu einer schrittweisen Aktivierung der G-Proteine, Adenylatzyklase (die zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) produziert) und cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) führt. Die aktivierte PKA phosphoryliert Moleküle, die in die Regulation der sarkoplasmatischen Calciumkonzentration involviert sind und steigert somit die Inotropie und Lusitropie der Myozyten (FREEDMAN & LEFKOWITZ, 2004), Abbildung 2 zeigt eine genauere Darstellung des Mechanismus der Aktivierung von GPCRs durch physiologische Liganden oder auch AAK gegen β 1-Rezeptoren.

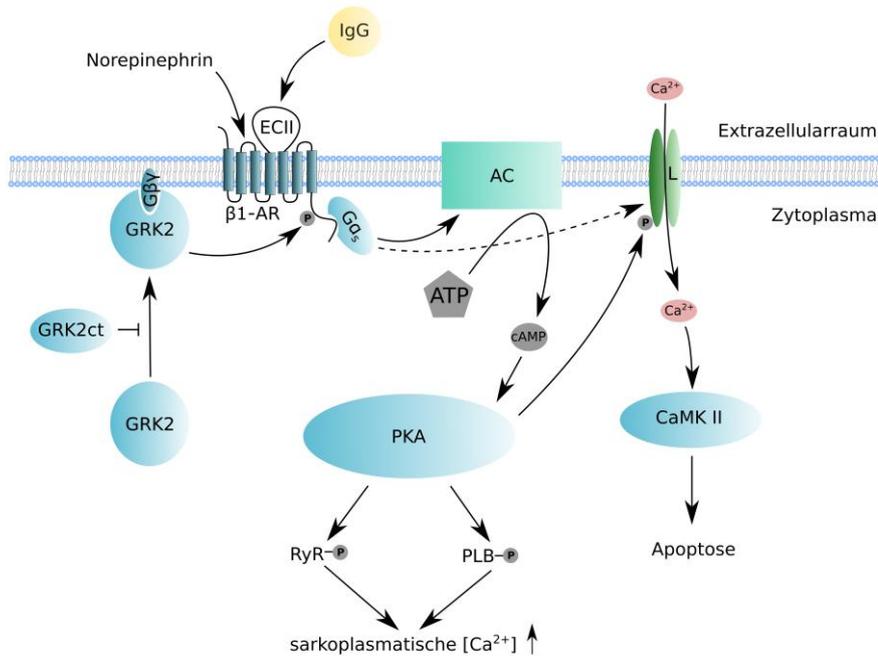


Abbildung 2: Wirkmechanismus der Aktivierung von GPCRs am Beispiel der Aktivierung des β_1 -Rezeptors durch physiologische Liganden (Norepinephrin) oder AAK (IgG). Der β_1 -Rezeptor (β_1 -AR) wird durch den physiologischen Liganden Norepinephrin oder die AAK (IgG) gegen die zweite extrazelluläre Schleife des β_1 -Rezeptors stimuliert. Dies aktiviert das gekoppelte G-Protein (G_{s_s}), welches seinerseits sowohl die membranständige Adenylatcyclase (AC), also auch den L-Type der Calcium Kanäle aktiviert, wodurch mehr Calcium (Ca^{2+}) in die Zelle einströmt. Die AC wandelt ATP in cAMP um, welches die Proteinkinase (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert mehrere Prozesse, die für den Calciumstoffwechsel der Zelle, und somit die Kontraktilität wichtig sind: den L-Type der Calcium Kanäle, den Ryanodinrezeptor (RyR) und Phospholamban (PLB). Die Vernetzung dieser Vorgänge hilft auf kurze Sicht die Kontraktilität des Kardiomyozyten, durch die Erhöhung des sarkoplasmatischen Calciumanteils, zu steigern. Auf lange Sicht fördert es aber die Apoptose, z. B. durch die Aktivierung der Calcium/Calmodulin Kinase II (CaMK II). Der β_1 -Rezeptor wird normalerweise desensibilisiert durch eine Phosphorylierung durch die PKA (nicht im Bild gezeigt) und durch GRK2, ein zellulärer Botenstoff, der ansteigt, wenn eine dauerhafte β_1 -Stimulation stattfindet. Dies wird durch GRK2ct gehemmt. (nach (FREEDMAN & LEFKOWITZ, 2004))

2.4. Autoantikörper gegen β 1-Rezeptoren

2.4.1. Ätiologie

Der genaue Mechanismus zur Entwicklung der Autoantikörper gegen β 1-Rezeptoren ist unklar. Es gibt jedoch verschiedene Thesen. Eine These ist die der molekularen Mimikry (HOEBEKE, 1996). Dabei passen sich Strukturen von Pathogenen denen der Wirtszellen an und werden deshalb vom Immunsystem des Wirts weniger als pathogen erkannt und bekämpft. Im Umkehrschluss können dann, sollte doch eine Immunreaktion erfolgen, sowohl das Pathogen, also auch körpereigene Strukturen vom Immunsystem bekämpft werden. Ein gutes Beispiel dafür ist die Chagas-Erkrankung, verursacht durch das Protozoon *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (ELIES et al., 1996). FERRARI et al. konnten nachweisen, dass ca. 30 % der Chagas-Patienten kreuzreaktive Autoantikörper haben, aufgrund der molekularen Mimikry zwischen dem ribosomalen Protein von *T. cruzi* und einem Teil der zweiten extrazellulären Schleife des β 1-Rezeptors (FERRARI et al., 1995). Auch für die idiopathische DCM könnte es einen solchen Mechanismus geben, bestehend in einer molekularen Mimikry zwischen der zweiten extrazellulären Schleife des β 1-Rezeptors und einem bisher unidentifizierten viralen Pathogen (MAGNUSSON et al., 1996). Eine weitere Hypothese zur Ätiologie ist, dass die Oberfläche oder das Zytoplasma von Myozyten, im Falle eines Zellschadens, selbst zum Antigen werden könnten. Ein solcher Zellschaden, verursacht z. B. durch eine (ischämische) Herzerkrankung, löst den Schutzmechanismus, der die Zellen unter physiologischen Bedingungen vor dem Immunsystem schützt, auf (ROSE, 2001), (CAFORIO et al., 2002). Ab diesem Moment könnte eine autoimmune Reaktion, z. B. gegen den β 1-Rezeptor, in Gang gesetzt werden. Auch kardiotoxische Medikamente könnten einen solchen Zellschaden und nachfolgende Immunreaktion auslösen (HUBER & MORASKA, 1992). Eine weitere Ursache könnte in einer exzessiven Immunreaktion, gekennzeichnet durch im Verhältnis weniger regulatorische T-Zellen zu mehr die Immunantwort steigernden T-Helferzellen, begründet sein. Dies wurde in einer Studie zur Ursache der idiopathischen DCM vermutet (SANDERSON et al., 1985).

2.4.2. Pathogenese der durch AAK gegen β 1-Rezeptoren ausgelösten DCM

AAK gegen β 1-Rezeptoren wirken agonistisch, also positiv inotrop und positiv chronotrop (MAGNUSSON et al., 1994). Im Gegensatz zu den physiologischen Agonisten (Adrenalin/Isoprenalin) unterliegt die Wirkung der AAK jedoch nicht einer Desensibilisierung (nachlassendes Ansprechen des Rezeptors auf die Bindung) (WALLUKAT et al., 1991). Diese ist jedoch wichtig, um die Zelle vor einer Schädigung durch Überstimulation zu schützen. Dies konnte in mehreren Studien (ENGELHARDT et al., 1999), (WOODIWISS et al., 2001) zu den kardiotoxischen Effekten der Langzeitaktivierung des β 1-Rezeptors gezeigt werden. Der Effekt der Aktivierung durch AAK ist dauerhaft und nicht auswaschbar in in-vitro Versuchen (WALLUKAT et al., 1991), (MAGNUSSON et al., 1994). Somit erfolgt eine Dauerstimulation durch die AAK, das Herz schlägt dauerhaft verstärkt inotrop (CHRIST et al., 2001) und verstärkt chronotrop (MAGNUSSON et al., 1994), was zu einer Myozytenzerstörung und nachfolgender Entwicklung einer DCM führen kann (STAUDT et al., 2003), (JANE-WIT et al., 2007). Die Bindung der AAK zum Rezeptor ist nicht kompetitiv hemmbar durch physiologische Agonisten. Dies lässt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Bindungsstellen erklären (Bindungsstelle der AAK gegen β 1-Rezeptoren: zweite extrazelluläre Schleife (WALLUKAT et al., 1995), Bindungsstelle der physiologischen Agonisten: hydrophober Bereich der Transmembrandomänen (BYWATER, 2005)) und/oder durch die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen des Rezeptors. Auch hierzu gibt es verschiedene Thesen, wie genau die AAK gegen β 1-Rezeptoren ihre agonistische Wirkung entfalten. Mehrere Autoren (MIJARES et al., 1996), (ELIES et al., 1998), (MIJARES et al., 2000), (HOEBEKE, 2001) vermuteten, dass die Wirkung der AAK eng mit einer Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation zusammenhängen könnte. Dabei wird vermutet, dass AAK gegen GPCRs 2 nebeneinanderliegende Rezeptoren oder ein Rezeptor-Dimer verbinden und dadurch in der aktiven, stimulierenden Konformation dauerhaft stabilisieren (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Eine weitere These bezieht sich auf den Aufbau und die Konformation der extrazellulären Schleifen des Rezeptors. Die zweite extrazelluläre Schleife bewegt sich teilweise in den Bereich der hydrophoben Bindungsstelle und könnte somit die Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem Liganden beeinflussen (BYWATER, 2005). Es wird

angenommen, dass die Konformation der extrazellulären Schleife durch Cysteine stabilisiert wird. Im Falle einer Mutation oder Reduktion der Cysteine reduziert sich die Affinität der Agonisten oder Antagonisten nachgewiesenermaßen deutlich (DOHLMAN et al., 1990), (NODA et al., 1994). Somit liegt die Vermutung nahe, dass eine korrekte Konformation der extrazellulären Schleife sehr wichtig für die richtige Formation der hydrophoben Liganden Bindungsstelle ist und dass AAK gegen diese extrazellulären Schleifen, wie AAK gegen β 1-Rezeptoren, dieses Gleichgewicht stören und damit die Rezeptoraktivität beeinflussen (JAHNS et al., 2000). Allgemeiner gesprochen gibt es Hinweise, dass auch äußere Faktoren sowie spezielle Stoffwechszustände, z. B. Hypoxie (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987b), Ischämie (LUKITSCH et al., 2012) und/oder Entzündung, Voraussetzung für die vollständige Umsetzung der Wirkung von AAK gegen GPCRs sind (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Dies könnte auch ein Grund sein, warum unterschiedliche Forschungsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf den Wirkmechanismus von AAK gegen GPCRs kommen (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014), da ähnliche Ausgangsbedingungen naturgemäß in biologischen Experimenten schwierig zu gewährleisten sind.

2.4.3. Klinische Bedeutung der AAK gegen β 1-Rezeptoren beim Menschen

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass AAK gegen β 1-Rezeptoren bei DCM mit einer insgesamt verschlechterten Herzfunktion (JAHNS et al., 1999), dem Auftreten von malignen ventrikulären Arrhythmien (CHIALE et al., 2001) und sogar mit dem vermehrten Auftreten des SD (IWATA et al., 2001) und einem fast 3-fach erhöhten Risiko am Herztod zu sterben (STÖRK et al., 2004) assoziiert werden konnte. Entsprechende Diagnostik- und Therapieverfahren zur AAK-assoziierten DCM sind im Fokus der Forschung.

2.4.4. Diagnostische Möglichkeiten

Es konnte gezeigt werden, dass nur ein kleiner Teil der Gesamtmenge an AAK gegen β 1-Rezeptoren, die durch einen ELISA festgestellt werden können, in der Lage ist an die native Rezeptorkonformation des β 1-Rezeptors an intakten Zellen zu binden und diesen entsprechend zu aktivieren (JAHNS et al., 1999), (JAHNS et al., 2000). Um diesen relativ kleinen Teil der agonistisch wirksamen, relevanten AAK zu detektieren, sind Testmethoden notwendig, die den Rezeptor in seiner

natürlichen Konformation beinhalten (JAHNS et al., 2006).

Bioassay (Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay (CCA)) Die Methode des CCA zur Detektion der AAK gegen β 1-Rezeptoren wurde erstmals beschrieben von WALLUKAT und WOLLENBERGER 1987(WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987a) und ist nach wie vor die einzige verlässliche Methode zur Detektion der AAK (JOSHI-BARR et al., 2016). In dieser Testmethode wird die mögliche Veränderung der Schlagfrequenz von neonatalen Kardiomyozyten von Ratten untersucht, die sich im Falle des Vorhandenseins von β 1-Rezeptor-AAK deutlich mehr als im Verhältnis zur physiologischen Liganden Bindung steigert. Mit dieser Methode konnten AAK gegen β 1-Rezeptoren in 70-80 % der DCM-Patienten festgestellt werden (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014), damit ist der CCA die bisher sensitivste Methode zur Detektion der AAK. Der Nachteil der Methode ist, dass sie sehr zeit- und materialintensiv ist (JOSHI-BARR et al., 2016). In einer aktuellen Studie wurde eine Weiterentwicklung des CCAs, ein sogenannter High-Throughput-Bioassay vorgestellt, mit dem deutlich mehr Proben unter geringerem Aufwand mit einer ähnlich guten Sensitivität wie die des original CCAs untersucht werden können (JOSHI-BARR et al., 2016).

Floureszenz-Resonanz-Energie-Transfer. Die Methode des Floureszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) misst die erhöhte intrazelluläre cAMP Produktion, die durch die Aktivierung des β 1-Rezeptors durch AAK steigt, mit einem Floureszenz-Sensor (NIKOLAEV et al., 2007). Mit dieser Methode konnten in derselben Studienpopulation mehr AAK bei DCM Patienten (Prävalenz 70 %) detektiert werden als zuvor mit einer Kombination aus ELISA, Immunfloureszenz und cAMP-Radioimmunoassay (NIKOLAEV et al., 2007).

ELISA. Der *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) ist eine gängige Methode zur Antikörperdetektion. In Studien, die einen meist Peptid basierten ELISA als Testverfahren anwendeten, konnten in 30–60 % der DCM Patienten AAK gegen β 1-Rezeptoren gefunden werden (MATSUI et al., 1995), (JAHNS et al., 1999), (HOLTHOFF et al., 2012). Neuere Verfahren, die einen zellbasierten ELISA verwenden, sind in der Lage mehr AAK bei DCM Patienten zu detektieren (HOLTHOFF et al., 2012). Ob der ELISA ein gutes Testverfahren zur Detektion von AAK gegen β 1-Rezeptoren ist, bleibt dennoch fraglich, eine aktuelle Studie von JAHNS et al. 2015 stellt zumindest die Validität von Peptid basierten ELISA

in Frage (JAHNS & BOEGE, 2015).

2.4.5. Therapieoptionen

Da die Pathogenität der AAK gegen β 1-Rezeptoren als anerkannt gilt, besteht der Bedarf für therapeutische Maßnahmen. Die erste Studie zur Immunadsorption (IA) bei DCM Patienten wurde 1996 veröffentlicht (WALLUKAT et al., 1996). Diese und andere Therapieoptionen sind im Folgenden dargestellt.

Immunadsorption. Bei der IA oder auch Immunapherese werden AAK spezifisch oder unspezifisch in einem extrakorporalen Kreislauf, vergleichbar mit einer Art Dialyse, gebunden und entfernt. In der ersten Studie zur IA bei DCM Patienten von WALLUKAT et al. 1996 konnte eine deutliche Verbesserung der Myokardfunktion nach der Entfernung der AAK durch IA nachgewiesen werden (WALLUKAT et al., 1996). Seitdem konnte in mehreren anderen Studien (DORFFEL et al., 1997), (BABA et al., 2010), (HERDA et al., 2010) der positive Effekt von IA bei DCM Patienten mit AAK gegen β 1-Rezeptoren nachgewiesen werden. In einer Studie von MÜLLER et al. 2000 konnte nicht nur 12 Monate nach der IA eine deutliche Verbesserung der linksventrikulären systolischen Funktion, sondern auch eine deutlich höhere Überlebensrate der mit IA behandelten Patienten 5 Jahre nach der Behandlung gezeigt werden (MULLER et al., 2000). Die positiven Langzeiteffekte der IA bei DCM Patienten mit AAK gegen β 1-Rezeptoren konnte in mehreren Studien (DORFFEL et al., 2004), (TRIMPERT et al., 2010), (KNEBEL et al., 2004) bestätigt werden. Der Nachteil der Behandlung mit IA ist der enorme (Geräte-) Aufwand (der Patient muss mehrere Tage stationär in einem IA-Zentrum bleiben) sowie die hohen Kosten von ca. 28 000 Euro pro Patient für die initiale Behandlung (HESSEL et al., 2004).

Aptamere. Aptamere sind synthetische, einzel- oder doppelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide, die mit einer hohen Spezifität an ihr Zielmolekül binden können. Sie besitzen dabei eine niedrige Immunogenität und Toxizität (MARQUIS & GRINDEL, 2000). Aptamere können anstatt der üblichen Immunglobulinabsorber zur Bindung der AAK gegen β 1-Rezeptoren im Zuge der IA eingesetzt werden (HABERLAND et al., 2011). Dies wurde bereits in einer Studie erfolgreich durchgeführt (WALLUKAT et al., 2012). Auch die Bindung und Elimination von AAK gegen GPCRs durch Aptamere in vivo konnte erstmals

im Tiermodell mit spontan hypertensiven Ratten erfolgreich gezeigt werden (HABERLAND et al., 2014). Aktuell ist ein neues Aptamer für die Neutralisation der AAK gegen GPCRs, inklusive der AAK gegen β 1-Rezeptoren, im Fokus der Forschung und könnte möglicherweise in der Zukunft als einfach applizierbares, günstigeres Medikament die Therapie mittels IA ersetzen und bei mehreren durch AAK gegen GPCRs mediierte Erkrankungen eingesetzt werden (HABERLAND et al., 2016).

Peptide. Eine von ANDERTON 2001 vorgeschlagene Therapieoption beinhaltet die Verhinderung der Bildung von AAK gegen β 1-Rezeptoren, indem man mit speziellen Peptiden die antikörperproduzierenden B-Zellen unterdrückt (ANDERTON, 2001). Somit könnte der Prozess der AAK Entwicklung in einem frühen Stadium gestoppt werden. Ein neues zyklisches Peptid erfüllte in einer Studie von BOIVIN et al. genau diesen Zweck und neutralisierte zusätzlich bereits vorhandene AAK gegen β 1-Rezeptoren im Tiermodell (Ratten) in vivo (BOIVIN et al., 2015). Das Peptide (COR-1), ausgerichtet auf die zweite extrazelluläre Schleife des β 1-Rezeptors, wurde zuvor nach erfolgreichen Versuchen im Tiermodell bereits einer Phase 1 Studie an Menschen getestet (MUNCH et al., 2012).

Beta-Blockade. Die positiven Effekte des Einsatzes von β -Blockern bei der DCM des Menschen konnten in mehreren großen Studien (GARG & SORRENTINO, 2001) bewiesen werden. Ein möglicher Erklärungsversuch dazu könnte die zumindest partielle Verdrängung von eventuell vorhandenen AAK gegen β 1-Rezeptoren sein (JAHNS et al., 2000), (FREEDMAN & LEFKOWITZ, 2004), wenn die Betablocker in der Lage wären die pathogene Wirkung der AAK auszugleichen. Unterstützende Hinweise für diese These konnten in einer Studie von BOIVIN herausgestellt werden, in den der Betablocker Bisoprolol bei Ratten zumindest die Progression der DCM aufhalten konnte (BOIVIN et al., 2015). In einer Studie von NIKOLAEV konnte keine vollständige Blockade des β 1-Rezeptors durch Bisoprolol alleine erreicht werden, erst eine Kombination aus Bisoprolol mit einem Peptid erwirkte eine vollständige Betablockade (NIKOLAEV et al., 2007).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Patientenauswahl

1.1. Vorbemerkungen

Alle in der Studie untersuchten Hunde wurden in der Tierkardiologie München der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München im Rahmen einer Langzeitstudie zur DoCM vorgestellt, die seit dem Jahre 2004 unter der Leitung von PD Dr. Gerhard Wess läuft. Die Hunde wurden im Rahmen der Studie meistens ab einem Alter von 2 Jahren zu Vorsorgeuntersuchungen vorgestellt und nachfolgend einmal jährlich nachuntersucht. Die Kontrollintervalle wurden verkürzt auf 3 – 6 Monate, wenn kardiologische Auffälligkeiten festgestellt wurden. Alle Untersuchungen erfolgten mit der schriftlichen Einwilligung der Tierbesitzer.

1.2. Einschlusskriterien

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Hunde der Rasse DP untersucht. Die Tiere waren alle in Privatbesitz, es wurden keine Tiere für die Studie gezüchtet oder gehalten. Damit ein Hund in die Studie aufgenommen werden konnte, musste vom gleichen Tag eine klinische Untersuchung, eine vollständige echokardiographische Untersuchung, ein Holter-EKG mit einer Aufzeichnungszeit von 24 Stunden und eine Serumblutprobe vorhanden sein. Die relevanten Messwerte der echokardiographischen Untersuchung waren die Volumenmessungen des linken Ventrikels mittels der SMOD am Ende der Diastole und Systole bezogen auf die Körperoberfläche (SMODd/BSA und SMODs/BSA). Die Referenzwerte zur SMOD Messung sind SMODd/BSA: $< 95 \text{ ml/m}^2$ und SMODs/BSA: $< 55 \text{ ml/m}^2$ (WESS et al., 2010d). Die relevanten Holterkriterien waren die maximale Anzahl der VES in 24 Stunden sowie maligne Arrhythmiekriterien, wie die FR und das Vorhandensein von Vtach. Ein Hund galt als Arrhythmie krank, wenn er > 100 VES in 24 Stunden hatte. Wenn ein Hund weniger als 100 VES/24 Stunden hatte, dafür aber eine FR über 260/min und/oder das Auftreten von Vtach, wurde er, aufgrund des Vorhandenseins dieser malignen Arrhythmiekriterien, dennoch als Arrhythmie krank eingestuft.

1.3. Fragestellungen und Gruppeneinteilung

Die Fragestellungen für die vorliegende Studie waren:

- (1) Gibt es AAK bei DP und wie häufig kommen diese bei gesunden und an DoCM erkrankten Hunden vor?
- (2) Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Krankheitsformen der DoCM in Bezug auf die AAK-Messung?
- (3) Wie entwickeln sich AAK mit Fortschreiten der DoCM?
- (4) Gibt es eine Korrelation der vorhandenen AAK und Kovariaten der kardiologischen Untersuchung?
- (5) Entwickeln gesunde Hunde mit AAK später eine DoCM?

Zur Beantwortung der Fragestellungen (1) – (3) wurden – wie nachfolgend dargestellt – verschiedene Gruppen gebildet. Eine Übersicht der Gruppen ist in Abbildung 5 dargestellt. Für die Fragestellungen (4) und (5) wurde eine Regressionsanalyse von Kombinationen dieser Gruppen durchgeführt (s. u.).

Gruppe „DoCM“. Zur Beantwortung der Fragestellung, ob an DoCM erkrankte Hunde AAK gegen β 1-Rezeptoren aufweisen, wurden an okkulter DoCM erkrankte Hunde in die Gruppe „DoCM“ eingeschlossen. Ein Hund wurde als an DoCM erkrankt bezeichnet, wenn er entweder echokardiographische Veränderungen zeigte und/oder Arrhythmien im Holter-EKG aufgetreten waren. Bei allen eingeschlossenen Patienten wurde eine AAK-Messung durchgeführt.

Untergruppen der Gruppe „DoCM“. Die Gruppe „DoCM“ wurde aufgrund der unterschiedlichen Krankheitsformen der DoCM (siehe II.1.3) in 3 Untergruppen unterteilt, siehe auch Abbildung 3. Dies diente der Beantwortung der Fragestellung (2), ob es Unterschiede bei den AAK-Werten zwischen verschiedenen Verlaufsformen der DoCM gibt.

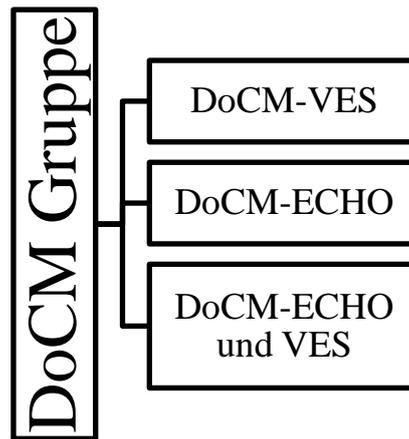


Abbildung 3: Unterteilung der DoCM Gruppe

In die Untergruppe „DoCM–ECHO“ wurden Hunde eingeschlossen, wenn sie ausschließlich eindeutige echokardiographische Veränderungen zeigten, das heißt, dass die SMOD Messungen sowohl diastolisch als auch systolisch über dem Referenzbereich lagen. Diese Hunde mussten zusätzlich ein unauffälliges Holter-EKG aufweisen, definiert als unter 100 VES und keine maligne Arrhythmien 24 Stunden.

In die Untergruppe „DoCM–VES“ wurden Hunde eingeschlossen, die nur Arrhythmien aufwiesen, aber keine eindeutigen echokardiographischen Veränderungen. Eine isolierte Erhöhung einer der SMOD Werte (diastolisch oder systolisch) wurde für diese Gruppe akzeptiert, so lange es keine eindeutigen Echoveränderungen waren.

In die Untergruppe „DoCM–ECHO und VES“ wurden Hunde eingeschlossen, die sowohl eindeutige echokardiographische Veränderungen zeigten, wie für die Untergruppe „DoCM–ECHO“ definiert, und zusätzlich Arrhythmien im Holter-EKG festgestellt werden konnten.

Gruppe „Initial-gesund“ und Kontrollgruppe. Zur Beantwortung der Fragestellung, ob auch gesunde DP AAK gegen β 1-Rezeptoren aufweisen, wurde eine Kontrollgruppe gebildet. Dafür wurde in einem ersten Schritt eine Gruppe aus DP gebildet, die initial eine vollständig unauffällige kardiologische Untersuchung sowie eine AAK-Messung hatten (Gruppe „Initial-gesund“). In der kardiologischen Untersuchung mussten die echokardiographischen Messungen des linken Ventrikels im Referenzbereich liegen und in 24 Stunden Holter-EKG-

Aufzeichnung musste der Hund < 100 VES sowie keine malignen Arrhythmien aufweisen. Im zweiten Schritt wurden die Hunde nachverfolgt: Die Hunde, die bis zum Zeitpunkt der Auswertung (August 2016) noch immer gesund waren oder eines nicht kardialen Todes gestorben waren, wurden in die Kontrollgruppe eingeschlossen. Hunde, die erkrankten, wurden, wenn sie die Einschlusskriterien erfüllten, in die Verlaufsgruppe eingeschlossen. Abbildung 5 zeigt eine Übersicht über die Gruppen und die Entstehung der Kontrollgruppe.

Verlaufsgruppe. Zur Beantwortung der Frage: „Wie entwickeln sich AAK mit Fortschreiten der DoCM?“ wurde die Verlaufsgruppe gebildet. Eingeschlossen wurden Hunde, die die Stadien „gesund“ (V1), „Arrhythmien“ (V2) und „echokardiographische Veränderungen“ (V3) in dieser Reihenfolge durchliefen, siehe auch Abbildung 4. Die Einschlusskriterien waren wie für die Unterteilung der Gruppe „DoCM“ definiert. In allen Stadien wurden AAK-Messungen durchgeführt.

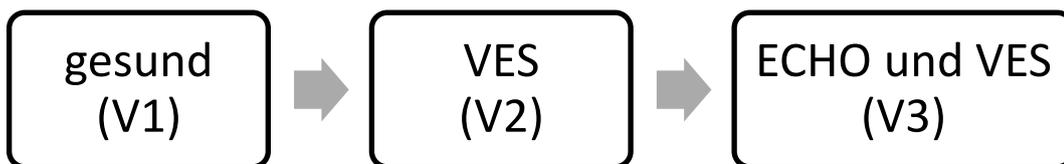


Abbildung 4: Stadien der Verlaufsgruppe

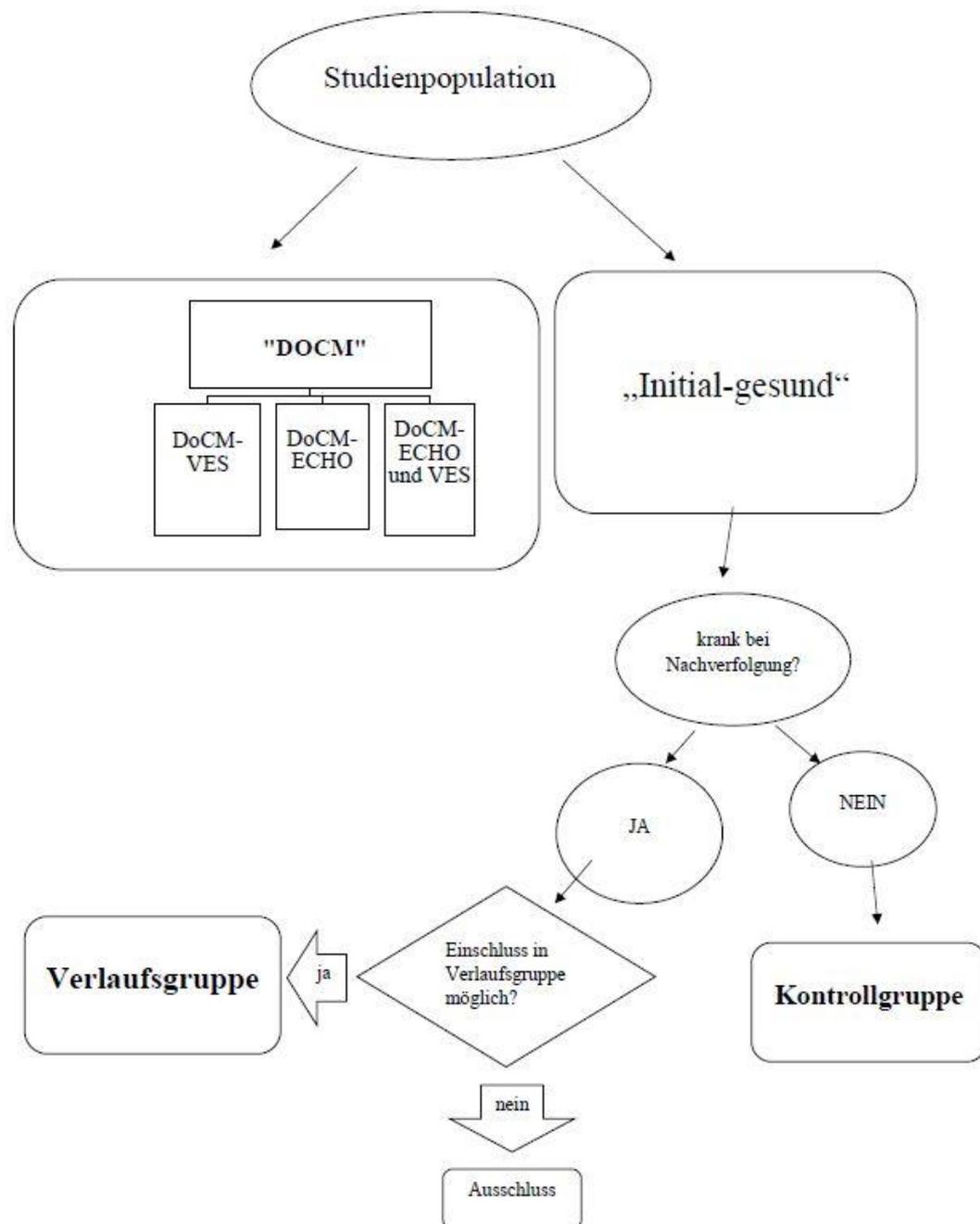


Abbildung 5: Übersicht über die Studienpopulation und Einteilung in Gruppen.

Bezüglich der Fragestellungen (4) und (5) wurde eine statistische Analyse mittels Regressionsanalyse durchgeführt. Nachfolgend ist die Zusammensetzung der Gruppen für die Analyse der verschiedenen Fragestellungen beschrieben.

Gruppenauswahl zur Korrelation. Um die Frage zu beantworten, ob es eine Korrelation zwischen vorhandenen AAK und Kovariaten der kardiologischen Untersuchung gibt, wurden die Gruppen „DoCM“ und „Initial-gesund“ mit einer Regressionsanalyse statistisch ausgewertet. Es wurde eine mögliche Korrelation

zwischen dem Vorhandensein von AAK gegen β_1 -Rezeptoren und den Kovariaten der Herzgröße, Arrhythmien, kardiale Todesursache oder das Auftreten von Sekudentod untersucht.

Gruppenauswahl zur Risikoanalyse. Um die Frage zu beantworten, ob das Vorhandensein von AAK bei gesunden Hunden mit einem höheren Risiko verbunden ist, im späteren Leben eine DoCM zu entwickeln, wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Dafür wurden alle Hunde der Gruppe „Initial-gesund“, inklusive der Daten der Nachverfolgung, in die Analyse aufgenommen.

1.4. Ausschlusskriterien

In allen Gruppen wurden Hunde mit schwerwiegenden systemischen Erkrankungen, DoCM im overt Stadium (CHF) oder anderen kardialen Erkrankungen ausgeschlossen. Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine unvollständige kardiologische Untersuchung oder fehlende Messungen der SMOD (z. B. aufgrund von schlechter Schallqualität). Aus der Verlaufsgruppe wurden jene Tiere ausgeschlossen, die nach dem gesunden Stadium gleichzeitig VES und echokardiographische Veränderungen entwickelt hatten.

2. Kardiologische Untersuchung

2.1. Vorbemerkungen

Die kardiologische Untersuchung der Hunde wurde ausschließlich in der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2.2. Signalement und Anamnese

Für die Studie wurden ausschließlich Hunde der Rasse DP untersucht (siehe Abschnitt 1). Mit dem Besitzer wurden wichtige Punkte der Anamnese besprochen, wie das Allgemeinbefinden und die Leistungsfähigkeit des Hundes, das Atemmuster und die Atemfrequenz in Ruhe, mögliches Auftreten von Husten, Taumeln oder Synkopen, sowie die Futter- und Wasseraufnahme und der Kot- und Urinabsatz.

2.3. Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung

Es wurde bei jedem Patienten eine allgemeine klinische Untersuchung

vorgenommen. Der besondere Fokus lag auf der kardiovaskulären Untersuchung, in der die Farbe der Schleimhäute und die kapilläre Füllungszeit (KFZ), die Auskultation von Herz (Herztöne, Rhythmus, Herzgeräusche) und Lunge, sowie die Pulsqualität an der Arteria femoralis, beurteilt wurden. Alle Befunde wurden digital dokumentiert.

2.4. EKG (Kurzzeit- und Langzeit EKG)

Bei jeder Untersuchung wurde sowohl ein Kurzzeit-EKG als auch ein Langzeit-EKG (Holter-EKG) durchgeführt, um mögliche Arrhythmien identifizieren und bewerten zu können. Die dabei eingesetzten Geräte finden sich in Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte.

Für das Kurzzeit-EKG wurde der zu untersuchende Hund in die rechte Seitenlage verbracht. Das EKG wurde mit Metallklemmen in Hautfalten aller 4 Gliedmaßen und am Brustkorb, an der Stelle des fühlbaren Herzspitzenstoßes, befestigt. Zur besseren Ankopplung wurde die Haut mit medizinischem Alkohol benetzt. Es wurden die Standardableitungen nach Einthoven (I, II, III) und Goldberger (aVL, aVR, aVF), sowie eine Brustwandableitung aufgezeichnet.

Für das Holter-EKG wurde dem Hund im Stehen an beiden Seiten der seitlichen Brustwand 5 ca. 4 x 3 cm große Stellen frei rasiert und mit medizinischem Alkohol die Haut entfettet. An diesen Stellen wurden nach dem Abtrocknen der Haut die 5 Elektroden mit Klebepads auf die Haut geklebt, auf beiden Seiten jeweils ca. 1 Handbreit hinter dem Schulterblatt und 1 Handbreit ventral der Wirbelsäule, die Elektroden untereinander angeordnet, mit ca. 35 cm Abstand dazwischen. Die Elektroden und das Kabel wurden mittels Klebeband und mehreren Schichten Verbandsmaterial am Brustkorb fixiert. Zusätzlich wurde dem Hund eine Spezialweste aus Neopren in der passenden Größe angezogen, um eine möglichst ungestörte Bewegung des Hundes und dennoch gute EKG Aufzeichnung zu gewährleisten. Zuletzt wurde der Holter Monitor an das Kabel angeschlossen und die Aufzeichnung der Ableitungen vor dem Start überprüft. Es waren verschiedene Geräte im Einsatz, unter anderem der Firma Custo und Amedtec (siehe Liste der verwendeten Geräte in Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte). Die Aufzeichnungsdauer betrug 24 Stunden. Die Besitzer wurden während dieser Zeit dazu angehalten, ein Protokoll über die Aktivitäten des Hundes zu führen. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde das EKG entweder von

einem Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik abgenommen, oder vom Besitzer zu Hause und danach auf dem Postweg zurück zur Klinik geschickt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software der einzelnen Geräte, jede EKG Auswertung wurde manuell auf mögliche Analysefehler kontrolliert und solche korrigiert.

2.5. Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung wurde ausschließlich von einem Spezialisten für Tierkardiologie (PD Dr. Gerhard Wess, Dipl. ACVIM (Cardiology), ECVIM (Internal Medicine and Cardiology)) oder einem Kardiologie-Resident (ECVIM oder ACVIM) unter dessen Aufsicht durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte transthorakal, ohne Sedation, im Beisein des Besitzers, in linker und rechter Seitenlage, auf einem speziellen Tisch mit Aussparung im Brustkorbbereich, um von unten mit der Sonde den Brustkorb des Hundes zu untersuchen. Auf ein Scheren des Fells wurde verzichtet, stattdessen wurde die Ankopplung der Sonde durch das Auftragen von medizinischem Alkohol und Ultraschallgel optimiert. Während der Untersuchung wurde ein 2-kanaliges EKG am Hund angebracht, zur Erfassung von möglichen Arrhythmien und für die Exaktheit der nachfolgenden Messungen. Der Untersuchungsgang begann auf der rechten Seitenlage, es wurden Aufnahmen der rechtsparasternalen Längs- und Kurzsachse, sowie Aufnahmen für die Messungen im M-Mode und der SMOD erfasst. Alle Herzklappen wurden von links und rechts mit Farbdoppler evaluiert, der Pulmonal- und Aortenfluss, sowie die Druckverhältnisse bei möglich vorhandenen Klappeninsuffizienzen wurden mit Spektraldoppler (*pulsed-wave* (PW)- und/oder *continuous-wave* (CW)-Doppler) erfasst. Bei allen Aufnahmen wurden mindestens 3 Herzzyklen gespeichert. Von der linken Seitenlage wurden die linksparasternale Längsachse im 4- und 5-Kammerblick erfasst.

Die Messungen wurden umgehend am Ultraschallgerät durchgeführt, nachdem die Untersuchung am Tier selbst abgeschlossen war. Die Messungen der SMOD wurden in den Aufnahmen der rechts- und linksparasternalen Längsachse im 2-, bzw. 4-Kammerblick durchgeführt. Um den Durchmesser der einzelnen Scheiben zu berechnen wird die Endokardgrenze nachgezogen, wie von WESS et al. 2010 beschrieben (WESS et al., 2010d). Außerdem wurden die Kammerdimensionen des linken Ventrikels im M-Mode der rechtsparasternalen Längs- und Kurzsachse gemessen. Dabei wurde der Durchmesser des interventrikulären Septums, des

linken Ventrikels und der linksventrikulären freien Wand, EKG-geführt jeweils am Ende der Diastole und Systole gemessen (BONAGURA, 1983). Das linke Atrium (LA) wurde im zweidimensionalen (2D) Bild, auf Höhe der Herzbasis, im Verhältnis zur Aorta (Ao) im Querschnitt gemessen (LA: Ao). Alle Aufnahmen und Messungen wurden offline in einer speziellen Ultraschallsoftware (Echopac) gespeichert und in der Patientenakte (Vetera) digital dokumentiert.

2.6. Blutprobenentnahme, Verarbeitung und Lagerung

Im Rahmen der Untersuchung wurde jedem Hund für den Zweck einer Routineuntersuchung Blut entnommen, von dem eine zusätzliche Probe für die AAK-Messung asserviert wurde. Dies erfolgte ohne Sedation, bevorzugt aus der Vena jugularis, in Einzelfällen auch aus der Vena cephalica oder Vena saphena lateral. Die Haut wurde an der Entnahmestelle geschoren und mit medizinischem Alkohol desinfiziert. Zur Blutentnahme wurden eine 20G bis 22G Kanüle benutzt. Für die AAK-Messungen wurden pro Tier 2 ml Vollblut entnommen und in Serumröhrchen verbracht. Das Serum wurde nach 30 Minuten Wartezeit bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert und nachfolgend in Mikroröhrchen zu 2 ml abpipetiert. Die Proben wurden mit Datum, Name des Tierbesitzers, Name des Hundes und ID der Praxissoftware (Veteranummer) beschriftet und bis zum Versand zur Firma Berlin Cures GmbH in Berlin zur AAK Messung gesammelt, tiefgefroren eingelagert bei -80°C . Die gesammelten Proben wurden dann gekühlt per DHL Express verschickt.

3. Messung der Autoantikörper mittels Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay (Bioassay)

3.1. Vorbemerkungen

Die Ermittlung der Autoantikörperaktivität erfolgte mit Hilfe eines „Bioassays“, dem Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay (CCA). Die Messungen erfolgten im Labor der Firma Berlin Cures GmbH in Berlin. Die für die Herstellung des Bioassays notwendigen neonatalen Ratten wurden aus dem Tierhaus des Max-Delbrück-Centrums, Berlin bezogen. Die Nummer der Tötungsanzeige lautet Y 9008/12. Die nachfolgende Beschreibung der Methode bezieht sich auf die Entwicklung und Beschreibung der Methode von Wallukat und Wollenberger von 1987 (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987a).

3.2. Zellpräparation und Kultivierung der Kardiomyozyten

Für den CCA wurden Herzmuskelzellen von neonatalen Ratten präpariert und kultiviert. Die Arbeitsschritte sind in Abbildung 6 sowie im nachfolgenden Text dargestellt. 3 Tage alte Ratten wurden mittels Scherenschlag dekapitiert. Anschließend erfolgte die Desinfektion des Thoraxes mit 70 % Ethanol. Der Thorax wurde eröffnet und das Herz mittels einer Pinzette entfernt. Die Atrien wurden durch einen Schnitt mit einem Skalpell entfernt und verworfen. Das übrige Herzventrikelgewebe wurde in kalter Pufferlösung (PBS) aufgenommen und mit dem Skalpell in ca. 1 mm³ kleine Stücke zerschnitten. Zur Auflösung des Zellverbandes wurde 0,2 % Trypsinlösung dazugegeben und bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Magnetrührers bei geringer Umdrehungszahl 15 Minuten gerührt. Dieser Prozess, auch Trypsinierung genannt, wurde durch die Zugabe von Kälberserum gestoppt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben. Diese Abfolge wurde 3 x wiederholt, um das Herzgewebe völlig zu dissoziieren um möglichst viele Kardiomyozyten zu erhalten. Das gewonnene Zellpellet wurden mit kompletten Kulturmedium SM20-I resuspendiert und auf die Zellkulturflaschen (Falkon 12,5 cm²) verteilt. Die Kardiomyozyten wurden bis zu ihrer Benutzung in einem auf 37°C temperierten Brutschrank kultiviert. Am 1. Tag nach der Präparation erfolgte eine Waschung der Kardiomyozyten mit PBS, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nachfolgend wurden die Zellen täglich mit frischen SM20-I Kulturmedium versorgt. Die Präparation wurde als erfolgreich angesehen, wenn die Basalschlagfrequenz der Kardiomyozyten zwischen 100-220 Schlägen/min lag. Die Zellen wurden bis zu 5 Tagen für den CCA benutzt, außer wenn die Basalschlagfrequenz über oder unter dem geforderten Wert lag.

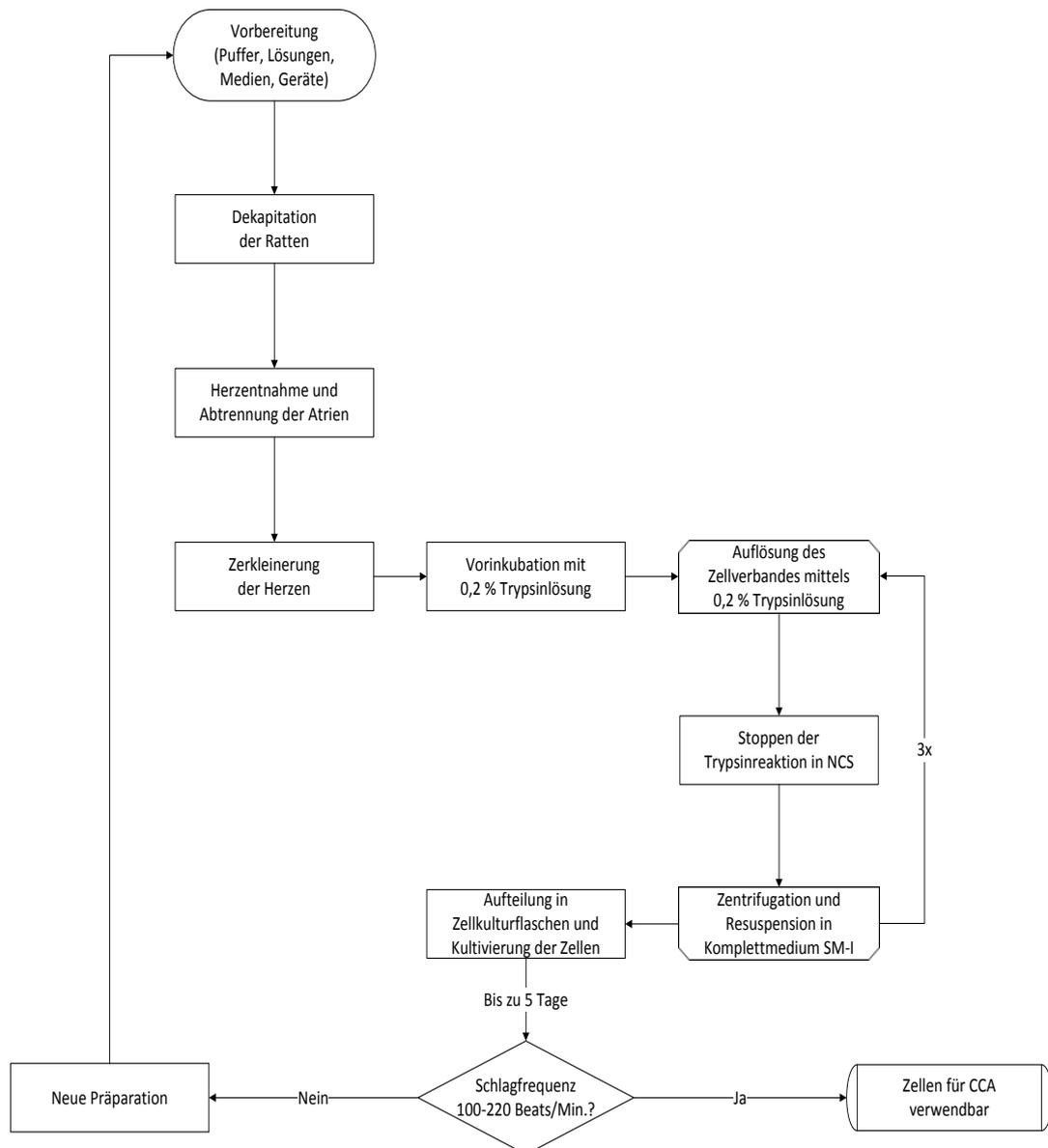


Abbildung 6: Fließdiagramm zur Zellpräparation und Kultivierung der Kardiomyozyten (nach der Laborarbeitsanweisung der Firma Berlin Cures GmbH)

3.3. IgG Präparation der Serumproben

Die Präparation der Immunglobuline (IgG) aus den Serumproben ist die Voraussetzung für die Durchführung der Messung der AAK mittels des CCA. Die Präparation der IgG erfolgte durch eine Ammoniumsulfatfällung, und nachfolgender Dialyse. Die aufeinanderfolgenden Arbeitsschritte sind in Abbildung 7 in einem Fließdiagramm dargestellt.

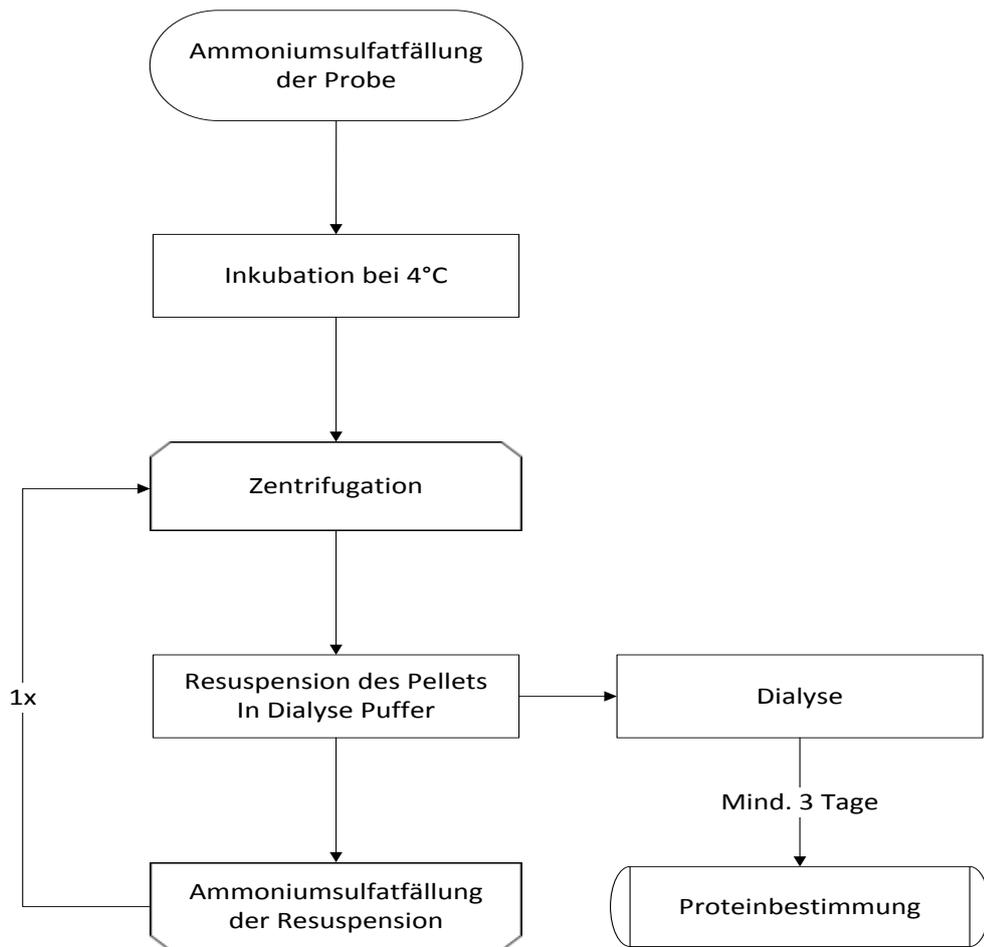


Abbildung 7: Fließdiagramm zur IgG-Präparation der Serumproben (nach der Laborarbeitsanweisung der Firma Berlin Cures GmbH)

Das tiefgefrorene Hundeserum wurde bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Das Serum (500 μ l) wurde in Eppendorfröhrchen (2 ml) überführt und mit 333 ml kaltgesättigter Ammoniumsulfatlösung tropfenweise versetzt. Dieses Serum-Ammoniumsulfat-Gemisch wurde für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 6000 Umdrehungen/min und 12°C für 10 Minuten in einer Hereus-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das gewonnene Pellet wurde mit 500 μ l Dialysepuffer resuspendiert und erneut mit Ammoniumsulfat (500 μ l) gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 400 μ l einer phosphatgepufferten NaCl-Lösung resuspendiert. Zur Entfernung des Ammoniumsulfates bzw. der niedermolekularen Bestandteile wurden die Proben für mindestens 3 Tage in 1 Liter Dialysepuffer, bei täglichem Wechsel des Puffers, dialysiert. Anschließend wurde der Proteingehalt im Dialysat bestimmt und die Aliquots bei -20°C tiefgefroren und gelagert.

3.4. Durchführung der Messung

Bevor das präparierte Serum auf die Kardiomyozyten gegeben werden konnte, musste die Basalschlagfrequenz der kultivierten Kardiomyozyten bestimmt werden. Diese Messungen erfolgten mit Hilfe eines Umkehrmikroskops (Zeiss) und eines Ion Optix Messplatzes (Abbildung 8 zeigt einen solchen Arbeitsplatz). Die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten ist temperaturabhängig, weshalb ein konstant beheizbarer Mikroskopiertisch (37°C) eingesetzt wurde.



Abbildung 8: Mikroskop mit beheizbarem Mikroskopiertisch und Zellkulturflaschen (Quelle: Firma Berlin Cures GmbH)

Die Zellkulturflaschen wurden ca. 5 Minuten vor Beginn der Messung aus dem Brutschrank auf den Mikroskopiertisch verbracht, damit sich die Zellen akklimatisieren konnten. In den Zellkulturflaschen wurden 4 – 6 beliebige Blickfelder (ohne Arrhythmien) ausgewählt und markiert, die verschiedenen Messpunkte wurden ausgewählt um physiologische Variationen der Schlagfrequenz auszugleichen. Nun wurde in jedem Blickfeld mit Hilfe des Ion Optics Myocyte Contractility Systems die Basalschlagfrequenz gemessen. Dazu wurden regelmäßig kontrahierende Herzzellen, bzw. Zellcluster ausgewählt. Die Bewegung der Kardiomyozytenmembran, die sich in einer Hell-Dunkel Oszillation widerspiegelt, wurde vom Ion Optic System erfasst und aufgezeichnet, Abbildung 9 zeigt eine solche digitale Aufzeichnung. Die Kontraktion des Kardiomyozyten wurde für 15 Sekunden aufgezeichnet und

nachfolgend die Schlagfrequenz bestimmt.



Abbildung 9: Bestimmung der Schlagfrequenz, anhand der Kontraktionskurven der Herzmuskelzellen, aufgezeichnet über 15 Sekunden. (Quelle: Firma Berlin Cures GmbH)

Nach der Bestimmung der Basalschlagfrequenz der Kardiomyozyten, wurde ein Aliquot der präparierten Serumprobe aufgetaut. 40 μl des IgG Präparats (Verdünnung 1:50) wurden in die Zellkulturflasche gegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Zur Entfaltung der maximalen Wirkung möglicher AAK wurden die Zellkulturflaschen für 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert, danach wurde die Schlagfrequenz an den bereits markierten 4 – 6 Blickfeldern erneut gemessen. Im Falle einer durch die IgG Präparation verursachten Schlagfrequenzerhöhung wurden zur Ermittlung der Spezifität der Aktivierung verschiedene Antagonisten der G-Protein gekoppelten Rezeptoren eingesetzt. Als Antagonist der angenommenen AAK gegen β_1 -Rezeptoren wurde der spezifische β_1 -Blocker Bisoprolol (1-5 μM) eingesetzt. Erfolgte unter dem Einsatz von Bisoprolol eine Verminderung der basalen Schlagfrequenz, wurde durch die Zugabe von Atropin (1 μM) geprüft, ob zusätzlich zum β_1 -AAK ein weiterer Antikörper, der gegen den muskarinergen M2 Rezeptor gerichtet ist, in den Serumproben vorhanden ist. Im Falle eines plötzlichen Rhythmuswechsels (Änderung der Schlagfrequenz der Zellen) während der Messung wurden die Messergebnisse verworfen und ein neuer Messansatz durchgeführt. Ein Beispiel einer Messung ist in Abbildung 10 dargestellt.

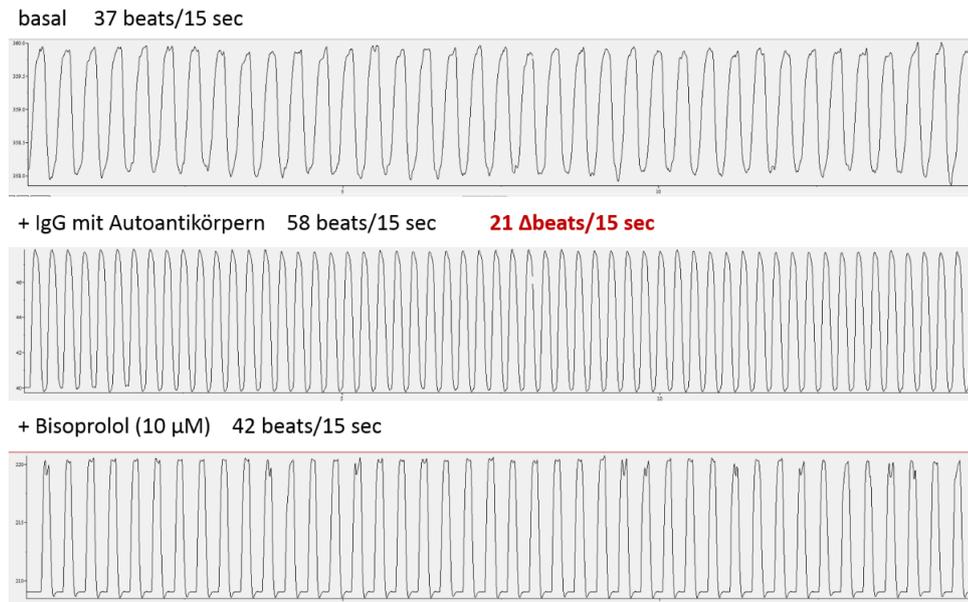


Abbildung 10: Beispiel einer Probenmessung mit Ion Optics (Es ist eine deutliche Steigerung der Schlagfrequenz nach Zugabe der Probe messbar. Nach der Zugabe von Bisoprolol normalisiert sich die Schlagfrequenz wieder, die Bestätigung für das Vorhandensein von spezifischen β 1-AAK.) (Quelle: Firma Berlin Cures GmbH)

3.5. Nachbehandlung der Kardiomyozyten

Nach der Messung wurde das Kulturmedium mit dem IgG-Präparat aus der Zellkulturflasche abgesaugt und verworfen. Die Kardiomyozyten wurden 2 x mit 4 ml der Pufferlösung PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde erneut 2 ml frisches komplettes Kulturmedium auf die Kardiomyozyten gegeben und im Brutschrank bei 37°C für weitere Versuche kultiviert. Die Kardiomyozyten konnten somit für weitere Versuche bei entsprechender Qualität wiederverwendet werden.

3.6. Auswertung der Messergebnisse

Zur Auswertung der Messergebnisse wurde die Differenz (Δ) zwischen der Basalschlagfrequenz und der Schlagfrequenz der Zellkultur mit der Probe berechnet. (Δ Schlagfrequenz = Schlagfrequenz mit Probe – Basalschlagfrequenz). Der Grenzwert für eine eindeutig positiv chronotrope Wirkung, verursacht durch die AAK gegen β 1-Rezeptoren, lag bei $> 4 \Delta$ Schlägen/Minute (bpm), der Grenzwert für eine eindeutig negativ chronotrope Wirkung lag bei -4Δ bpm (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987a). Im Falle der Erhöhung der Schlagfrequenz (positive Chronotropie) wurde Bisoprolol zur Mischung gegeben, um spezifisch die β 1-Rezeptoren zu blockieren. Eine

nachfolgende Normalisierung der Schlagfrequenz zurück zur Basalschlagfrequenz wurde als Bestätigung des Vorhandenseins der AAK gegen β 1-Rezeptoren interpretiert. Im Falle der Erniedrigung der Schlagfrequenz (negative Chronotropie) wurde durch die Zugabe von Atropin spezifisch die muskarinergen M2-Acetylcholinrezeptoren blockiert. Wenn sich nachfolgend die Schlagfrequenz normalisierte, wurde dies als Bestätigung für das Vorhandensein von AAK gegen den muskarinergen M2-Rezeptor Subtyp interpretiert.

4. Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in den folgenden Tabellen aufgelistet:

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Produktbezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	LC 2200P	Sartorius
Biologische Sicherheitswerkbank Klasse II	S2020 1,5	Thermo Scientific
Brutschrank	Funktion Line, B6/UB6	Heraeus, Thermo Electron Corporation
CO2 Inkubator mit Heissluftsterilisation	CB 150	Binder
Einstichthermometer	HI 98509 Checktemp 1	Hanna Instruments
EKG		
Ruhe-EKG	Cardiovit AT-10	Schiller Medizintechnik GmbH
Holter-EKG	Custo tera (Custo flash 200/220 amedtec ECG pro EP 810	Arcon Systems GmbH Medizintechnik Aue GmbH
Holter EKG Kabel	z. B. amedtec P/N 350	amedtec
Gefrierschrank – 80 °C	Hera freeze	Alliance
Holterweste	Dogleggs	Dogleggs LLC,

Kühl-/Gefrierschrank	KGT 3946 RB29FERNBWW	Liebherr Premium Samsung
Kühlschrank	KSV36VW40	Bosch
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 2002	Heidolph
Mikroskop (Durchlicht-Hellfeld und Phasenkontrastmikroskop)	Axio Observer.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Mikroliterzentrifuge	Biofuge fresco™	Heraeus™
Präzisionswaage	SBC 21	Scaltec
Ultraschallgerät	Vivid 7	GE Medical Systems,
Ultraschallsonde	M3S (1,5-4,0 MHz Bandbreite)	GE Medical Systems,
Zentrifuge	Universal 32 R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge	Universalzentrifuge (Multifuge X1R)	Thermo Scientific/Heraeus

Tabelle 4: Liste der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller
Dialyseschlauch	Dialyseschlauch	Carl Roth GmbH
EKG Klebeelektroden	ECG Elettrodes	Covidien, Kendall
Kanülen	22 G (0,7 x 30 mm)	BD Microlance
	20 G (0,9 x 40 mm)	BD Microlance
	Venofix A Luer Lock 19 G (1,1 x 20 mm, L: 30 cm)	Braun
Mikroröhrchen	Mikroröhre 2 mL mit Verschluss	Sarstedt
Multi-Sicherheitsreaktionsgefäße	1 mL	Carl Roth GmbH
Petrischalen	Steril, Ø10 cm	Thermo Fischer Scientific
Pipettensatz „IgG“		

Pipette 100-1000 µL	mLine	Sartorius/BioHit
Pipette 10–100 µL	mLine	Sartorius/BioHit
Pipette 0,5–100 µL	mLine	Sartorius/BioHit
Pipettensatz "IgG-Ersatz"		
Pipette 100- 1000 µL	Research	Eppendorf
Pipette 10–100 µL	Research	Eppendorf
Pipette 0,5–10 µL	Research	Eppendorf
Reaktionsgefäße	2 ml SafeSeal	Sarstedt
Serologische Pipetten	5 mL	Sarstedt
	10 mL	Sarstedt
	25 mL	Sarstedt
Serumröhrchen	Serumröhrchen 4,5 ml	Sarstedt
Sterilfilter	Steritop 0,22 µm	Millipore
Ultraschallgel	Ultraschallgel für medizinische Anwendung	Gello GmbH
Verbandsmaterialien		
Watte	Hartmann Watte	Paul Hartmann AG,
Flexus Binden	Peha-Haft, latexfrei	Paul Hartmann AG,
Zellkulturflaschen	25 ml, 12,5 cm ²	VWR
Zentrifugenröhrchen	50 mL	Carl Roth GmbH
	15 mL	Carl Roth GmbH

Tabelle 5: Liste der Reagenzien und Chemikalien (BC)

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Ammoniumsulfat-Lösung	Mind. 76 g AS in 100 mL dest. H ₂ O	Carl-Roth-GmbH
Sörensen-Stammlösung A (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	10,3 g NaH ₂ PO ₄ in 1000 mL dest. H ₂ O	Carl-Roth-GmbH

Sörensen-Stammlösung B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	11,9 g in Na_2HPO_4 in 1000 mL dest. H_2O	Carl-Roth-GmbH
PBS Puffer nach Sörensen (PBS n.S.)	818 mL Stammlösung B, auf 1000 mL mit Stammlösung A auffüllen	Carl-Roth-GmbH
Dialyse Puffer	9 g NaCl + 150 mL PBS n.S. in 850 mL A. dest.	Carl-Roth-GmbH

5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit der statistischen Beratung der LMU (STABLAB). Abgesehen von der deskriptiven Statistik wurde eine logistische und lineare Regressionsanalyse des gesamten Datensatzes durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von AAK gegen β_1 -Rezeptoren und verschiedenen binären Kovariaten, wie der Herzgröße insgesamt, dem Vorhandensein von Arrhythmien, einer kardialen Todesursache und dem Sekudentod, sowie metrischen Kovariaten wie der diastolisch und systolisch gemessenen Herzvolumina (SMODd/BSA und SMODs/BSA), kontrolliert für Alter und Geschlecht, herzustellen. Um einen möglichen Einfluss der AAK auf die Entwicklung einer DoCM herzustellen wurde ebenfalls mittels logistischer Regressionsanalyse der Datensatz der Outcome-Analyse-Gruppe untersucht. Zur Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel und R-Studio benutzt.

IV. ERGEBNISSE

1. Zusammenfassung der Studienpopulation

In die vorliegende Studie wurden bis zur Analyse im August 2016 insgesamt 118 Hunde der Rasse Dobermann Pinscher (DP) eingeschlossen. Davon waren 58 Tiere (49,2 %) weiblich und 60 Hunde männlich (50,8 %). Das Alter der Hunde zum Zeitpunkt der Untersuchung war zwischen einem und 13 Jahren (Median 6 Jahre). Von 118 Hunden waren 87 (73,7 %) an DoCM erkrankt. Zum Zeitpunkt der Analyse waren von 118 Hunden noch 59 Hunde (50 %) am Leben, 54 Hunde (45,8 %) waren verstorben und 5 (4,2 %) konnten nicht nachverfolgt werden (lost-to-follow-up). Die verstorbenen Hunde waren zwischen 3 und 13 Jahren (Median 9 Jahre) alt. Die Todesursache der 54 verstorbenen Hunde war in 19 Fällen (35,2 %) nicht kardial, 5 Hunde (9,3 %) verstarben am CHF und 30 Hunde (55,5 %) am SD. Die Ergebnisse der kardiologischen Untersuchung der jeweiligen Gruppen sind in Tabelle 7 dargestellt.

AAK-Messungen. Bei jedem der 118 Hunde wurde eine einzelne Antikörpermessung durchgeführt. Die Ergebnisse der Messung wurden durch den Grenzwert (Δ 4 Schläge/min, (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987a)) in positiv und negativ eingeteilt. Von den 118 Hunden konnten bei 84 Hunden (71,2 %) AAK gegen β 1-Rezeptoren festgestellt werden, 34 Hunde (28,8 %) wiesen keine AAK auf. Die Ergebnisse in Bezug auf die Gruppenaufteilung sind im Abschnitt 2 detailliert im Text, sowie in Tabelle 7 und Abbildung 11 aufgeführt.

Vorbereitung. Die Hunde erhielten je nach Befunden und Krankheitsstadium verschiedene Therapien. Die Hunde der Kontrollgruppe erhielten keine Therapie. Die insgesamt 87 DoCM Patienten erhielten unterschiedliche Therapien. In der Untergruppe DoCM–VES erhielten von 22 Hunden 6 Hunde den Wirkstoff Sotalol Hydrochlorid, alleine oder in Kombination ($n = 3$) mit Flecainid Acetat, 9 Hunde Amiodaron Hydrochlorid, 10 Hunde zusätzlich zur antiarrhythmischen Therapie einen ACE-Inhibitor (Ramipril), 7 Hunde erhielten keine Therapie. In der Untergruppe DoCM–ECHO erhielten von 25 Hunden 23 Hunde Pimobendan, 12 Hunde erhielten zusätzlich einen ACE-Inhibitor (Ramipril) und 2 wurden nicht therapiert. In der dritten Untergruppe DoCM–ECHO und VES erhielten von 40

Hunden 35 Hunde Pimobendan, 34 Hunde davon zusätzlich einen ACE-Inhibitor (Ramipril), 19 Hunde erhielten zusätzlich Sotalol Hydrochlorid, davon 9 Hunde in der Kombination mit Flecainid Acetat, und 12 Hunde erhielten zusätzlich Amiodaron Hydrochlorid. Die 5 Hunde die kein Pimobendan erhielten, waren unter Therapie mit einer Kombination aus Ramipril, Sotalol Hydrochlorid und Flecainid Acetat (n = 2) oder Ramipril und Amiodaron Hydrochlorid (n = 2). Ein Hund erhielt keine Therapie.

Tabelle 6: Ergebnisse der Autoantikörpermessung. Gruppe „Initial-gesund“ und Gruppe „DoCM“ bilden die Gesamtmenge (fett markiert). Die übrigen Gruppen sind in der Tabelle als Teilmengen der beiden Hauptgruppen abgebildet (eingerrückt).

		AAK-Messung		
Gruppe	Anzahl (n)	AAK gegen β_1 -Rezeptoren		Δ bpm/15 sek.
		positiv (n/%)	negativ (n/%)	Median (Range)
Gesamt	118	84 (71,2 %)	34 (28,8 %)	3,42 (-0,5–8,0)
Initial-gesund	31	22 (71,0 %)	9 (29 %)	3,17 (0–6,33)
Kontrollgruppe	20	11 (55,0 %)	9 (45 %)	2,34 (0–5,83)
Verlaufsgruppe				
V1 (gesund)	9	9	0	3,33 (1,5–6,0)
V2 (VES)		8	1	4,67 (-0,33–6,17)
V3 (ECHO und VES)		8	1	5,33 (0,17–6,83)
Ausschluss	2	2	0	3,75 (1,17–6,33)
DoCM	87	62 (71,3 %)	25 (28,7 %)	3,67 (-0,5–8,0)
DoCM–VES	22	16 (72,7 %)	6 (27,3 %)	3,56 (-0,33–5,83)
DoCM–ECHO	25	14 (56 %)	11 (44 %)	2,5 (-0,17–6,5)
DoCM–ECHO und VES	40	32 (80 %)	8 (20 %)	4,36 (-0,5–8,0)

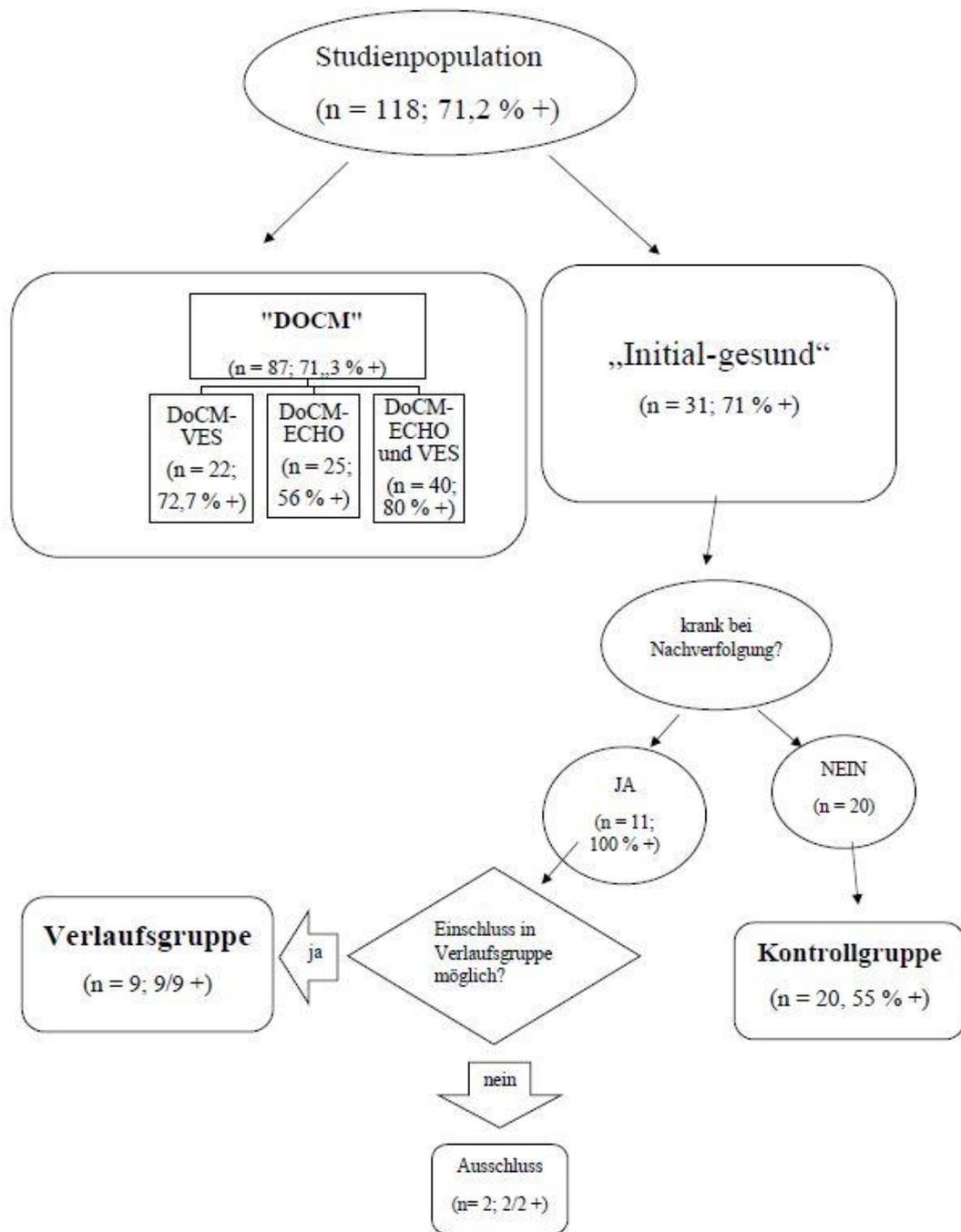


Abbildung 11: Übersicht über die Gruppeneinteilung, inklusive Ergebnisse der AAK-Messung. In Klammern sind die Anzahl der Hunde der einzelnen Gruppe (n), sowie der Anteil dieser Hunde, der positiv auf AAK gegen β_1 -Rezeptoren getestet wurde.

Tabelle 7: Tabelle zur Beschreibung der Studienpopulation und den Ergebnissen der kardiologischen Untersuchung (nicht abgebildet sind die Daten der zwei Hunde, die aus der Gruppe „Initial-gesund“ eine DoCM entwickelten, aber nicht in die Verlaufsgruppe eingeschlossen werden konnten).

Gruppe	Anzahl (n)	Kardiologische Untersuchung				
		SMODd/BSA in ml/m ² Median (Range)	SMODs/BSA in ml/m ² Median (Range)	VES (Anzahl/24 h) Median (Range)	FR VES Median (Range)	VTACH Median (Range)
Gesamt	118	97,6 (53,4–195,7)	57,8 (22,1–164,3)	18,5 (0–15 000)	238 (0–385)	0 (0–150)
Initial-gesund	31	77,8 (53,4–94,8)	39,3 (25–54,7)	2 (0–97)	184 (0–248)	0 (0–0)
Kontrollgruppe	20	76,6 (53,4–94,9)	35,1 (25–54,7)	2 (0–97)	191 (0–248)	0 (0–0)
Verlaufsgruppe	9					
V1 (gesund)		78,4 (70,6–94,2)	42 (39,3–50 ,3)	0 (0–35)	0 (0–256)	0 (0–0)
V2 (VES)		82,5 (70,9–94,1)	43,2 (30,7–54,9)	698 (5–31 022)	256 (173–375)	0 (0–1015)
V3 (ECHO und VES)		102,2 (98,3–120,9)	63,4 (56,8–70,6)	1651 (4–85 851)	214 (148–351)	0,1 (0–1)
DoCM	87	103,3 (55,3–195,7)	63,7 (22,1–164,3)	94 (0–15 000)	248 (0–385)	0 (0–150)
DoCM-VES	22	78,6 (55,3–96,9)	42,8 (22,1–66,6)	460 (1–10 000)	288 (173–385)	5,6 (0–78)
DoCM-ECHO	25	122,1 (95,3–195,7)	66,5 (55,4–164,3)	5 (0–79)	175 (0–260)	0 (0–0)
DoCM–ECHO und VES	40	109 (95–159,7)	68,5 (56,9–105,8)	452 (2–15 000)	277 (124–380)	0 (0–150)

2. Ergebnisse nach Gruppen

Die Fragestellungen für die vorliegende Studie waren:

- (1) Gibt es AAK bei DP und wie häufig kommen diese bei gesunden und an DoCM erkrankten Hunden vor?
- (2) Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Krankheitsformen der DoCM in Bezug auf die AAK-Messung?
- (3) Wie entwickeln sich AAK mit Fortschreiten der DoCM?
- (4) Gibt es eine Korrelation der vorhandenen AAK und Kovariaten der kardiologischen Untersuchung?
- (5) Entwickeln gesunde Hunde mit AAK später eine DoCM?

2.1. Ergebnisse der Gruppe „DoCM“

In die Gruppe „DoCM“ konnten 87 Hunde eingeschlossen werden. Davon waren 41 Tiere (47,1 %) weiblich und 46 Hunde männlich (52,9 %). Das Alter der Hunde zum Zeitpunkt der Untersuchung war zwischen 2 und 11 Jahren (Median 7 Jahre). Zum Zeitpunkt der Analyse waren von 87 Hunden noch 43 Hunde (49,4 %) am Leben, 42 Hunde (48,3 %) waren verstorben und 2 Hunde (2,3 %) konnten nicht nachverfolgt werden (lost-to-follow-up). Die verstorbenen Hunde waren zwischen 3 und 12 Jahren (Median 8 Jahre) alt. Die Todesursache der 42 verstorbenen Hunde war in 12 Fällen (28,6 %) nicht kardial, 4 Hunde (9,5 %) verstarben am CHF und 26 Hunde (61,9 %) am SD. Von den 87 Hunden konnten bei 62 Hunden (71,3 %) AAK gegen β 1-Rezeptoren nachwiesen werden, Abbildung 12 zeigt eine Übersicht über die DoCM Gruppe und die AAK-Messungen.

In die Untergruppe „DoCM-VES“ konnten 22 Hunde eingeschlossen werden. Davon waren 16 Tiere (72,7 %) weiblich und 6 Hunde männlich (27,3 %). Das Alter der Hunde zum Zeitpunkt der Untersuchung war zwischen 3 und 11 Jahren (Median 8 Jahre). Zum Zeitpunkt der Analyse waren von 22 Hunden noch 11 Hunde (50 %) am Leben, 10 Hunde (45,5 %) waren verstorben und 1 Hunde (0,5 %) konnten nicht nachverfolgt werden (lost-to-follow-up). Die verstorbenen Hunde waren zwischen 8 und 12 Jahren (Median 9,5 Jahre) alt. Die Todesursache der 10 verstorbenen Hunde war in 4 Fällen (40 %) nicht kardial und 6 Hunde (60 %) verstarben am SD, keiner am CHF. Von den 22 Hunden konnten bei 16 Hunden (72,7 %) AAK gegen β 1-Rezeptoren nachwiesen werden.

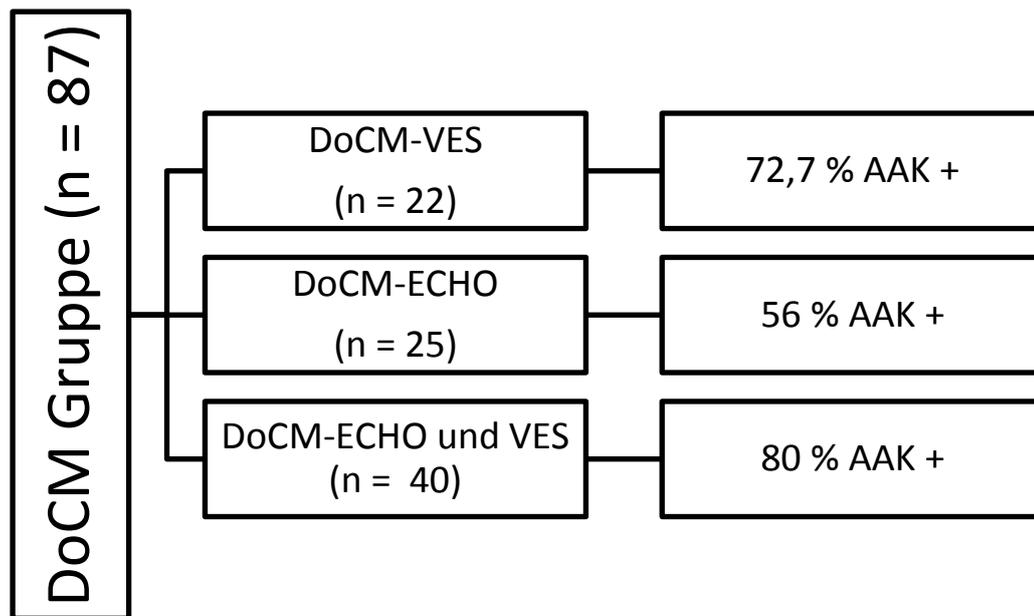


Abbildung 12: Ergebnisse der DoCM Gruppe. AAK Messungen und Gruppeneinteilung.

In die Untergruppe „DoCM–ECHO“ konnten 25 Hunde eingeschlossen werden. Davon waren 8 Tiere (32 %) weiblich und 17 Hunde männlich (68 %). Das Alter der Hunde zum Zeitpunkt der Untersuchung war zwischen 2 und 10 Jahren (Median 6 Jahre). Zum Zeitpunkt der Analyse waren von 25 Hunden noch 15 Hunde (60 %) am Leben, 10 Hunde (40 %) waren verstorben. Die verstorbenen Hunde waren zwischen 3 und 12 Jahren (Median 7 Jahre) alt. Die Todesursache der 10 verstorbenen Hunde war in 3 Fällen (30 %) nicht kardial, 6 Hunde (60 %) verstarben am SD, ein Hund (10 %) verstarb am CHF. Von den 25 Hunden konnten bei 14 Hunden (56 %) AAK gegen β 1-Rezeptoren nachwiesen werden.

In die Untergruppe „DoCM-ECHO und VES“ konnten 40 Hunde eingeschlossen werden. Davon waren 17 Tiere (42,5 %) weiblich und 23 Hunde männlich (57,5 %). Das Alter der Hunde zum Zeitpunkt der Untersuchung war zwischen 2 und 10 Jahren (Median 6,5 Jahre). Zum Zeitpunkt der Analyse waren von 40 Hunden noch 17 Hunde (42,5 %) am Leben, 22 Hunde (55 %) waren verstorben und 1 Hund (2,5 %) konnte nicht nachverfolgt werden (lost-to-follow-up). Die verstorbenen Hunde waren zwischen 4 und 10 Jahren (Median 8 Jahre) alt. Die Todesursache der 22 verstorbenen Hunde war in 5 Fällen (22,7 %) nicht kardial, 14 Hunde (63,7 %) verstarben am SD, 3 Hunde (13,6 %) am CHF. Von den 40 Hunden konnten bei 32 Hunden (80 %) AAK gegen β 1-Rezeptoren nachwiesen werden.

2.2. Ergebnisse der Gruppe „Initial-gesund“ und der Kontrollgruppe

In die Gruppe „Initial-gesund“ konnten 31 Hunde eingeschlossen werden. Davon waren 17 Tiere weiblich (54,8 %) und 14 Tiere männlich (45,2 %). Das Alter der Hunde zum Zeitpunkt der Untersuchung war zwischen 1 und 13 Jahren (Median 6 Jahre). Zum Zeitpunkt der Analyse waren von 31 Hunden noch 16 Hunde (51,6 %) am Leben, 12 Hunde (38,7 %) waren verstorben, 3 Hunde (9,7 %) waren *lost-to-follow-up*. Von den 12 verstorbenen Hunden verstarben 4 Hunde am SD ein Hund verstarb am CHF und 7 an einer nicht kardialen Todesursache. Die verstorbenen Hunde waren zum Zeitpunkt des Todes zwischen 7 und 13 Jahren (Median 10 Jahre) alt. Insgesamt konnten bei 22 von 31 Hunden (71 %) AAK gegen β 1-Rezeptoren festgestellt werden. 11 von 31 Hunden (35,5 %) entwickelten im späteren Verlauf eine DoCM und wurden deshalb aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen. Alle 11 Hunde wiesen einen positiven AAK-Wert auf. 9 von 11 Hunden konnten in die Verlaufsgruppe eingeschlossen werden. 2 von 11 erfüllten nicht die Einschlusskriterien. Somit blieben verblieben 20 Hunde in der Kontrollgruppe. Von den 20 Hunden konnten bei 11 Hunden (55 %) AAK gegen β 1-Rezeptoren nachwiesen werden. Die Aufteilung und die Ergebnisse der AAK-Messung sind in Abbildung 13 dargestellt.

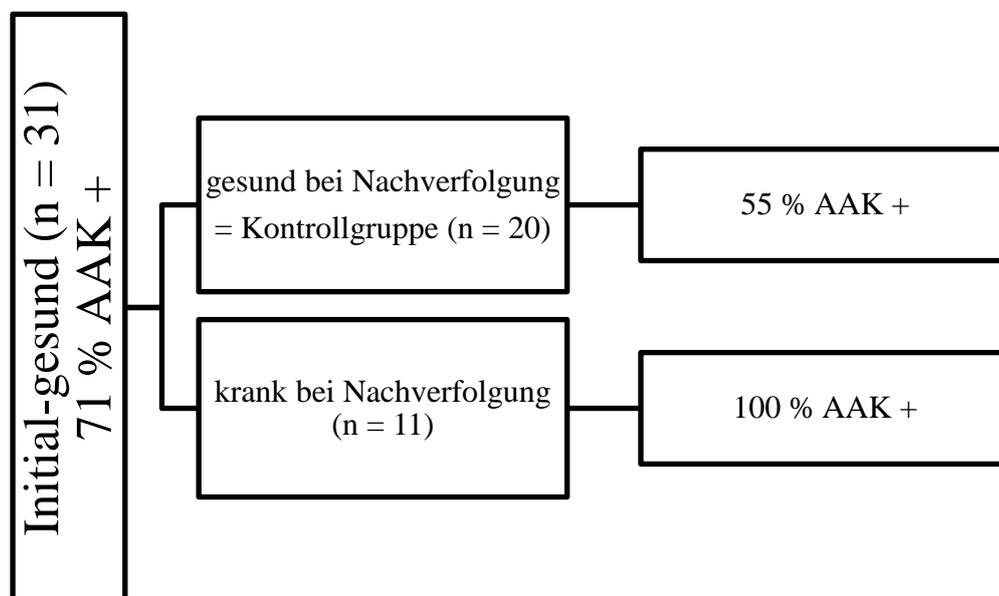


Abbildung 13: Ergebnisse der Gruppe „Initial-gesund“ und der Kontrollgruppe

2.3. Ergebnisse der Verlaufsgruppe

In die Verlaufsgruppe konnten 9 Hunde eingeschlossen werden. Davon waren 6 Tiere (66,7 %) weiblich und 3 Hunde männlich (33,3 %). Das Alter der Hunde

zum Zeitpunkt der 1. Untersuchung (V1) war zwischen 2 und 7 Jahren (Median 3 Jahre), zum Zeitpunkt der 2. Untersuchung (V2) zwischen 5 und 9 (Median 7) und zum Zeitpunkt der 3. Untersuchung (V3) waren die Hunde zwischen 5 und 10 (Median 9 Jahre) alt. Zum Zeitpunkt der Analyse waren von den 9 Hunden noch 2 Hunde (22,2 %) am Leben, 7 Hunde (77,8 %) waren verstorben. Die verstorbenen Hunde waren zwischen 9 und 12 Jahren (Median 10 Jahre) alt. Die Todesursache der 7 verstorbenen Hunde war in 2 Fällen (28,6 %) nicht kardial, 4 Hunde (57,1 %) verstarben am SD, 1 Hunde (14,3 %) am CHF. Von den 9 Hunden konnten bei initial bei der 1. Untersuchung (V1) bei allen Hunden AAK gegen β 1-Rezeptoren nachwiesen werden, bei der 2. und 3. Untersuchung (V2 + V3) waren 8/9 Hunden positiv für AAK, ein Hund wurde also in den Folgeuntersuchungen negativ. Die AAK Messungen der anderen 8 Hunde steigerten sich in 7/9 Fällen über den weiteren Verlauf, wurden also stärker positiv. Die Abbildung 14 zeigt den Verlauf der Messungen aller 9 Hunde. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der kardiologischen Untersuchung dieser Hunde in den aufeinanderfolgenden Krankheitsstadien. In der Tabelle 6 sind die Messwerte der AAK Untersuchung dargestellt.

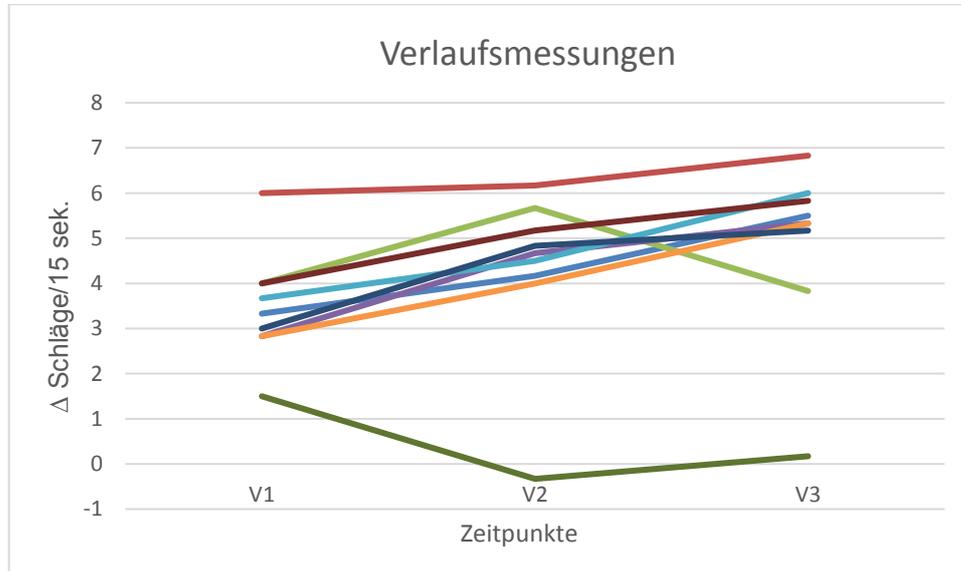


Abbildung 14: Graphische Darstellung der AAK Messwerte der Verlaufsstudie zu den 3 Zeitpunkten (V1: gesund, V2: Arrhythmiestadium (VES), V3: Echoveränderungen und VES).

3. Ergebnisse der Regressionsanalyse

Im Folgenden Absatz sind die Ergebnisse zur Fragestellung (4) (Gibt es eine Korrelation der vorhandenen AAK und Kovariaten der kardiologischen Untersuchung?) aufgeführt. Die Untersuchungsergebnisse der Gruppen „DoCM“ und „Initial-gesund“ sind für die Analyse verwendet worden. Insgesamt wurden somit die Daten von 118 Untersuchungen analysiert.

3.1. Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Gesamtpopulation

Der mögliche Einfluss des Vorhandenseins der AAK gegen β 1-Rezeptoren auf die jeweils diastolisch und systolisch gemessenen Herzvolumina (SMODd/BSA und SMODs/BSA) wurde mittels einer linearen Regressionsanalyse berechnet. War der Hund positiv für AAK gegen β 1-Rezeptoren erhöhte sich der Messwert der SMODd/BSA um $3,97 \text{ ml/m}^2$ (p: 0,450, Konfidenzintervall: $-6,39-14,33$, ceteris paribus). Bezüglich des SMODs/BSA bewirkte ein positiver AAK Wert eine Erhöhung um $3,43 \text{ ml/m}^2$ (p: 0,467, Konfidenzintervall: $-5,89-12,74$, ceteris paribus). Beide Ergebnisse waren nicht signifikant.

3.2. Ergebnisse der binären logistischen Regressionsanalyse der Gesamtpopulation

Das Vorhandensein von AAK gegen β 1-Rezeptoren hatte auf keine der getesteten Kovariaten der binären logistischen Regressionsanalyse, kontrolliert für Alter und Geschlecht, einen signifikanten Einfluss. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt.

Tabelle 8: Tabelle zur binären logistischen Regressionsanalyse für die Wahrscheinlichkeit, dass ein positiver AAK Messwert Einfluss auf die ausgewählten Kovariaten hat, kontrolliert für Geschlecht und Alter.

	p-Wert	Odds ratio (OR)	95%-Konfidenzintervall für OR	
			Unterer Wert	Oberer Wert
Echoveränderungen	0,833	1,1	0,39	2,11
Arrhythmien	0,198	1,7	0,75	4,12
Kardiale Todesursache	0,167	0,19	0,01	1,49
Sekundentod	0,075	0,12	0,01	0,9

3.3. Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse zum Risiko

Um die Frage zu beantworten, ob das Vorhandensein von AAK bei gesunden Hunden mit einem höheren Risiko verbunden ist, im späteren Leben eine DoCM zu entwickeln (Fragestellung (5)), wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Dafür wurden alle Hunde der Gruppen „Initial-gesund in die Analyse aufgenommen. Insgesamt konnten wurden die Daten von 28 Hunden für die Risikoanalyse untersucht, 3 wurden ausgeschlossen, da sich nicht nachverfolgt werden konnten und somit keine Datenerhebung zum Outcome möglich war. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein AAK positiver Hund im weiteren Verlauf eine DoCM entwickelte, lag in der Stichprobe bei einer Odds Ratio von 1,65, kontrolliert für Alter und Geschlecht (p: 0,16, Konfidenzintervall: 1,14–3,9). Das Ergebnis war nicht signifikant.

V. DISKUSSION

In der Humanmedizin sind bei Patienten mit DCM AAK gegen β 1-Rezeptoren inzwischen als eine mögliche Ursache der idiopathischen DCM anerkannt. Die Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieoptionen steht im Fokus der Forschung (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014), (JOSHI-BARR et al., 2016), (HABERLAND et al., 2014).

Die vorliegende Studie ist die erste, die AAK gegen β 1-Rezeptoren auch beim DP nachweist. Frühere Versuche eine autoimmune Komponente bei Hunden mit DCM nachzuweisen, konzentrierten sich unter anderem auf den Nachweis von antikardialen AAK (COBB et al., 1994) im Serum von Hunden mit DCM und bei gesunden Hunden, nachgewiesen mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blots. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund der unpassenden Testmethode (COBB et al., 1994). Eine weitere Studie untersuchte englische Cocker Spaniels mit DCM. Bei dieser Population wurden antimitochondriale AAK nachgewiesen, jedoch keine AAK gegen β 1-Rezeptoren (DAY, 1996). Auch die Studie von BRAZ-RUIVO (1999) bei DP konzentrierte sich mehr auf den Gesamtgehalt der IgG oder IgM, bzw. auf AAK gegen Myosin oder Laminin (BRAZ-RUIVO, 1999). Ein möglicher Grund für den fehlenden Nachweis der AAK gegen β 1-Rezeptoren in dieser Studie mit DP könnte wiederum die ungeeignete Testmethode des ELISA sein, da die AAK gegen β 1-Rezeptoren nur einen sehr kleinen, aber funktionell potenten Teil der Gesamtmenge an IgG ausmachen (JAHNS et al., 1999), (JAHNS et al., 2000). Um diese kleine, funktionell relevante Teilmenge der IgG zu detektieren ist eine Testmethode notwendig, die den Rezeptor in seiner natürlichen Konformation beinhaltet (JAHNS et al., 2006). Der klassische ELISA ist kein solcher Test, vor allem der in bisherigen Studien eingesetzte Peptid-basierte ELISA ist nach einer aktuellen Studie keine valide Testmethode (JAHNS & BOEGE, 2015). Etwas bessere Ergebnisse zur AAK Detektion bietet ein zellbasierter ELISA, der in der Lage ist mehr AAK bei humanen DCM Patienten nachzuweisen (HOLTHOFF et al., 2012). Eine weitere Testmethode mit bisher vielversprechenderen Ergebnissen als der ELISA ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), der die intrazelluläre cAMP Produktion misst. Diese ist durch die Dauerstimulation des Rezeptors durch die AAK Bindung erhöht (NIKOLAEV et al., 2007). Dieses

Testverfahren wurde bisher noch nicht bei Hunden eingesetzt, hätte aber möglicherweise Potential, vor allem in Hinblick auf die Untersuchung größerer Probenumfänge. Für die vorliegende Studie wurde die bisher sensitivste Diagnostikmethode (JOSHI-BARR et al., 2016), der CCA, ausgewählt. Der CCA ist als Bioassay im Grunde genommen die Basisform einer zellbasierten Testmethode, was für die Detektion der AAK von großer Bedeutung ist (JAHNS et al., 2006). Der Vorteil dieser Methode, die auf einer Zellkultur von lebenden Kardiomyozyten basiert, ist die hohe Sensitivität. Mit dieser Methode konnten in Humanstudien bei bis zu 80 % der DCM Patienten AAK gegen β 1- und andere Rezeptoren (z. B. gegen den muskarinergen M2-Rezeptor) nachgewiesen werden (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Zahlreiche Studien wurden mithilfe des CCAs durchgeführt, unter anderem auch die erste relevante Studie zur Entfernung der AAK durch Immunadsorption (WALLUKAT et al., 1996). Der Nachteil des CCAs ist der hohe Zeit- und Materialaufwand (JOSHI-BARR et al., 2016). Da für den Bioassay lebende Kardiomyozyten von neonatalen Ratten benötigt werden, ist die Zucht und Tötung von Ratten für die Vorbereitung des Tests notwendig, was auch ethische Bedenken aufwerfen kann. Zeitintensiv ist die Methode vor allem deshalb, da die Kardiomyozyten einzeln unter dem Mikroskop beurteilt werden müssen, eine maschinelle Bearbeitung ist nicht möglich. Daher können mit dem CCA keine großen Probenumfänge von hunderten Proben auf einmal analysiert werden. Außerdem benötigt die Methode viel Vorbereitung, von der Kultivierung der Kardiomyozyten bis hin zur IgG-Präparation aus dem Serum. Aus diesen Gründen gab es bereits Bemühungen zur Weiterentwicklung des CCAs, zum sogenannten High-Throughput-Bioassay (JOSHI-BARR et al., 2016). Diese Testmethode erlaubt nach einer aktuellen Studie einen deutlich höheren Probendurchsatz bei ähnlich hoher Sensitivität wie der CCA (JOSHI-BARR et al., 2016). Für die Durchführung zukünftiger Studien zum Thema AAK gegen β 1-Rezeptoren beim DP könnte der High-Throughput-Bioassay oder die Methode des FRET mögliche alternative Testmethoden zum CCA darstellen.

Zur Diagnosestellung der DoCM wurden für die vorliegende Studie die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung und des Holter-EKGs beurteilt, da aufgrund der verschiedenen Verlaufsformen und Stadien der DoCM (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004) die Beurteilung beider Komponenten der kardiologischen Untersuchung essentiell ist. Für die Beurteilung der

echokardiographischen Befunde wurde die Messmethode des SMOD verwendet, der aktuelle Goldstandard zur Diagnosestellung der DoCM (HOLLER & WESS, 2014). In Bezug auf die Einteilung der Gruppen wurde eine isolierte (entweder systolisch oder diastolische) Erhöhung der SMOD-Messwerte in der vorliegenden Studie als eine mögliche Folge von Tachyarrhythmien im Sinne einer Tachykardie-induzierten-DCM-Komponente interpretiert und deshalb auch für die Untergruppe der Arrhythmie kranken Hunde (DoCM-VES) akzeptiert. Sobald beide SMOD Messungen (diastolisch und systolisch) bei einem Hund erhöht waren galt er als eindeutig echokardiographisch abnormal und wurde, je nach zusätzlichem Vorhandensein von Arrhythmien, in die DoCM-ECHO oder DoCM-ECHO und VES Gruppe eingeschlossen. Für die Bewertung der Befunde im Holter EKG wurden mehrere Parameter zur Beurteilung hinzugezogen. Ein DP wurde als an der arrhythmogenen Form der DoCM erkrankt bezeichnet, wenn er mehr als 100 VES in 24 Stunden im Holter-EKG hatte, wie schon von mehreren Autoren (CALVERT et al., 1997b), (WESS et al., 2010d) in anderen Studien als Grenzwert festgesetzt. Weitere Kriterien waren das Vorhandensein von VTACH, da dies bereits von unterschiedlichen Autoren (CALVERT & BROWN, 2004), (KLÜSER et al., 2016) mit dem Auftreten des Sekudentods in Zusammenhang gebracht wurde und damit das wichtigste Malignitätskriterium der EKG-Analyse ist. Außer dem Auftreten von VTACH wurde die maximale Schlag-zu-Schlag-Frequenz der VES (FR) als Malignitätskriterium aufgenommen, da in einer aktuellen Studie (KLÜSER et al., 2016) eine FR über 260/min als negativ prognostischer Faktor für das Auftreten des Sekudentods signifikant war. Diese bisherigen Studienergebnisse legen die Vermutung nahe, dass nicht nur die Gesamtanzahl der VES relevant ist, sondern auch wenige VES mit einer zu hohen FR oder kurze VTACH Phasen gefährlich und somit therapierelevant sind. In Bezug auf die Kriterien, wann ein DP definitiv frei von Arrhythmien und somit als gesund zu bezeichnen ist, liegt der bisherige Grenzwert bei < 50 VES/24 Stunden (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). In der vorliegenden Studie wurde dieser Grenzwert nicht angewandt, zum einen, da die tatsächliche Anzahl der VES/24 Stunden nach den Ergebnissen einer aktuellen Studie (KLÜSER et al., 2016) weniger Aussage zur Bewertung der Malignität von Arrhythmien hat als z. B. die FR oder das Vorhandensein von VTACH, wie bereits beschrieben, zum anderen sollte ein Graubereich vermieden werden, der dann zwischen den beiden Grenzwerten 50 und 100 VES/24 Stunden entstanden wäre. Diese bewusste

Entscheidung könnte zur Folge gehabt haben, dass Hunde, die eventuell mehr als 50 VES/24 Stunden aber weniger als 100 VES/24 Stunden aufwiesen, fälschlicherweise als gesund in die Kontrollgruppe eingeschlossen worden sind.

Studienpopulation. In der vorliegenden Studie wurden 118 DP untersucht, das Geschlechterverhältnis war ausgewogen (58 weibliche, 60 männliche Tiere), dies deckt sich mit den neueren Studienerkenntnissen zum Signalement zur DoCM, die zeigen, dass es keine Geschlechtsprädisposition gibt (MEURS et al., 2007), (WESS et al., 2010b). Von 118 Hunden waren 73,7 % an DoCM erkrankt. Dies ist ein höherer Anteil als bisher für die Prävalenz der DoCM (45–63 %) berichtet wurde (HAZLETT et al., 1983), (O'GRADY & HORNE, 1998), (WESS et al., 2010b) und könnte sich dadurch erklären, dass in der vorliegenden Studie eine gewisse Vorauswahl stattgefunden hat. Der Grund hierfür war zum einen das Studiendesign, da es wichtig war zur Beantwortung der Fragestellung (1), ob es AAK gegen β 1-Rezeptoren beim DP mit DoCM gibt, vorrangig DoCM Patienten auf das Vorhandensein von AAK gegen β 1-Rezeptoren zu untersuchen. Daher wurden zu Beginn der vorliegenden Studie mehr erkrankte DP eingeschlossen. Des Weiteren hat auch die Durchführung der aufwändigen Testmethode des CCAs initial dazu geführt, dass nur wenige Proben untersucht werden konnten, auch deshalb wurden initial bevorzugt erkrankte Hunde untersucht. Im weiteren Verlauf wurden auch gesunde Hunde als Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen, jedoch nicht in der gleichen Zahl wie die an DoCM erkrankten Hunde. In Hinblick auf den großen Anteil der DoCM kranken Hunde ist es als passend zu interpretieren, dass das mediane Alter der Hunde in der vorliegenden Studie bei 6 Jahren lag, da DP meistens im mittleren bis höheren Alter (zwischen 5 und 10 Jahren) an DoCM erkranken (CALVERT et al., 1997a) und ebenso dass die Mehrzahl der verstorbenen Hunde (35 von 54) an einer kardialen Todesursache verstorben ist. Der Anteil der Hund die am SD verstorben sind, ist mit 55,5 % relativ hoch, vor allem da keine Hunde im overten Stadium der DoCM in der vorliegenden Studie untersucht wurden. In einer Studie von O'GRADY bei Hunden im okkulten Stadium verstarben ca. 30 % am SD (O'GRADY & HOME, 1998). Eine mögliche Erklärung für die höhere Prävalenz des SD in der vorliegenden Studie könnte der höhere Anteil von Hunden mit echokardiographischen Veränderungen sein (65 von 87 erkrankten Hunden). In einer aktuellen Studie (KLÜSER et al., 2016) zu prognostischen Faktoren zur

Vorhersage des SD war die Herzgröße (SMODd/BSA $> 91,3 \text{ ml/m}^2$) der aussagekräftigste signifikante Parameter. In der vorliegenden Studie lag der mediane Wert für SMODd/BSA bei $103,3 \text{ ml/m}^2$.

Einfluss der Therapie. Die Studienteilnehmer der vorliegenden Studie wurden mit diversen Medikamenten vorbehandelt. Fast alle Hunde mit eindeutigen echokardiographischen Veränderungen erhielten die Standardtherapie mit Pimobendan, teilweise ergänzt durch einen ACE-Inhibitor. Dies könnte einen maßgeblichen Einfluss auf die Volumenmessungen gehabt haben und somit die Ergebnisse der Analyse beeinflusst haben. Obwohl die Therapie mit Pimobendan auch im okkulten Stadium bei Hunden mit echokardiographischen Veränderungen aktueller Therapiestandard ist, wurden insgesamt 7 Hunde trotz echokardiographischer Veränderungen nicht mit Pimobendan therapiert. Dies ist zum Teil der Tatsache geschuldet, dass die Hunde erst in dieser Untersuchung, die zum Studieneinschluss geführt hat, eindeutige echokardiographische Veränderungen gezeigt haben. Diesen Hunden wurde nachfolgend Pimobendan verabreicht. Ein Hund wurde nicht therapiert, da die Hundebesitzer jegliche Tablettengabe verweigerten. In der Gruppe der Arrhythmien wurden die Tiere mit unterschiedlichen Antiarrhythmika behandelt. Die meisten der behandelten Hunde wurden mit Sotalol Hydrochlorid (25 Hunde aus den Gruppen DoCM – VES und DoCM – ECHO und VES), teilweise in der Kombination mit Flecainid (12 Hunde) behandelt. Sotalol Hydrochlorid ist ein Klasse III Antiarrhythmikum mit zusätzlichen Eigenschaften einer unspezifischen Betablockade. Das zweithäufigste eingesetzte Antiarrhythmikum in der vorliegenden Studie war Amiodaron Hydrochlorid (eingesetzt bei 21 Hunden), ein potentes Antiarrhythmikum, welches der Klasse III zugeordnet wird, aber auch Eigenschaften der anderen Klassen aufweist und somit auch Einfluss auf die β_1 -Rezeptoren hat. Beide Antiarrhythmika, Sotalol sowie Amiodaron, könnten einen deutlichen Einfluss auf die Studienergebnisse ausgeübt haben. Zum einen, da die Therapie Veränderungen der Holter-EKG Befunde bewirken kann: Entweder im Sinne einer Reduktion der VES oder malignen Arrhythmien oder auch im Sinne einer Verschlechterung der EKG-Befunde, was nicht ausgeschlossen werden kann, da jedes Antiarrhythmikum auch potentiell proarrhythmogen wirken kann. Zum anderen ist der direkte Einfluss der Antiarrhythmika auf die AAK-Messung schwer abzuschätzen. Aufgrund der betablockierenden Eigenschaften beider

Medikamente könnte eine teilweise Verdrängung der AAK gegen β 1-Rezeptoren stattgefunden haben, was die Messergebnisse direkt beeinflusst. Die mögliche, zumindest partielle Verdrängung von eventuell vorhandenen AAK gegen β 1-Rezeptoren durch Betablocker wurde in mehreren Studien (JAHNS et al., 2000), (FREEDMAN & LEFKOWITZ, 2004), (NIKOLAEV et al., 2007), (BOIVIN et al., 2015) beschrieben. Um diese Wirkung der Antiarrhythmika auszuschließen wäre es optimal, die AAK Messung zu einem Zeitpunkt durchzuführen, an dem die Hunde noch nicht vorbehandelt sind. Dies war jedoch in der vorliegenden Studie nicht bei allen Hunden möglich, da teilweise maligne, therapiebedürftige Arrhythmien bereits vor dem Studieneinschluss bei den Hunden aufgetreten sind, was einen Behandlungsbeginn mit antiarrhythmischer Therapie erforderte. Auf eine antiarrhythmische Therapie zu verzichten, ist nach der aktuellen Studienlage nicht zu vertreten, da in einer Studie von 2004 der Nutzen der antiarrhythmischen Therapie im Gegensatz zu keiner Therapie beim DP eindeutig belegt werden konnte (CALVERT & BROWN, 2004).

AAK Messungen. In der vorliegenden Studie wurden erstmals AAK gegen β 1-Rezeptoren bei DP nachgewiesen. Insgesamt wurden 71,2 % aller Hunde positiv für die AAK getestet. In der Gruppe „DoCM“ lag die Prävalenz der AAK positiven Hunde bei 71,3 %, es konnten jedoch auch AAK bei gesunden Hunden der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (55 %). Da die vorliegende Studie die erste Studie zum Nachweis von AAK gegen β 1-Rezeptoren beim DP ist, gibt es keine Studien zum Vergleich in der Tiermedizin. In mehreren humanmedizinischen Studien wurden Prävalenzen zwischen 30 % und 80 %, je nach Testmethode, der DCM Patienten positiv für AAK gegen β 1-Rezeptoren berichtet (NIKOLAEV et al., 2007), (MATSUI et al., 1995), (JAHNS et al., 1999), (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Die Testmethode mit der bisher höchsten Sensitivität (JOSHI-BARR et al., 2016), der CCA, wurde auch in der vorliegenden Studie angewandt. Die somit festgestellte Prävalenz von 71,3 % bei DoCM Patienten ist ein ähnliches Ergebnis wie bei humanen Patienten mit DCM, von den 70–80 % (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014) der DCM Patienten AAK gegen β 1-Rezeptoren aufweisen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Untergruppen der Gruppe „DoCM“ („DoCM–VES“, „DoCM–ECHO“, „DoCM–ECHO und VES“) fällt auf, dass bei mehr Hunden, bei den Arrhythmien eine Rolle spielen (Untergruppen „DoCM–VES“

sowie „DoCM – ECHO und VES“), AAK gegen β 1-Rezeptoren festgestellt wurden (72,7 % und 80 %) als bei Hunden mit nur Echoveränderungen (56 %), was ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen AAK und dem Auftreten von malignen Arrhythmien sein könnte, wie bereits in der Humanmedizin beschrieben (LEE et al., 2011). Auch die absoluten Messwerte der AAK Messung sind höher bei den Gruppen mit Arrhythmien („DoCM–VES“: Δ 3,56 Schläge/15 Sekunden), „DoCM–ECHO und VES“: Δ 4,36 Schläge/15 Sekunden) als bei der Gruppe der alleinigen Echoveränderungen („DoCM–ECHO“: Δ 2,5 Schläge/15 Sekunden). Auch dies könnte ein weiterer Hinweis sein. In der Gruppe „Initial-gesund“ wurden bei 71 % der Hunde AAK gegen β 1-Rezeptoren nachgewiesen, gleich viel wie bei DoCM Patienten. Diese sehr hohe Anzahl erklärt sich dadurch, dass von diesen 31 Hunden 11 Hunde im weiteren Verlauf eine DoCM entwickelten, welche alle positive AAK-Messungen hatten. Diese Hunde wurden folglich aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen, wodurch der Anteil der AAK positiven Hunde in der Kontrollgruppe auf 55 % sank. Dennoch erscheint dieser Wert bei den gesunden Tieren der Kontrollgruppe erscheint relativ hoch. Niedrige AAK Titer können zwar auch bei gesunden Personen vorkommen und werden als natürlicher Teil der Immunrepertoires angesehen (ROSE, 2001), der AAK Anteil von 55 % bei eigentlich als gesund diagnostizierten Patienten erscheint dennoch zu hoch um ein physiologisches Geschehen zu erklären. Besonders auffällig erscheint dies, da in humanmedizinischen Studien teilweise keine AAK bei gesunden Kontrollpersonen gemessen werden konnten (LAZZERINI et al., 2008). Gründe hierfür könnten zum einen die relativ kleine Gruppe der gesunden Hunde sein ($n = 20$, 16,9 % der Gesamtpopulation) sowie die potentielle Gefahr, dass Hunde, die zum Untersuchungszeitpunkt der AAK-Messung in der kardiologischen Untersuchung noch als gesund diagnostiziert wurden, im späteren Leben eine DoCM entwickeln könnten. Um diese Gefahr zu verringern, wurden die Hunde der Kontrollgruppe nachverfolgt und 11 Hunde der Gruppe „Initial-gesund“ entwickelten im Zeitraum der Nachverfolgung tatsächlich eine DoCM, wie bereits besprochen. Das mediane Alter der Kontrollgruppe lag bei 8 Jahren, die Wahrscheinlichkeit, dass einer dieser Hunde im weiteren Verlauf dennoch eine DoCM entwickeln könnte erscheint relativ gering, ist aber nicht auszuschließen. Es könnten dennoch falsch negative Hunde in der Kontrollgruppe eingeschlossen worden sein, die diesen hohen Anteil der AAK positiven Hunde eventuell erklären

könnte. Die Ergebnisse der Verlaufsstudie sprechen eher dafür, dass AAK bei gesunden Hunden im weiteren Verlauf zu einer DoCM führen könnten, da bei allen Hunden der Stichprobe bereits im kardiologisch unauffälligen Stadium AAK gegen β 1-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Die AAK Werte von 7/9 Hunden stiegen im Zuge der Progression der DoCM an, was ein Hinweis auf die stärkere pathogene Wirkung der AAK mit dem Fortschreiten der Erkrankung sein könnte. Höhere AAK Werte werden mit einer stärkeren pathogenen Wirkung der AAK in Verbindung gebracht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass AAK im kardiologisch unauffälligen Krankheitsstadium ein Hinweis auf die spätere Entwicklung einer DoCM sein könnten und somit als Frühmarker für diagnostische oder prognostische Zwecke eingesetzt werden könnten. Aufgrund der kleinen Gruppengröße der Verlaufsstudie wurde auf eine statistische Analyse der Signifikanz dieser These verzichtet, da eine sinnvolle Aussage aufgrund der geringen Anzahl nicht möglich gewesen wäre.

Statistische Analyse. Das Ziel der statistischen Analyse der Gesamtpopulation der vorliegenden Studie war es, eine mögliche Korrelation zwischen dem Vorhandensein der AAK gegen β 1-Rezeptoren und Untersuchungsergebnissen der kardiologischen Untersuchung, wie die Herzgröße insgesamt, als auch aufgeteilt in die Volumenmessungen in der Diastole und Systole, oder Arrhythmien im Holter-EKG festzustellen. Außerdem sollte ein potentieller Einfluss auf eine mögliche kardiale Todesursache (SD oder CHF) untersucht werden. Damit sollte eine mögliche pathogene Wirkung der AAK beim DP dargestellt werden, falls vorhanden (Fragestellung (4)). Die Ergebnisse der binären logistischen Regressionsanalyse für die Wahrscheinlichkeit, dass ein positiver AAK Wert mit Echoveränderungen, Arrhythmien, einer kardialen Todesursache insgesamt oder dem Auftreten des SD zusammenhängt, waren in der vorliegenden Studie nicht signifikant. Daher müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Die OR für den Einfluss der AAK auf das Vorhandensein der Arrhythmien lag bei 1,7 (p: 0,198, CI: 0,75–4,12), was ein Hinweis auf die vorher gestellte These, dass AAK beim DP wie beim Menschen mit Arrhythmien korrelieren, sein könnte. Im Verhältnis dazu lag die OR für den Einfluss auf Echoveränderungen bei 1,1 (p: 0,833, CI: 0,39–2,11). Jedoch sind dies allenfalls Spekulationen, da wie bereits erwähnt bei keiner der Kovariaten eine Signifikanz erreicht werden konnte. Im Zuge der linearen Regressionsanalyse konnte ein potentieller Zusammenhang

zwischen AAK gegen β 1-Rezeptoren und den diastolischen und systolischen Volumenmessungen vermutet werden. Die Werte stiegen nach der Schätzung zwischen 3 ml/m^2 und 4 ml/m^2 an, wenn ein positiver AAK-Wert gemessen wurde. Auch diese Ergebnisse verfehlten die Signifikanz, so dass dies ebenso spekulativ beurteilt werden muss. Das Ziel der logistischen Regressionsanalyse der Gruppe „Initial-gesund“ und der Teilmenge der Verlaufsgruppe herauszufinden, ob das Vorhandensein von AAK beim gesunden DP mit einem höheren Risiko verbunden ist weiteren Verlauf eine DoCM zu entwickeln (Fragestellung (5)). In der Stichprobe lag die Wahrscheinlichkeit, dass ein DP mit positivem AAK Wert im Gesundstadium später eine DoCM entwickelt, bei einer OR von 1,65 (p: 0,16, CI: 1,14–3,9). Auch dieses Ergebnis war nicht signifikant.

Limitationen. Die vorliegende Studie hat einige Limitationen. Besonderen Einfluss auf die Analyse der Ergebnisse hat vermutlich die kleine Gruppengröße, vor allem der Untergruppen der Gruppe „DoCM“ sowie der Kontrollgruppe. Im festgesetzten Studienzeitraum wurden deutlich mehr DoCM Patienten als gesunde Hunde in die vorliegende Studie eingeschlossen, die Gründe hierzu wurden bereits besprochen. Eine weitere Limitation sind die fehlenden Referenzdaten in Bezug auf AAK gegen β 1-Rezeptoren bei Hunden, was unvermeidlich war, da die vorliegende Studie die erste zu diesem Thema beim Hund ist. Daher ist zum Beispiel auch unklar, ob der angewandte Grenzwert aus humanmedizinischen Studien (Δ 4 bpm (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987a)) für die Beurteilung, ob ein Hund positiv für AAK gegen β 1-Rezeptoren war oder nicht, für Hunde überhaupt ebenso gültig ist. Ebenso ist es unklar, ob die AAK gegen β 1-Rezeptoren beim Hund analog zum Menschen an die zweite extrazelluläre Schleife des β 1-Rezeptors (WALLUKAT et al., 1995) binden. Eine Epitopanalyse für den Hund wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Es ist zu vermuten, aber eben noch nicht bewiesen, dass AAK gegen β 1-Rezeptoren beim Hund dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor haben wie beim Menschen. Außerdem muss als Limitation genannt werden, dass keine statistische Analyse des Einflusses der Therapie auf die Untersuchungsergebnisse stattfand. Dies wäre aufgrund der kleinen Gruppen und der Vielzahl an eingesetzten Therapeutika nicht sinnvoll möglich gewesen.

Zusammenfassung und Ausblick. Die vorliegende Studie ist die erste Studie, die AAK gegen kardiale β 1-Rezeptoren beim DP nachweisen konnte. Bisher wurde

von einer genetischen Ursache für die DoCM ausgegangen. Zumindest eine autoimmune Komponente der DoCM ist nach den vorliegenden Ergebnissen nicht mehr auszuschließen. Über die wirkliche Bedeutung der AAK gegen β 1-Rezeptoren beim DP kann aktuell noch keine klare Aussage getroffen werden, die Ergebnisse der vorliegenden Studie verfehlten die Signifikanz. Die Ergebnisse lassen jedoch Vermutungen zu: Es konnte ein Unterschied in der Prävalenz von AAK gegen β 1-Rezeptoren zwischen den DoCM Patienten (71,3 %) und der Kontrollgruppe (55 %) nachgewiesen werden, auch wenn dieser nicht so deutlich ist wie in humanmedizinischen Studien. Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von AAK gegen β 1-Rezeptoren und dem Auftreten von Arrhythmien. Außerdem könnten die AAK als eine Art Frühmarker für DoCM interpretiert werden, da sie im Zuge der Progression der DoCM weiter ansteigen. Aus pathophysiologischer Sicht erscheint ein negativer Einfluss der AAK gegen β 1-Rezeptoren auch bei der DoCM logisch, die AAK können definitiv beim DP nachgewiesen werden.

Ob diese Beobachtung beim DP eine ebenso pathologische Bedeutung hat wie bei der humanen DCM vielfach nachgewiesen (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014), sollte in weiteren Studien untersucht werden. Um eine objektivere Antwort auf die Fragestellung (1) bis (3) zu erhalten, ob und in welchen Krankheitsstadien die AAK beim DP auftreten, wäre es empfehlenswert eine breiter angelegte Studie durchzuführen, z. B. eine prospektive Studie, bei der jeder in der Klinik vorgestellte Dobermann auf AAK gegen β 1-Rezeptoren untersucht wird. Damit könnte man, ohne die in der vorliegenden Studie angesprochene Vorauswahl, eine bessere Übersicht über die Prävalenz und die Rolle der AAK gegen β 1-Rezeptoren beim DP erhalten. Eine andere Möglichkeit, eine Antwort auf die Frage zum möglichen kausalen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von AAK gegen β 1-Rezeptoren beim DP und der Entwicklung der DoCM zu erhalten, wäre die Durchführung einer Studie, bei der die AAK mittels IA oder neuerer Therapiemethoden, wie z. B. der Einsatz von Aptameren oder Peptiden, aus dem Organismus entfernt würden, und nachfolgend eine Verbesserung der Herzerkrankung oder eine längere Überlebenszeit nachgewiesen werden könnte. Wenn dies gelingt, könnte eine neue kausale Therapieoption zur Therapie der DoCM entstehen, was das bisherige Wissen über die DoCM grundlegend verändern würde.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste Ursache für schweres Herzversagen beim Menschen sowie die häufigste Herzerkrankung bei großen Hunden. Der Dobermann Pinscher ist überrepräsentiert und entwickelt eine häufig schwerer verlaufende Form der DCM als andere Hunde. Die Prognose für den Dobermann Pinscher mit DCM ist schlecht, viele Hunde sterben am plötzlichen Herztod oder am kongestiven Herzversagen. Bisher wird von einer genetischen Ursache für die DCM beim Dobermann Pinscher ausgegangen, ein kausaler Therapieansatz ist nicht möglich. Anders verhält es sich bei der DCM des Menschen, bei der ein Autoimmungeschehen als mögliche Ursache inzwischen anerkannt ist. Agonistisch wirksame Autoantikörper gegen kardiale Rezeptoren, besonders gegen den β 1-Rezeptor, üben eine Dauerstimulation auf den Herzmuskel aus, weshalb sich nachfolgend eine DCM entwickelt. Diese Autoantikörper können beim Menschen mittels Immunadsorption entfernt werden, wodurch eine deutliche Verbesserung der kardialen Funktion und eine längere Überlebenszeit erreicht werden kann. Weitere, einfacher applizierbare Therapiemethoden sind aktuell in der Entwicklung. Beim Hund konnten in bisherigen Studien noch keine Autoantikörper gegen β 1-Rezeptoren nachgewiesen werden, was möglicherweise am Einsatz ungeeigneter Testmethoden lag. Für die vorliegende Studie wurden Dobermann Pinscher mittels Echokardiographie und 24-Stunden-EKG untersucht und als gesund oder an Dilatativer Kardiomyopathie erkrankt klassifiziert, sowie das Serum der Hunde mittels Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay auf Autoantikörper gegen β 1-Rezeptoren untersucht. Diese Testmethode ist die aktuell sensitivste Methode um Autoantikörper gegen β 1-Rezeptoren festzustellen. Damit konnten in der vorliegenden Studie erstmals Autoantikörper gegen β 1-Rezeptoren bei Dobermann Pinschern in hoher Anzahl nachgewiesen werden, bei erkrankten Hunden mehr (71,3 %) als bei gesunden Hunden (55 %). Einen Beweis für die pathogene Wirkung der Autoantikörper beim Hund konnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht erbringen. Die Ergebnisse lassen jedoch Vermutungen zu einer Korrelation zwischen Autoantikörpern und Arrhythmien zu. Weiterhin könnten Autoantikörper gegen β 1-Rezeptoren beim Dobermann Pinscher ein Frühmarker für die DCM sein, die Messwerte der AAK waren bei einigen Hunden

bereits im kardiologisch unauffälligen Krankheitsstadium erhöht und scheinen im Zuge der Progression der DCM anzusteigen. Diese Thesen sollten in weiteren Studien überprüft werden, da es aus pathophysiologischer Sicht stimmig erscheint, dass AAK gegen β 1-Rezeptoren auch beim Dobermann Pinscher, wenn sie messbar sind, negative Auswirkungen haben. Wenn es gelingt, diesen vermuteten kausalen Zusammenhang in weiteren Studien zu belegen, könnte eine kausale Therapie nicht nur für Menschen mit DCM, sondern auch für Hunde möglich sein und das Wissen über die DCM des Dobermann Pinschers revolutioniert werden.

VII. SUMMARY

Dilated Cardiomyopathy (DCM) is the main reason for severe heart failure in humans, as well as the most common heart disease in large dogs. Doberman Pinschers are an overrepresented breed and develop a more severe form of DCM than other breeds. The prognosis for the Doberman with DCM is poor, many dogs die of sudden death or congestive heart failure. Until today, a genetic disorder for the development of DCM in Doberman Pinschers is assumed and there is no causal cure for the disease. This is in contrast to DCM in humans, where an autoimmune mechanism as an underlying cause for the disease is widely accepted. Agonistic autoantibodies against cardiac receptors, especially against the β 1-receptor, have pathologic properties, due to an overstimulation of the β 1-receptor, that can lead to DCM. Human studies were able to show benefits for heart function and survival, through the removal of those autoantibodies via immunoadsorption. Other, easier applicable therapies are on their way to human medicine. In dogs there are no studies to date, proving that dogs with DCM also develop autoantibodies against β 1-receptors. The reason for this could be that the authors chose unsuitable methods. In this study Doberman Pinschers were examined to define their cardiac health status, using echocardiography and Holter-ECG. The serum of all dogs was tested for autoantibodies against β 1-receptors, we therefore used the most sensitive method to date for the detection of autoantibodies against β 1-receptors, the cardiomyocyte-contraction-assay. In this study we were able to detect autoantibodies against β 1-receptors in Doberman Pinschers for the first time, with higher prevalence in diseased dogs (71.3%) than in healthy ones (55%). We were not able to prove the pathogenic properties of those autoantibodies with our results, but there are hints for a possible correlation between autoantibodies und arrhythmias as well as the idea of a possible use of autoantibodies as early markers of the disease, as they are present in an early stage of the disease, even when no cardiologic abnormalities can be detected, and tend to become more dominant in the progression of the disease. Our results are of interest for further studies. It would be outstanding to prove a causal relationship of autoantibodies and DCM in the Doberman Pinscher, because in this case, a causal cure could be possible, not only for humans with DCM but also for dogs. This would revolutionize the knowledge about DCM in Doberman Pinschers.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Anderton SM. Peptide-based immunotherapy of autoimmunity: a path of puzzles, paradoxes and possibilities. *Immunology* 2001; 104: 367-76.

Archard LC, Richardson PJ, Olsen EG, Dubowitz V, Sewry C, Bowles NE. The role of Coxsackie B viruses in the pathogenesis of myocarditis, dilated cardiomyopathy and inflammatory muscle disease. *Biochem Soc Symp* 1987; 53: 51-62.

Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, Jr., Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987; 1: 3-14.

Armstrong PW, Stopps TP, Ford SE, de Bold AJ. Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiologic studies of heart failure. *Circulation* 1986; 74: 1075-84.

Atwell RB, Kelly WR. Canine parvovirus: a cause of chronic myocardial fibrosis and adolescent congestive heart failure. *J Small Anim Pract* 1980; 21: 609-20.

Baba A, Akaishi M, Shimada M, Monkawa T, Wakabayashi Y, Takahashi M, Nagatomo Y, Yoshikawa T. Complete elimination of cardiodepressant IgG3 autoantibodies by immunoadsorption in patients with severe heart failure. *Circ J* 2010; 74: 1372-8.

Barr SC, Simpson RM, Schmidt SP, Bunge MM, Authement JM, Lozano F. Chronic dilatative myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* in two dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 1237-41.

Beier P, Reese S, Holler PJ, Simak J, Tater G, Wess G. The role of hypothyroidism in the etiology and progression of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 2015; 29: 141-9.

Boivin V, Beyersdorf N, Palm D, Nikolaev VO, Schlipp A, Muller J, Schmidt D,

Kocoski V, Kerkau T, Hunig T, Ertl G, Lohse MJ, Jahns R. Novel Receptor-Derived Cyclopeptides to Treat Heart Failure Caused by Anti-beta1-Adrenoceptor Antibodies in a Human-Analogous Rat Model. *PLoS One* 2015; 10: e0117589.

Bonagura JD. M-mode echocardiography. Basic principles. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1983; 13: 299-319.

Borda E, Pascual J, Cossio P, De La Vega M, Arana R, Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 679-86.

Braz-Ruivo L (1999) An Investigation for latent Parvovirus DNA in the Myocardium and Serum Antibodies against Myosin and Laminin in dogs with Dilated Cardiomyopathy. In: The Faculty of Graduate Studies. The University of Guelph

Buchanan JW, Bucheler J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206: 194-9.

Burk RL. Radiographic examination of the cardiopulmonary system. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1983; 13: 241-58.

Bywater RP. Location and nature of the residues important for ligand recognition in G-protein coupled receptors. *J Mol Recognit* 2005; 18: 60-72.

Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002; 4: 411-7.

Calvert CA, Chapman WL, Jr., Toal RL. Congestive cardiomyopathy in Doberman pinscher dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181: 598-602.

Calvert CA, Brown J. Use of M-mode echocardiography in the diagnosis of

congestive cardiomyopathy in Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189: 293-7.

Calvert CA. Dilated Congestive Cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 1986; 8: 417-30.

Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ, Brown J. Signalment, survival, and prognostic factors in Doberman pinschers with end-stage cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 1997a; 11: 323-6.

Calvert CA, Hall G, Jacobs G, Pickus C. Clinical and pathologic findings in Doberman pinschers with occult cardiomyopathy that died suddenly or developed congestive heart failure: 54 cases (1984-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1997b; 210: 505-11.

Calvert CA, Jacobs GJ, Smith DD, Rathbun SL, Pickus CW. Association between results of ambulatory electrocardiography and development of cardiomyopathy during long-term follow-up of Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 2000a; 216: 34-9.

Calvert CA, Jacobs G, Pickus CW, Smith DD. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with echocardiographic abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 2000b; 217: 1328-32.

Calvert CA, Wall M. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with equivocal echocardiographic evidence of dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 782-4.

Calvert CA, Brown J. Influence of antiarrhythmia therapy on survival times of 19 clinically healthy Doberman pinschers with dilated cardiomyopathy that experienced syncope, ventricular tachycardia, and sudden death (1985-1998). *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 24-8.

Cambridge G, MacArthur CG, Waterson AP, Goodwin JF, Oakley CM. Antibodies to Coxsackie B viruses in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* 1979; 41: 692-6.

Carpenter JL, Roberts RM, Harpster NK, King NW, Jr. Intestinal and cardiopulmonary forms of parvovirus infection in a litter of pups. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 176: 1269-73.

Chen HH, Burnett JC, Jr. The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 406-16.

Chiale PA, Ferrari I, Mahler E, Vallazza MA, Elizari MV, Rosenbaum MB, Levin MJ. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 2001; 103: 1765-71.

Christ T, Wettwer E, Dobrev D, Adolph E, Knaut M, Wallukat G, Ravens U. Autoantibodies against the beta1 adrenoceptor from patients with dilated cardiomyopathy prolong action potential duration and enhance contractility in isolated cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1515-25.

Cobb MA, Odedra R, Latif N, Dunn MJ. Use of indirect immunofluorescence and western blotting to assess the role of circulating antimyocardial antibodies in dogs with dilated cardiomyopathy. *Res Vet Sci* 1994; 56: 245-51.

Costa ND, Labuc RH. Case report: efficacy of oral carnitine therapy for dilated cardiomyopathy in boxer dogs. *J Nutr* 1994; 124: 2687s-92s.

Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM, McManus BM, Fischetti VA, Gauntt CJ. Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses, and human cardiac myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1320-4.

Dandel M, Wallukat G, Englert A, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R. Long-term benefits of immunoabsorption in beta(1)-adrenoceptor autoantibody-positive transplant candidates with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 1374-88.

Day MJ. Inheritance of serum autoantibody, reduced serum IgA and autoimmune disease in a canine breeding colony. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 53: 207-19.

Dec GW, Jr., Palacios IF, Fallon JT, Aretz HT, Mills J, Lee DC, Johnson RA. Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N Engl J Med* 1985; 312: 885-90.

Dixon RM, Reid SW, Mooney CT. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Vet Rec* 1999; 145: 481-7.

Dohlman HG, Caron MG, DeBlasi A, Frielle T, Lefkowitz RJ. Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* 1990; 29: 2335-42.

Dorffel WV, Felix SB, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, Kleber FX, Baumann G, Reinke P. Short-term hemodynamic effects of immunoabsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997; 95: 1994-7.

Dorffel WV, Wallukat G, Dorffel Y, Felix SB, Baumann G. Immunoabsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J Cardiol* 2004; 97: 529-34.

Elies R, Ferrari I, Wallukat G, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J, Levin MJ. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* 1996; 157: 4203-11.

Elies R, Fu LX, Eftekhari P, Wallukat G, Schulze W, Granier C, Hjalmarson A, Hoebeke J. Immunochemical and functional characterization of an agonist-like monoclonal antibody against the M2 acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 1998; 251: 659-66.

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7059-64.

Esposito CT, Varahan S, Jeyaraj D, Lu Y, Stambler BS. Spironolactone improves the arrhythmogenic substrate in heart failure by preventing ventricular electrical activation delays associated with myocardial interstitial fibrosis and inflammation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013; 24: 806-12.

Ettinger SJ, Benitz AM, Ericsson GF, Cifelli S, Jernigan AD, Longhofer SL, Trimboli W, Hanson PD. Effects of enalapril maleate on survival of dogs with naturally acquired heart failure. The Long-Term Investigation of Veterinary Enalapril (LIVE) Study Group. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1573-7.

Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, Elies R, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *J Exp Med* 1995; 182: 59-65.

Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Pathol* 2003; 12: 65-71.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1256-72.

Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest* 2004; 113: 1379-82.

Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 7920-4.

Fuentes VL, Corcoran B, French A, Schober KE, Kleemann R, Justus C. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of pimobendan in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 255-61.

Garg RK, Sorrentino MJ. Beta blockers for CHF. Adrenergic blockade dramatically reduces morbidity and mortality. *Postgrad Med* 2001; 109: 49-56.

Goin JC, Borda E, Leiros CP, Storino R, Sterin-Borda L. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications. *J Auton Nerv Syst* 1994; 47: 45-52.

GROUP TBS. The effect of benazepril on survival times and clinical signs of dogs with congestive heart failure: Results of a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled, long-term clinical trial. *J Vet Cardiol* 1999; 1: 7-18.

GROUP TCS. Controlled clinical evaluation of enalapril in dogs with heart failure: results of the Cooperative Veterinary Enalapril Study Group. The COVE Study Group. *J Vet Intern Med* 1995a; 9: 243-52.

GROUP TIS. Acute and short-term hemodynamic, echocardiographic, and clinical effects of enalapril maleate in dogs with naturally acquired heart failure: results of the Invasive Multicenter PROspective Veterinary Evaluation of Enalapril study. The IMPROVE Study Group. *J Vet Intern Med* 1995b; 9: 234-42.

Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Aptamer binding and neutralization of beta1-adrenoceptor autoantibodies: basics and a vision of its future in cardiomyopathy treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21: 177-82.

Haberland A, Wallukat G, Berg S, Schulz AM, Freyse EJ, Vetter R, Salzsieder E, Muller J, Kreutz R, Schimke I. Neutralization of pathogenic beta1-receptor autoantibodies by aptamers in vivo: the first successful proof of principle in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2014; 393: 177-80.

Haberland A, Holtzhauer M, Schlichtiger A, Bartel S, Schimke I, Muller J, Dandel M, Lupp PB, Wallukat G. Aptamer BC 007 - a broad spectrum neutralizer of pathogenic autoantibodies against G-protein-coupled receptors. *Eur J Pharmacol* 2016;

Hama N, Itoh H, Shirakami G, Nakagawa O, Suga S, Ogawa Y, Masuda I, Nakanishi K, Yoshimasa T, Hashimoto Y, et al. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 92: 1558-64.

Hazlett MJ, Maxie MG, Allen DG, Wilcock BP. A retrospective study of heart disease in doberman pinscher dogs. *Can Vet J* 1983; 24: 205-10.

Herda LR, Trimpert C, Nauke U, Landsberger M, Hummel A, Beug D, Kieback A, Dorr M, Empen K, Knebel F, Ewert R, Angelow A, Hoffmann W, Felix SB, Staudt A. Effects of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin G substitution on cardiopulmonary exercise capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 2010; 159: 809-16.

Hessel FP, Wegner C, Muller J, Glaveris C, Wasem J. Economic evaluation and survival analysis of immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Health Econ* 2004; 5: 58-63.

Hoebeke J. Structural basis of autoimmunity against G protein coupled membrane receptors. *Int J Cardiol* 1996; 54: 103-11.

Hoebeke J. Molecular mechanisms of anti-G-protein-coupled receptor autoantibodies. *Autoimmunity* 2001; 34: 161-4.

Holler PJ, Wess G. Sphericity index and E-point-to-septal-separation (EPSS) to diagnose dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 123-9.

Holthoff HP, Zeibig S, Jahns-Boivin V, Bauer J, Lohse MJ, Kaab S, Clauss S, Jahns R, Schlipp A, Munch G, Ungerer M. Detection of anti-beta1-AR autoantibodies in heart failure by a cell-based competition ELISA. *Circ Res* 2012; 111: 675-84.

Huber SA, Moraska A. Cytolytic T lymphocytes and antibodies to myocytes in adriamycin-treated BALB/c mice. Evidence for immunity to drug-induced antigens. *Am J Pathol* 1992; 140: 233-42.

investigators S. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327: 685-91.

Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H, Ogawa S. Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 418-24.

Jacobs G, Calvert C, Kraus M. Hepatopathy in 4 dogs treated with amiodarone. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 96-9.

Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse MJ, Boege F. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation* 1999; 99: 649-54.

Jahns R, Boivin V, Krapf T, Wallukat G, Boege F, Lohse MJ. Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1280-7.

Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2004; 113: 1419-29.

Jahns R, Boivin V, Lohse MJ. beta(1)-Adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16: 20-4.

Jahns R, Boege F. Questionable Validity of Peptide-Based ELISA Strategies in the Diagnostics of Cardiopathogenic Autoantibodies That Activate G-Protein-Coupled Receptors. *Cardiology* 2015; 131: 149-50.

Jane-wit D, Altuntas CZ, Johnson JM, Yong S, Wickley PJ, Clark P, Wang Q, Popovic ZB, Penn MS, Damron DS, Perez DM, Tuohy VK. Beta 1-adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 2007; 116: 399-410.

Janus I, Noszczyk-Nowak A, Nowak M, Cepiel A, Ciaputa R, Paslawska U, Dziegiel P, Jablonska K. Myocarditis in dogs: etiology, clinical and histopathological features (11 cases: 2007-2013). *Ir Vet J* 2014; 67: 28.

Joshi-Barr S, Haberland A, Bartel S, Muller J, Choi T, Wallukat G. High throughput bioassay for beta1-adrenoceptor autoantibody detection. *Int J Cardiol* 2016; 219: 98-104.

Keene BW, Panciera DP, Atkins CE, Regitz V, Schmidt MJ, Shug AL. Myocardial L-carnitine deficiency in a family of dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 647-50.

Kittleson MD, Keene B, Pion PD, Loyer CG. Results of the multicenter spaniel trial (MUST): taurine- and carnitine-responsive dilated cardiomyopathy in American cocker spaniels with decreased plasma taurine concentration. *J Vet Intern Med* 1997; 11: 204-11.

Klüser L, Holler PJ, Simak J, Tater G, Smets P, Rügamer D, Küchenhoff H, Wess G. Predictors of Sudden Cardiac Death in Doberman Pinschers with Dilated Cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30: 722-32.

Knebel F, Bohm M, Staudt A, Borges AC, Tepper M, Jochmann N, Wernicke KD, Felix S, Baumann G. Reduction of morbidity by immunoadsorption therapy in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2004; 97: 517-20.

Kramer GA, Kittleson MD, Fox PR, Lewis J, Pion PD. Plasma taurine concentrations in normal dogs and in dogs with heart disease. *J Vet Intern Med* 1995; 9: 253-8.

Kraus MS, Thomason JD, Fallaw TL, Calvert CA. Toxicity in Doberman Pinchers with ventricular arrhythmias treated with amiodarone (1996-2005). *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1-6.

Lazzerini PE, Capecchi PL, Guideri F, Acampa M, Selvi E, Bisogno S, Galeazzi M, Laghi-Pasini F. Autoantibody-mediated cardiac arrhythmias: mechanisms and clinical implications. *Basic Res Cardiol* 2008; 103: 1-11.

Lee H-C, Huang KTL, Wang X-L, Shen W-K. Autoantibodies and Cardiac Arrhythmias. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2011; 8: 10.1016/j.hrthm.2011.06.032.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339: 321-8.

Lewandrowski K, Chen A, Januzzi J. Cardiac markers for myocardial infarction. A brief review. *Am J Clin Pathol* 2002; 118 Suppl: S93-9.

Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Assessment of immune modulation of beta-adrenergic pathways in human dilated cardiomyopathy: influence of methodologic factors. *Am Heart J* 1992; 123: 967-70.

Limas CJ. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy: a pathogenetic role? *Circulation* 1997; 95: 1979-80.

Lukitsch I, Kehr J, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelha M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M. Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation* 2012; 94: 8-13.

Luppi P, Rudert WA, Zanone MM, Stassi G, Trucco G, Finegold D, Boyle GJ, Del Nido P, McGowan FX, Jr., Trucco M. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen-driven autoimmune disease. *Circulation* 1998; 98: 777-85.

MacDonald KA, Kittleson MD, Munro C, Kass P. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 172-7.

Macintire DK, Snider TG, 3rd. Cardiac arrhythmias associated with multiple trauma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 541-5.

Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 1994; 89: 2760-7.

Magnusson Y, Hjalmarson A, Hoebeke J. Beta 1-adrenoceptor autoimmunity in cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996; 54: 137-41.

Marquis JK, Grindel JM. Toxicological evaluation of oligonucleotide therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 2000; 2: 258-63.

Massie BM, Schiller NB, Ratshin RA, Parmley WW. Mitral-septal separation: new echocardiographic index of left ventricular function. *Am J Cardiol* 1977; 39: 1008-16.

Matsui S, Fu ML, Shimizu M, Fukuoka T, Teraoka K, Takekoshi N, Murakami E, Hjalmarson A. Dilated cardiomyopathy defines serum autoantibodies against G-protein-coupled cardiovascular receptors. *Autoimmunity* 1995; 21: 85-8.

Mäurer J (2010) Diagnostische Parameter für die dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann. Ludwigs-Maximilians-Universität München

Mausberg TB, Wess G, Simak J, Keller L, Drogemuller M, Drogemuller C, Webster MT, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Leeb T. A locus on chromosome 5 is associated with dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *PLoS One* 2011; 6: e20042.

Meurs KM, Spier AW, Wright NA, Hamlin RL. Comparison of in-hospital versus 24-hour ambulatory electrocardiography for detection of ventricular premature complexes in mature Boxers. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 222-4.

Meurs KM, Fox PR, Norgard M, Spier AW, Lamb A, Koplitz SL, Baumwart RD. A prospective genetic evaluation of familial dilated cardiomyopathy in the Doberman pinscher. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1016-20.

Meurs KM, Lahmers S, Keene BW, White SN, Oyama MA, Mauceli E, Lindblad-Toh K. A splice site mutation in a gene encoding for PDK4, a mitochondrial protein, is associated with the development of dilated cardiomyopathy in the Doberman pinscher. *Hum Genet* 2012; 131: 1319-25.

Mijares A, Lebesgue D, Argibay J, Hoebeke J. Anti-peptide antibodies sensitive to the 'active' state of the beta2-adrenergic receptor. *FEBS Lett* 1996; 399: 188-91.

Mijares A, Lebesgue D, Wallukat G, Hoebeke J. From agonist to antagonist: Fab fragments of an agonist-like monoclonal anti-beta(2)-adrenoceptor antibody behave as antagonists. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 373-9.

Morita H, Seidman J, Seidman CE. Genetic causes of human heart failure. *J Clin*

Invest 2005; 115: 518-26.

Morrow DA. Troponins in patients with acute coronary syndromes: biologic, diagnostic, and therapeutic implications. *Cardiovasc Toxicol* 2001; 1: 105-10.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després J-P, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. A Report From the American Heart Association 2015;

Muller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101: 385-91.

Munch G, Boivin-Jahns V, Holthoff HP, Adler K, Lappo M, Truol S, Degen H, Steiger N, Lohse MJ, Jahns R, Ungerer M. Administration of the cyclic peptide COR-1 in humans (phase I study): ex vivo measurements of anti-beta1-adrenergic receptor antibody neutralization and of immune parameters. *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 1230-9.

Nikolaev VO, Boivin V, Stork S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ, Jahns R. A novel fluorescence method for the rapid detection of functional beta1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 423-31.

Noda K, Saad Y, Graham RM, Karnik SS. The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J Biol Chem* 1994; 269: 6743-52.

O'Brien PJ, Ianuzzo CD, Moe GW, Stopps TP, Armstrong PW. Rapid ventricular pacing of dogs to heart failure: biochemical and physiological studies. *Can J*

Physiol Pharmacol 1990; 68: 34-9.

O'Grady M, Horne R (1998) The Prevalence of Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinschers. In: ACVIM Forum, San Diego, US

O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2004; 34: 1187-207.

O'Grady MR, Minors SL, O'Sullivan ML, Horne R. Effect of pimobendan on case fatality rate in Doberman Pinschers with congestive heart failure caused by dilated cardiomyopathy. J Vet Intern Med 2008; 22: 897-904.

O'Grady MR, O'Sullivan ML, Minors SL, Horne R. Efficacy of benazepril hydrochloride to delay the progression of occult dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. J Vet Intern Med 2009; 23: 977-83.

O'Grady M, Horne R. The prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman pinschers: a 4.5 year follow-up. J Vet Intern Med 1998; 12: 199.

Owczarek-Lipska M, Mausberg TB, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Wess G, Leeb T. A 16-bp deletion in the canine PDK4 gene is not associated with dilated cardiomyopathy in a European cohort of Doberman Pinschers. Anim Genet 2013; 44: 239.

Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. J Vet Intern Med 2004; 18: 831-9.

Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. Am J Vet Res 2007a; 68: 42-7.

Oyama MA, Sisson DD, Prosek R, Bulmer BJ, Luethy MW, Fuentes VL.

Carvedilol in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2007b; 21: 1272-9.

Oyama MA, Boswood A, Connolly DJ, Ettinger SJ, Fox PR, Gordon SG, Rush JE, Sisson DD, Stepien RL, Wess G, Zannad F. Clinical usefulness of an assay for measurement of circulating N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs and cats with heart disease. *J Am Vet Med Assoc* 2013; 243: 71-82.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000; 289: 739-45.

Peddle GD, Singletary GE, Reynolds CA, Trafny DJ, Machen MC, Oyama MA. Effect of torsemide and furosemide on clinical, laboratory, radiographic and quality of life variables in dogs with heart failure secondary to mitral valve disease. *J Vet Cardiol* 2012; 14: 253-9.

Petric AD, Stabej P, Zemva A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, Causes of Death and a Pedigree Review in a Related Line. *J Vet Cardiol* 2002; 4: 17-24.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 639-50.

Pion PD, Kittleson MD, Rogers QR, Morris JG. Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. *Science* 1987; 237: 764-8.

Pouleur H, Hanet C, Schroder E, Col J, Van Mechelen H, Etienne J, Rousseau MF. Effects of pimobendan (UD-CG 115 BS) on left ventricular inotropic state in conscious dogs and in patients with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14 Suppl 2: S18-22.

Regitz V, Shug AL, Fleck E. Defective myocardial carnitine metabolism in congestive heart failure secondary to dilated cardiomyopathy and to coronary, hypertensive and valvular heart diseases. *Am J Cardiol* 1990; 65: 755-60.

Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993; 14: 426-30.

Rose NR. Infection, mimics, and autoimmune disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 943-4.

Sanderson JE, Koech D, Iha D, Ojiambo HP. T-lymphocyte subsets in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1985; 55: 755-8.

Schulze W, Kunze R, Wallukat G. Pathophysiological role of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Experimental & Clinical Cardiology* 2005; 10: 170-2.

Scott-Moncrieff JC. Clinical signs and concurrent diseases of hypothyroidism in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007; 37: 709-22, vi.

Singletary GE, Morris NA, Lynne O'Sullivan M, Gordon SG, Oyama MA. Prospective evaluation of NT-proBNP assay to detect occult dilated cardiomyopathy and predict survival in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 2012; 26: 1330-6.

Sjostrand K, Wess G, Ljungvall I, Haggstrom J, Merveille AC, Wiberg M, Gouni V, Lundgren Willesen J, Hanas S, Lequarre AS, Mejer Sorensen L, Wolf J, Tired L, Kierczak M, Forsberg S, McEntee K, Battaille G, Seppala E, Lindblad-Toh K, Georges M, Lohi H, Chetboul V, Fredholm M, Hoglund K. Breed differences in natriuretic peptides in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 451-7.

Smucker ML, Kaul S, Woodfield JA, Keith JC, Manning SA, Gascho JA. Naturally occurring cardiomyopathy in the Doberman pinscher: a possible large

animal model of human cardiomyopathy? *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 200-6.

Solcia E, Ballerini L, Bellini O, Magrini U, Bertazzoli C, Tosana G, Sala L, Balconi F, Rallo F. Cardiomyopathy of doxorubicin in experimental animals, Factors affecting the severity, distribution and evolution of myocardial lesions. *Tumori* 1981; 67: 461-72.

Stanek G, Klein J, Bittner R, Glogar D. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1990; 322: 249-52.

Staudt Y, Mobini R, Fu M, Felix SB, Kuhn JP, Staudt A. Beta1-adrenoceptor antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2003; 466: 1-6.

Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno MF, Gimeno AL, Diez C, Laguens RP, Meckert PC, Arana RM. Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects. *Cardiovasc Res* 1976; 10: 613-22.

Störk S, Boivin V, Horf R, Hein L, Lohse MJ, Angermann CE, Jahns R. Stimulating autoantibodies directed against the cardiac β 1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *American Heart Journal* 2004; 152: 697-704.

Summerfield NJ, Boswood A, O'Grady MR, Gordon SG, Dukes-McEwan J, Oyama MA, Smith S, Patteson M, French AT, Culshaw GJ, Braz-Ruivo L, Estrada A, O'Sullivan ML, Loureiro J, Willis R, Watson P. Efficacy of pimobendan in the prevention of congestive heart failure or sudden death in Doberman Pinschers with preclinical dilated cardiomyopathy (the PROTECT Study). *J Vet Intern Med* 2012; 26: 1337-49.

Thomason JD, Rapoport G, Fallaw T, Calvert CA. The influence of enalapril and spironolactone on electrolyte concentrations in Doberman pinschers with dilated

cardiomyopathy. *Vet J* 2014; 202: 573-7.

Tidholm A, Jonsson L. A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases). *J Am Anim Hosp Assoc* 1997; 33: 544-50.

Tidholm A, Svensson H, Sylven C. Survival and prognostic factors in 189 dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Anim Hosp Assoc* 1997; 33: 364-8.

Tidholm A, Haggstrom J, Jonsson L. Prevalence of attenuated wavy fibers in myocardium of dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212: 1732-4.

Tidholm A, Haggstrom J, Borgarelli M, Tarducci A. Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: Aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology. *Vet J* 2001; 162: 92-107.

Tidholm A, Jonsson L. Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy. *Vet Pathol* 2005; 42: 1-8.

Trimpert C, Herda LR, Eckerle LG, Pohle S, Muller C, Landsberger M, Felix SB, Staudt A. Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy: long-term reduction of cardiodepressant antibodies. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 685-91.

van Meel JC, Diederens W. Hemodynamic profile of the cardiotonic agent pimobendan. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14 Suppl 2: S1-6.

Venter JC, Fraser CM, Harrison LC. Autoantibodies to beta 2-adrenergic receptors: a possible cause of adrenergic hyporesponsiveness in allergic rhinitis and asthma. *Science* 1980; 207: 1361-3.

Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim*

Acta 1987a; 46: S634-9.

Wallukat G, Wollenberger A. Involvement of β 2-Adrenergic Receptors in the Potentiation of the Chronotropic Action of Isoprenaline Evoked in Rocker-Cultured Neonatal Rat Heart Cells by Pyruvate and L(+)-Lactate. In: Pharmacological Aspects of Heart Disease: Proceedings of an International Symposium on Heart Metabolism in Health and Disease and the Third Annual Cardiology Symposium of the University of Manitoba, July 8–11, 1986, Winnipeg, Canada. Beamish RE, Panagia V, Dhalla NS, eds. Boston, MA: Springer US 1987b: 217-31.

Wallukat G, Morwinski M, Kowal K, Forster A, Boewer V, Wollenberger A. Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization. *Eur Heart J* 1991; 12 Suppl D: 178-81.

Wallukat G, Wollenberger A. Autoantibodies to beta 2-adrenergic receptors with antiadrenergic activity from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 581-7.

Wallukat G, Wollenberger A, Morwinski R, Pitschner HF. Anti-beta 1-adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 397-406.

Wallukat G, Reinke P, Dorffel WV, Luther HP, Bestvater K, Felix SB, Baumann G. Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *Int J Cardiol* 1996; 54: 191-5.

Wallukat G, Haberland A, Berg S, Schulz A, Freyse EJ, Dahmen C, Kage A, Dandel M, Vetter R, Salzsieder E, Kreutz R, Schimke I. The first aptamer-apheresis column specifically for clearing blood of beta1-receptor autoantibodies. *Circ J* 2012; 76: 2449-55.

Wallukat G, Schimke I. Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. *Semin Immunopathol* 2014; 36: 351-63.

Wess G, Schulze A, Geraghty N, Hartmann K. Ability of a 5-minute electrocardiography (ECG) for predicting arrhythmias in Doberman Pinschers with cardiomyopathy in comparison with a 24-hour ambulatory ECG. *J Vet Intern Med* 2010a; 24: 367-71.

Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJ, Maeurer J, Hartmann K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med* 2010b; 24: 533-8.

Wess G, Simak J, Mahling M, Hartmann K. Cardiac troponin I in Doberman Pinschers with cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010c; 24: 843-9.

Wess G, Maurer J, Simak J, Hartmann K. Use of Simpson's method of disc to detect early echocardiographic changes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010d; 24: 1069-76.

Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Am J Vet Res* 2011; 72: 642-9.

Woodiwiss AJ, Tsoetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 2001; 103: 155-60.

IX. DANKSAGUNG

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, sei es fachlich, mental oder weil sie einfach für mich da waren.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Gerhard Wess, für die Aufnahme ins Kardioteam und die Möglichkeit zu promovieren bedanken. Lieber Gerhard, vielen Dank! Dank dir habe ich meine Leidenschaft für die Kardiologie entdeckt, was mich beruflich sehr erfüllt. Vielen herzlichen Dank auch für die positive Unterstützung zur Verbesserung meiner Arbeit bis zur allerletzten Minute.

Ein großes Dankeschön geht auch an Andreas Hueck und Andreas Bender vom Statistik Institut der LMU, die sich sehr kurzfristig meinem Projekt angenommen und mich trotz vieler Rückfragen super unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Prof. Ingolf Schimke von der Charité Berlin, Herrn Dr. Johannes Müller von der Firma Berlin Cures und Dr. Gerd Wallukat vom MDC Berlin für ihre herausragende wissenschaftliche Arbeit und die gute Zusammenarbeit. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Herrn Dr. Wallukat für die Durchführung der Autoantikörpermessungen, das Korrekturlesen und die immer freundliche Beantwortung meiner vielen Fragen.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Dr. Thomas Steffen, dessen Unterstützung in der Klinik mir in der Zeit vor der Abgabe viel Druck genommen hat, sowie allen meinen lieben Kollegen der Tierklinik Oberhaching, die für mich da waren und Dienste übernommen haben um mich zu entlasten. Vielen Dank!

Auch bei meinem ehemaligen Team, dem Kardioteam, möchte ich mich ganz ganz herzlich bedanken für die lustige und lehrreiche Zeit. Danke an Livi, Alex, Maria und Lena für die Unterstützung und die zahllosen lustigen Momente („steht der immer noch da?“, Doooooooooobeerrrrmannnn, Dobsch....) die ich nie vergessen werde. Conny, Guy und Pascale, die zu den herzlichsten Menschen gehören die ich kenne. Weiters ergeht ein besonderer Dank an Peter, von dem ich unglaublich viel gelernt habe, vor allem, aber nicht nur über Kardiologie. Einmal Kardio, immer Kardio - Gynamstyle forever.

Danke an Flo, ohne dich hätte ich es nicht geschafft. Danke für deine Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke fürs gemeinsame brainstorming, Stabi Sessions ohne Ende (um 8.00 Uhr gell) und alles andere, es lässt sich nicht aufzählen. Du bist einer der besten Menschen die ich kenne.

Danke lieber Daniel, für deine Liebe und das du mich immer förderst über mich hinauszuwachsen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken. Ohne euch wäre dies und so viel mehr nie möglich gewesen. Ich danke euch von Herzen für eure Liebe und grenzenlose Unterstützung.