

Aus der Klinik für Innere Medizin B
Direktor Univ. Prof. Dr. med. Stephan B. Felix
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

Langzeituntersuchungen von Autoantikörpern bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nach Immunadsorption

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

Seminarraum

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt Universität

Greifswald

2013

vorgelegt von: Susanne Pohle
geb. am: 22.08.1984
in: Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: PD Dr. med. A. Riad

2. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Stangl

Ort/Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Seminarraum Innere Medizin B

Tag der Disputation: 30. Januar 2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kardiomyopathien	1
1.2	Die dilatative Kardiomyopathie	3
1.2.1	Epidemiologie der dilatativen Kardiomyopathie	3
1.2.2	Symptome, Diagnostik und Pathophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie	4
1.2.3	Kalziumhomöostase am gesunden und insuffizienten Herzen	8
1.2.4	Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie	10
1.2.4.1	Genetisch-familiär begründete Erkrankungsfälle	11
1.2.4.2	Einfluss viraler Infektionen und die Entwicklung von Autoimmunität	12
1.2.4.3	Die Bedeutung von Autoantikörpern	14
1.3	Therapieformen der dilatativen Kardiomyopathie	16
1.3.1	Konventionelle Therapieformen	16
1.3.2	Die Bedeutung der Immunadsorptionstherapie	18
1.3.2.1	Einfluss der Immunadsorption auf das humorale und zelluläre Immunsystem bei der dilatativen Kardiomyopathie	18
2	Fragestellung	21
3	Materialien und Methoden	22
3.1	Studienkollektiv	22
3.2	Erhebung der klinischen Parameter	23
3.3	Erhebung der bioptischen Parameter	23
3.4	Immunadsorptionstherapie	24
3.5	Versuchstiere	24
3.6	Isolation der Rattenkardiomyozyten	25
3.6.1	Vorbereitungen	25
3.6.2	Organentnahme und Präparation	26
3.6.3	Enzymperfusion und Isolation	26
3.6.4	Zellzählung	27
3.6.5	Zellfärbung und Zelladhäsion	28
3.7	Aufarbeitung der Patientenplasmen	29
3.7.1	Miniadsorption (in-vitro-Adsorption)	29

3.7.2	Dialyse des In-vitro-Eluats	30
3.8	Messung der Zellkontraktion und des Kalzium-Transienten	31
3.8.1	Messvorrichtung.....	31
3.8.2	Messablauf.....	32
3.9	Auswertung der Messergebnisse.....	33
3.10	Statistik und Datenverarbeitung.....	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Patientencharakteristik	35
4.2	Messungen von Kontraktilität und Kalziumtransient vor Immunadsorption	37
4.3	Verlauf nach Immunadsorption.....	40
4.3.1	Entwicklung klinischer Parameter nach Immunadsorption.....	40
4.3.1.1	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)	40
4.3.1.2	Linksventrikuläre Diameter	41
4.3.1.3	NYHA-Stadium	43
4.3.1.4	Spiroergometrie	44
4.3.2	Entwicklung von Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption	45
4.3.3	Korrelation der linksventrikulären Ejektionsfraktion mit dem Inotropieverhalten und Kalziumtransienten nach Immunadsorption	48
4.4	Entwicklung von LVEF, Inotropie und Kalziumtransienten in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, Krankheitsdauer und Biopsiebefunden	51
4.4.1	Einfluss des Geschlechtes auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption	51
4.4.2	Einfluss des Alters auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption	53
4.4.3	Einfluss der Krankheitsdauer auf linksventrikuläre Ejektions- fraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption..	55
4.4.4	Einfluss von präinterventionellen Biopsiebefunden auf linksventrikulärer Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient	58
4.4.4.1	Einfluss einer Inflammation auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient vor	

	Immunadsorption	58
4.4.4.2	Verlauf von LVEF, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption in Abhängigkeit einer Inflammation	59
4.4.4.3	Einfluss von Immunkomplexmarkern auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient vor Immunadsorption	61
4.4.4.4	Verlauf von linksventrikulärer Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption in Abhängigkeit von MHC-II-Expression.....	62
4.4.4.5	Einfluss einer Viruserkrankung auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient vor Immunadsorption	64
4.4.4.6	Verlauf der linksventrikulären Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption in Abhängigkeit einer Viruserkrankung.....	65
5	Diskussion	67
5.1	Autoimmunität bei der dilatativen Kardiomyopathie	67
5.2	Langzeituntersuchungen nach Immunadsorption	75
6	Zusammenfassung.....	88
7	Eidesstattliche Erklärung	90
8	Danksagung	91
9	Literaturverzeichnis	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Vereinfachtes Schema der Kalziumhomöostase im gesunden Kardiomyozyten.....	9
Abbildung 3.1	Schematischer Aufbau der Langendorff-Apparatur.....	27
Abbildung 3.2	Verfahren der Miniadsorption zur IgG-Gewinnung aus Patientenplasma.....	30
Abbildung 3.3	Ionoptix-Fluoreszenzanlage.....	32
Abbildung 3.4	Kontraktionszyklus am isolierten Rattenkardiomyozyten.....	33
Abbildung 4.1	Inotropie und Ca^{2+} -Transient der negativ-inotropen und nicht negativ-inotropen Gruppe vor Immunadsorption.....	38
Abbildung 4.2	Entwicklung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) vor und nach Immunadsorption in der negativ-inotropen und nicht negativ-inotropen Gruppe.....	41
Abbildung 4.3	LVEDD im Verlauf.....	42
Abbildung 4.4	LVESD im Verlauf.....	42
Abbildung 4.5	NYHA-Stadien im Verlauf.....	43
Abbildung 4.6	Inotropieverhalten beider Gruppen im Verlauf nach IA.....	46
Abbildung 4.7	Verlauf des Ca^{2+} -Transienten beider Gruppen nach IA.....	47
Abbildung 4.8	Entwicklung von LVEF, Kontraktilität und Ca^{2+} -Transienten der negativ inotropen Gruppe im Verlauf.....	48
Abbildung 4.9	Entwicklung von LVEF, Kontraktilität und Ca^{2+} -Transient der nicht-negativ inotropen Gruppe im Verlauf.....	49
Abbildung 4.10	Korrelation von Kontraktilitätsverhalten und LVEF.....	50
Abbildung 4.11	Korrelation von Ca^{2+} -Transient und LVEF.....	51
Abbildung 4.12	Vergleich des Inotropieverhaltens beider Geschlechter im Verlauf nach IA.....	52
Abbildung 4.13	Entwicklung der LVEF beider Geschlechter im Verlauf nach IA.....	53
Abbildung 4.14	Veränderung der Inotropie in Abhängigkeit vom Alter.....	54
Abbildung 4.15	Veränderung der LVEF in Abhängigkeit vom Alter.....	55
Abbildung 4.16	Mittlere Krankheitsdauer zum Zeitpunkt der Immunadsorption.....	55
Abbildung 4.17	Einfluss der mittleren Krankheitsdauer auf die Entwicklung der Kontraktilität nach Immunadsorption.....	56

Abbildung 4.18 Einfluss der mittleren Krankheitsdauer auf die Entwicklung der LVEF nach Immunadsorption.....	57
Abbildung 4.19 Verhalten von LVEF, Inotropie und Ca ²⁺ -Transient in Abhängigkeit eines positiven (Inflamm +) oder negativen Inflammationsbefundes (Inflamm -) vor IA.....	59
Abbildung 4.20 Verlauf der LVEF nach Immunadsorption in Abhängigkeit eines positiven (Inflamm+) oder negativen (Inflamm-) Inflammationsbefundes vor IA.....	60
Abbildung 4.21 Verlauf der Inotropie nach Immunadsorption in Abhängigkeit eines positiven (Inflamm+) oder negativen (Inflamm-) Inflammationsbefundes vor IA.....	61
Abbildung 4.22 Verhalten von LVEF, Inotropie und Ca ²⁺ -Transient in Abhängigkeit der MHC-II-Expression vor IA.....	62
Abbildung 4.23 Verlauf der LVEF nach Immunadsorption in Abhängigkeit des Ausprägungsgrades der MHC-II-Expression.....	63
Abbildung 4.24 Verlauf der Inotropie nach Immunadsorption in Abhängigkeit des Ausprägungsgrades der MHC-II-Expression.....	63
Abbildung 4.25 Verhalten der experimentellen und klinischen Parameter in Abhängigkeit des positiven (Vir +) oder negativen (Vir -) Virusnachweises vor Immunadsorption.....	64
Abbildung 4.26 Verlauf der LVEF nach Immunadsorption in Abhängigkeit des Virusbefundes vor Immunadsorption.....	65
Abbildung 4.27 Verlauf der Inotropie nach Immunadsorption in Abhängigkeit des Virusbefundes vor Immunadsorption.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Einteilung der Kardiomyopathien nach Empfehlung der (AHA)	2
Tabelle 1.2 Diagnosekriterien der dilatativen Kardiomyopathie	5
Tabelle 1.3 Empfehlungen zur Entnahme von endomyokardialen Biopsien (EMB) in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes.....	6
Tabelle 1.4 Weber-Klassifikation der Herzinsuffizienz anhand der Spiroergometrie ..	8
Tabelle 1.5 Auswahl mutierter Genloci und deren Funktion bei der familiären DCM	12
Tabelle 1.6 Autoantikörper bei DCM.....	15
Tabelle 3.1 Pufferlösungen und Enzymlösungen	25
Tabelle 4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs vor Immunadsorption	36
Tabelle 4.2 Klinische Parameter beider Patientengruppen im Vergleich vor IA.....	39
Tabelle 4.3 Entwicklung der körperlichen Belastbarkeit im Verlauf	44

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer
AC	Adenylatcyclase
AD	Autosomal-dominant
AHA	American Heart Association
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AR	Autosomal-rezessiv
ARVC	Arrhythmogen-rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AT-1-Antagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten
ADP/ATP	Adenosin-Di-/Tri-Phosphat
AV-Block	Atrio-ventrikulärer Block
BALB/c	Speziell gezüchtete Albino-Mäuseinzuchtlinie
BMI	Body mass index
BNP	B-Typ (brain) des natriuretischen Peptides
CAM	Cell adhesion molecule
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CHARM-added study	Candesartan in heart failure – assessment in reduction of mortality and morbidity
CI	Cardiac index (Herzindex)
CONSENSUS	Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study
COPERNICUS	Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Trial
cTnI	Kardiales Troponin I
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EMB	Endomyokardbiopsie
EMPHASIS	Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study
ESC	European Society of Cardiology
FDC	Familiäre dilatative Kardiomyopathie
FS	Fractional shorting

HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
Hsp	Hitze-Schock-Protein
IA	Immunadsorption
IFN- γ	Interferon γ
I2PP1	Inhibitor der Proteinphosphatase 1
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
IVIG	Intravenöses Immunglobulin
KHK	Koronare Herzerkrankung
LV	Linker Ventrikel
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVNC	Leftventricular noncompaction
MHC	Major histocompatibility complex
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NT-pro BNP	N-terminal pro brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCWP	Pulmonal capillary wedge pressure
PD-1- Rezeptor	Programmed-death-1-Rezeptor
PKA	Proteinkinase A
PVB-19	Parvovirus B19
RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RECOVER	Research into Etanercept: Cytokine Antagonism in Ventricular Dysfunction
RENAISSANCE	Randomized Etanercept North American Strategy to Study Antagonism of Cytokines
RENEWAL	Randomised EtaNErcept Worldwide evALuation
ROCM	Recent onset cardiomyopathy

RV	Rechter Ventrikel
RYR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SOLVD	Studies Of Left Ventricular Dysfunktion
SVI	Stroke volume index
SVR	Systemic vascular resistance
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tnl	Troponin-Inhibitor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
WHO	World Health Organization
ZVD	Zentralvenöser Druck

1 Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien stellen eine Reihe von Herzmuskelerkrankungen dar, welche durch die Entwicklung einer terminalen Herzinsuffizienz, schwerer Arrhythmien oder plötzlichem Herztod zu einem Hauptgrund der kardiovaskulären Mortalität in der heutigen Zeit gehören (1,2). Die einzelnen Formen der Kardiomyopathien zeigen eine große Heterogenität in ihrer klinischen und morphologischen Erscheinung und können entweder auf den Herzmuskel beschränkt oder Teil einer Systemerkrankung sein. Sowohl verschiedene molekulare und genetische Faktoren, als auch umwelt-assoziierte und individuelle Aspekte scheinen das komplexe Bild der Kardiomyopathien zu beeinflussen (3).

Die American Heart Association (AHA) legte im Jahr 2006 eine einheitliche, aktuell gültige Klassifikation dieser Erkrankungsgruppe fest, veröffentlicht durch Maron et al. (4). In einer früheren Definition der World Health Organisation (WHO) und der International Society and Federation of Cardiology sprach man bei Kardiomyopathien noch von „spezifischen Herzmuskelerkrankungen unklarer Ursache“ (5). In der Klassifikation der AHA werden primäre (genetisch, gemischt und erworben) und sekundäre Kardiomyopathien (als Folge von Systemerkrankungen) unterschieden, wobei neue Erkenntnisse der molekularen Genetik und die Bedeutung von Kanalopathien in der Genese von Kardiomyopathien hier berücksichtigt wurden. Als grundlegende Definition wurde formuliert, dass innerhalb der heterogenen Gruppe der Kardiomyopathien eine mechanisch und/oder elektrische Dysfunktion besteht, die nicht ausnahmslos zu einer ventrikulären Hypertrophie oder Dilatation führt (6). Nicht berücksichtigt in der aufgeführten Klassifikation von Maron et al. (7) (Tabelle 1.1), ist die ischämische Kardiomyopathie, die in der Regel einer myokardialen Ischämie geschuldet ist. Nicht beachtet wurden Kardiomyopathien, denen ein metastatisches oder primär tumoröses Geschehen zu Grunde liegt (z.B. infiltrativ wachsende myokardiale oder endokardiale Tumore).

Primäre Kardiomyopathien	genetisch	HCM, ARVC/D, LVNC, Ionenkanalstörungen (long-QT-Syndrom, Brugada-Syndrom), mitochondriale Myopathien, Erregungsleitungsstörungen (Lenègre-Syndrom)
	gemischt	DCM, restriktive nicht-hypertrophe Kardiomyopathie
	erworben	Myokarditis, Tako-Tsubo, peripartal, Tachykardie-induziert, Kardiomyopathie bei Kindern diabetischer Mütter
Sekundäre Kardiomyopathien	infiltrativ	Amyloidose, Morbus Gaucher
	Speicherkrankheiten	Hämochromatose, Morbus Fabry, Niemann-Pick
	toxisch	Drogen, Schwermetalle, Chemikalien
	endomyokardial	endomyokardiale Fibrosen
	inflammatorisch	Sarkoidose
	endokrinologisch	Diabetes mellitus, Hyper- und Hypothyreose, Hyperparathyroidismus, Phäochromozytom, Akromegalie
	neuromuskulär	Friedreich-Ataxie, Duchenne-Becker, Neurofibromatose
	nutritiv	Beriberi, Pellagra, Selen, Kwashiorkor
	autoimmun	Syst. Lupus erythematoses, Dermatomyositis, rheumatoide Arthritis, Sklerodermie, Polyarteriitis nodosa
	Elektrolytstörungen	
Chemotherapie-induziert	Doxorubicin, Daunorubicin, Cyclophosphamid	

Tabelle 1.1 Einteilung der Kardiomyopathien nach Empfehlung der (AHA)

nach Maron et al. (8), **HCM** - hypertrophic cardiomyopathy, **ARVC/D** - arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathies/ dysplasia, **LVNC** - left ventricular noncompaction, **DCM** – dilatative Kardiomyopathie

2008 veröffentlichte die Arbeitsgruppe für Myo- und Perikarderkrankungen der European Society of Cardiology (ESC) einen Vorschlag für eine Klassifikation, in der Kardiomyopathien als Myokarderkrankungen mit strukturellen und funktionalen Veränderungen des Gewebes definiert wurden. Es sollten das klinische Bild sowie morphologische und funktionelle Kriterien im Vordergrund stehen. Kardiomyopathien stellen somit myokardiale Erkrankungen dar, die einen strukturell oder funktionell veränderten Herzmuskel in Abwesenheit einer koronaren Herzerkrankung, eines Bluthochdruckes, einer Herzklappen- oder angeborenen Herzerkrankung aufweisen. In dieser Einteilung wird zwischen familiären und nicht-familiären Formen unterschieden, um die genetischen Determinanten bei Kardiomyopathien hervorzuheben (9).

1.2 Die dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste Form der Kardiomyopathien. Diese irreversible Veränderung des Myokards ist charakterisiert durch eine Vergrößerung des linken oder beider Ventrikel und einer systolischen Dysfunktion mit normwertiger linksventrikulärer Wanddicke sowie dem gleichzeitigen Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung (KHK), von Klappenvitien oder eines Cor hypertensivum (10,11). Die DCM ist einer der häufigsten Gründe für eine progressive Herzinsuffizienz und letztlich, neben der koronaren Herzerkrankung, eine der Hauptindikation für eine Herztransplantation (12). In den Jahren 1982 bis 2008 wurden 45% aller Herztransplantationen aufgrund einer terminalen DCM vorgenommen (13).

1.2.1 Epidemiologie der dilatativen Kardiomyopathie

Im Jahr 1989 beschrieben Codd et al. eine Prävalenz der DCM von 36,5 Patienten/100.000 Einwohner in den westlichen Industrieländern (14). Neuere Erkenntnisse lassen eine weitaus höhere Prävalenz vermuten. In der CHARM-Added-Studie von 2003 konnte gezeigt werden, dass eine Herzinsuffizienz mit verminderter linksventrikulärer Pumpfunktion in 26% der Fälle durch eine DCM hervorgerufen wurde (15). Maron et al. beschrieben später eine geschätzte Prävalenz von 1:2500 (16). Zudem scheinen Männer und Farbige ein 2,5-fach höheres Risiko zu haben, an einer DCM zu erkranken (17).

Die Angaben über die jährliche Mortalität der DCM schwanken von 10 bis 50 % (18,19), wobei in bis zu 28 % der Fälle ein plötzlicher Herztod berichtet wird (20). Aber auch Thrombembolien, sowie eine dekompensierte Herzinsuffizienz haben hier einen erheblichen Anteil. In einer Multicenter-Studie von McNamara et al. (2011) wurden demographische und klinische Einflüsse auf die Entwicklung von akuten Kardiomyopathien (ROCM) untersucht (21). Hier konnte gezeigt werden, dass Frauen, sowie ein niedriger initialer LVEDD (left ventricular enddiastolic diameter) und eine inflammatorische Genese, im 6-monatigen follow up ein besseres Outcome mit signifikant höherer linksventrikulärer Ejektionsfraktion zeigen. Afroamerikaner, Patienten mit initial hochgradiger Herzinsuffizienz (NYHA III und IV) sowie hohem LVEDD hatten eine schlechtere Prognose bezüglich Reversibilität der Kardiomyo-

pathie und weisen ein kürzeres Tod- oder Transplantationsintervall auf (22). Grundig et al. identifizierten als negative Prädiktoren neben einer initialen niedrigen linksventrikulären Pumpfunktion auch einen LVEDP (left ventricular enddiastolic pressure) über 15 mmHg, das Vorhandensein eines Linksschenkelblockes und ein Alter über 54 Jahre (23).

1.2.2 Symptome, Diagnostik und Pathophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie

Die Patienten mit DCM weisen klinisch in gut 75% der Fälle Symptome einer Herzinsuffizienz auf, aber auch asymptotische Krankheitsverläufe wurden beschrieben (24,25). Die klinische Einschätzung einer Herzinsuffizienz erfolgt mit Hilfe der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) (26):

- **NYHA I** – Herzerkrankung ohne körperliche Limitation, alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate körperliche Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Dyspnoe oder Angina pectoris
- **NYHA II** – Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit, keine Beschwerden in Ruhe und bei geringer Anstrengung, stärkere körperliche Belastung führt zu körperlicher Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Dyspnoe oder Angina pectoris
- **NYHA III** – Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit, nicht in Ruhe, geringe körperliche Belastung führt zu körperlicher Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Dyspnoe oder Angina pectoris
- **NYHA IV** – Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen Aktivitäten und in Ruhe, Bettlägerigkeit

Oft bleibt die Erkrankung lange unbemerkt und eine medizinische Erstvorstellung erfolgt aufgrund einer dekompensierten Herzinsuffizienz (27). Durch die progressive, vor allem linksventrikuläre Dilatation, kommt es schleichend zu einer abnehmenden kardialen Auswurfleistung und somit zu schnellerer Ermüdbarkeit, geringerer Belastungsfähigkeit und Dyspnoe (NYHA III-IV). Im fortgeschrittenen Stadium, bei zunehmender Rechtsherzinsuffizienz können periphere Ödeme und Aszitesbildung hinzukommen. In 20-35% der Fälle klagen die Patienten über pektanginöse Beschwerden und anhaltende Herzrhythmusstörungen. EKG-Veränderungen wie Linksschenkelblöcke können einsetzen (28,29).

Um die anatomischen und funktionalen Veränderungen bei DCM-Patienten zu diagnostizieren eignet sich die Echokardiographie. Hier kann eine Umformung des linken Ventrikels von ellipsoid zu kugelförmig bei gleichzeitiger Dilatation beobachtet werden. Im Krankheitsverlauf kann eine Vergrößerung der restlichen drei Herzräume folgen (30). Die systolische Dysfunktion bei der DCM mit verminderter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) kann mit einer abnehmenden Herzmuskelverkürzung (fractional shortening) einhergehen. Hinzu können diastolische Füllungsstörungen mit Klappeninsuffizienzen kommen, die in Folge der Dilatation entstehen, aber auch kardiale Fibrosen und Hypertrophien treten ein (30,31). In der Tabelle 1.2 sind Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien der Diagnose einer DCM aufgeführt (32,33).

Diagnostische Kriterien	LVEF < 45% und/oder FS < 25% LVEDD > 117% (in Abhängigkeit von Alter und KÖF)* LVESD > 55mm
Ausschlusskriterien	Systemisch-arterielle Hypertonie: >160/100 mmHg KHK: >50% Lumeneinengung von Hauptkoronararterien Chronischer Alkoholabusus: ♀ > 40g/d; ♂ > 80g/d Systemerkrankung mit bekannter DCM-Ätiologie Angeborene Herzkrankheit Cor pulmonale, perikardiale Erkrankungen

Tabelle 1.2 Diagnosekriterien der dilatativen Kardiomyopathie

nach Maron et al, Elliot et al und Henry et. al (34-36), **LVEF** – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, **LVEDD** – linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, **LVESD** - linksventrikulärer endsystolischer Diameter, **FS** - fractional shortening (Verkürzung des Herzens während des Pumpvorganges)

*Korrektur für Alter und Körperoberfläche (KÖF) = $(45,3 \times (\text{KÖF})^{1/3} - (0,03 \times \text{Alter}) - 7,2) \pm 12\%$

Die LVEF korreliert häufig mit dem Befinden der Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Ejektionsfraktion unter 25% die Mortalität signifikant zunimmt (37). Für eine schlechte Prognose sprechen eine progredient abnehmende rechtsventrikuläre Funktion sowie eine biventrikuläre Dysfunktion (38,39). Als prognostischer Wert dient unter anderem der LVEDD (40). Die linksventrikulären, diastolischen und systolischen Diameter beschreiben das Ausmaß der Ventrikeldilatation im myokardialen Kontraktionszyklus und können somit zur Einschätzung des Schweregrades der dilatativen Kardiomyopathie herangezogen werden. McNamara et al. zeigten, dass bei akuter Kardiomyopathie ein initial niedriger LVEDD, weniger Dilatation des linken Ventrikels und somit ein besseres Outcome hinsichtlich der linksventrikulären Pumpfunktion nach 6 Monaten bewirkt (41).

Nr.	Klinisches Szenario	Empfehlungs- grad (I, IIa, IIb, III)	Evidenz- grad (A, B, C)
1.	neu aufgetretene Herzinsuffizienz von < 2 Wochen, assoziiert mit normal dimensioniertem oder dilatiertem LV und hämodynamischer Beeinträchtigung	I	B
2.	neu aufgetretene Herzinsuffizienz von 2 Wochen bis 3 Monate, assoziiert mit dilatiertem LV und neuen ventrikulären Arrhythmien, AV-Block II° oder III° oder kein konservatives Therapieansprechen in 1-2 Wochen	I	B
3.	Herzinsuffizienz > 3 Monate, assoziiert mit dilatiertem LV und neuen ventrikulären Arrhythmien, AV-Block II° oder III° oder kein konservatives Therapieansprechen in 1 bis 2 Wochen	IIa	C
4.	Herzinsuffizienz, assoziiert mit DCM unabhängig der Dauer, assoziiert mit mutmaßlicher allergischer Reaktion und/oder Eosinophilie	IIa	C
9.	neu aufgetretene Herzinsuffizienz von 2 Wochen bis 3 Monate, assoziiert mit dilatiertem LV ohne neue ventrikulären Arrhythmien, AV-Block II° oder III° mit Ansprechen auf konservative Therapie in 1-2 Wochen	IIb	B
10.	Herzinsuffizienz > 3 Monate, assoziiert mit dilatiertem LV ohne neue ventrikuläre Arrhythmien, AV-Block II° oder III° mit Ansprechen auf konservative Therapie in 1-2 Wochen	IIb	C

Tabelle 1.3 Empfehlungen zur Entnahme von endomyokardialen Biopsien (EMB) in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes

Auszug, nach Cooper et al. 2007 (42)

Empfehlungsgrade:

Klasse I: Evidenzbasierend und allgemeine Übereinstimmung, dass die Therapie förderlich, nützlich und effektiv ist, **Klasse II:** Widersprüchliche Evidenzlage und/oder Meinungsverschiedenheit der Experten bzgl. Nutzen und Effektivität der Therapie oder einer Intervention, **Klasse IIa:** Evidenzlage und allgemeine Übereinstimmung tendiert eher zu Nützlichkeit und Effektivität der Therapie/Intervention, **Klasse IIb:** Nützlichkeit und Effektivität sind nur wenig evidenzbasierend, **Klasse III:** Evidenzbasierend und allgemeine Übereinstimmung der Experten, dass die Therapie nicht förderlich, nützlich oder effektiv ist und in einigen Fällen sogar schädlich.

Evidenzgrade:

Level A (hoch): durch multiple, randomisierte klinische Studien belegt, **Level B (mittel):** limitierte Anzahl von randomisierten Studien und nicht-randomisierten Studien, **Level C (niedrig):** primär durch Expertenmeinung

Eine interdisziplinäre Arbeitsgruppe der AHA, des American College of Cardiology sowie der ESC veröffentlichten 2007 eine Empfehlung zur Entnahme von Endomyokardbiopsien (EMB) im Rahmen der Diagnostik von Kardiomyopathien. Diese definiert insgesamt 14 klinische Szenarien, bei denen die EMB eine prognostische, diagnostische und therapeutische Bedeutung hat (43).

Bei der Entscheidung zur endomyokardialen Biopsieentnahme bei neu aufgetretener oder bestehender Herzinsuffizienz mit dilatiertem linken Ventrikel oder bereits diagnostizierter DCM gelten die oben genannten Empfehlungen und Evidenzgrade. Frühe Biopsiestudien zeigten eine höhere Inzidenz für eine lymphozytäre Myokarditis bei Patienten mit kurz andauernder, akuten Herzinsuffizienz (< 1 Monat), als bei Patienten mit über Monate bis Jahre andauernden Symptomen (44).

Es wurde nachgewiesen, dass eine Mehrproduktion und –sekretion natriuretischer Peptide wie ANP, BNP (B-Typ-natriuretisches Peptid oder brain natriuretic peptide) und NT-proBNP (N-terminales Fragment des prohormonellen BNPs) aus dem atrialen und ventrikulären Myokard herzinsuffizienter Patienten erfolgt. Die Ausschüttung wird durch eine Zunahme der Wandspannung bei erhöhter Druck- und/oder Volumenbelastung des Herzens gefördert (45). Ein BNP-Plasmaspiegel von >100 pg/ml gilt bei akuter Dyspnoe hinreichend als Marker für eine kardiale Ursache (46). Ishikawa et al. zeigten, dass die Überlebensrate von DCM-Patienten mit einem BNP-Spiegel unter 110 pg/ml signifikant höher ist (47). Auch Troponin wird als diagnostischer Parameter bei der DCM genutzt. Nellessen et al. beurteilten Troponin I als prognostischen Indikator bei Patienten mit Herzinsuffizienz (48). Erhöhte längerfristige Troponin T-Werte gelten als Maß für die Myozytendegeneration bei der DCM und in Kombination mit erhöhten BNP-Konzentrationen wurden vermehrt kardiale Ereignisse beschrieben (49,50).

Die funktionelle Belastbarkeit bei Herzinsuffizienzpatienten kann mit Hilfe der Spiroergometrie untersucht werden, die eine Kombinationsuntersuchung aus Ergometrie und Lungenfunktionsanalyse darstellt. Es kann eine Aussage über die funktionelle Kapazität, die Graduierung des Schweregrades funktioneller Beeinträchtigungen, eine Objektivierung von Interventionsauswirkungen und eine Überwachung der Krankheitsprognose getroffen werden (51). Durch standardisierte Belastungsprotokolle lässt sich die Belastungsintensität steuern, wobei die Sauerstoffaufnahme (VO_2 in ml/min/kg und in % des Normwertes) und die Kohlenstoffdioxidabgabe (VCO_2) zwei Kerngrößen der Untersuchung darstellen und Hinweise zur körperlichen Fitness geben (52-54). Bei körperlicher Belastung (Muskelarbeit) führt der steigende Sauerstoffbedarf zu einer Elimination des vermehrt anfallenden Kohlenstoffdioxides über eine verstärkte Ventilation. Die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) gilt im Rahmen der Spiroergometrie als Prognosemarker bei chronischer Herzinsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass eine VO_{2max} kleiner 21 ml/min/kg bei Patienten mit KHK

oder Herzinsuffizienz sowie auch bei Gesunden mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (55). Mittels der Weber-Klassifikation kann das Herzinsuffizienzstadium durch die Spiroergometrie eingeteilt werden (Tabelle 1.4) (56). Typisch für Herzinsuffizienzpatienten ist eine relative Hyperventilation unter Belastung, wobei jedoch durch eine eingeschränkte maximale Belastbarkeit auch die maximale Ventilation reduziert ist. Aufgrund dessen resultiert eine hohe Atemreserve mit Erhöhung des funktionellen Totraumvolumens (57).

Klasse	Schweregrad	VO_{2max} (ml/min/kg)	VT (ml/min)	CI_{max} (l/min/m ²)
A	Leicht bis keine	> 20	> 14	> 8
B	Leicht bis moderat	16-20	11-14	6-8
C	Moderat bis schwer	10-16	8-11	4-6
D	Schwer	6-10	5-8	2-4
E	Sehr schwer	< 6	< 4	< 2

Tabelle 1.4 Weber-Klassifikation der Herzinsuffizienz anhand der Spiroergometrie

nach Weber et al. (58), VO_{2max} (ml/min/kg) = maximale Sauerstoffaufnahme während einer Belastung, VT (ml/min) = ventilatorische Schwelle bei Belastung, Übergang vom aeroben zum gemischt aerob-anaeroben Energiestoffwechsel, CI (l/min/m²) = Herzindex (cardiac index)

1.2.3 Kalziumhomöostase am gesunden und insuffizienten Herzen

Es wurde gezeigt, dass bei Herzinsuffizienz eine verminderte Aktivität der Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) sowie ein insuffizienter Kalziumübertritt durch eine Dysfunktion der Ryanodinrezeptoren (RyR) zu einer Kontraktionsstörung beitragen können (59). Ventrikuläre Myozyten zeigen bei Herzinsuffizienz eine erhöhte Aktivität des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers (NCX) zur Entfernung des intrazellulären Kalziums, was zu einer insuffizienten Anreicherung von Kalzium im sarkoplasmatischen Retikulum führt (60,61).

Bei beta-adrenerger Stimulation kommt es am Myozyten G-Protein-vermittelt zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), woraufhin die Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (62) und zwei Phosphatmoleküle katalysiert wird. Die Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen bei Kardiomyozyten ist von der cAMP-getriggerten Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) abhängig (63). Nach Aktivierung der Proteinkinase bewirkt diese eine Phosphorylierung der Kalziumkanäle vom L-Typ. Dadurch kommt es zu einem erhöh-

ten Kalziumeinstrom in die Zelle (Ca^{2+} -Transient) sowie eine erhöhte Kalziumfreigabe aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (64,65). Diese wird über die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Adenosintriphosphatase (SERCA) durch die Phosphorylierung von Phospholamban (PL) reguliert, dadurch setzt eine diastolische Relaxation ein (66). Der kontraktionshemmende Einfluss der SERCA wird über die PKA und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2 (PP2) durch Phosphorylierung aufgehoben. Es kommt infolgedessen zu einer Ca^{2+} -Affinitätssteigerung der SERCA und somit zur vermehrten Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) (67). Während des nächsten Kontraktionszyklus wird Kalzium durch Ryanodinrezeptoren des SR freigegeben und kann so an regulatorische Proteine der kontraktilen Filamente binden. In der Systole kann somit durch den vermehrten Ca^{2+} -Gehalt im SR vermehrt Kalzium freigesetzt werden, was eine positive Inotropie bewirkt. Der Troponin-Komplex als ein regulatorisches Protein beinhaltet das Ca^{2+} -bindende Troponin (TnC), Troponin T (TnT) und den Troponin-Inhibitor (TnI). TnI wird auch durch Phosphorylierung der PKA aktiviert und führt zu einer verminderten Ca^{2+} -Sensitivität des Troponin C, wodurch eine Relaxationsbeschleunigung einsetzt (68).

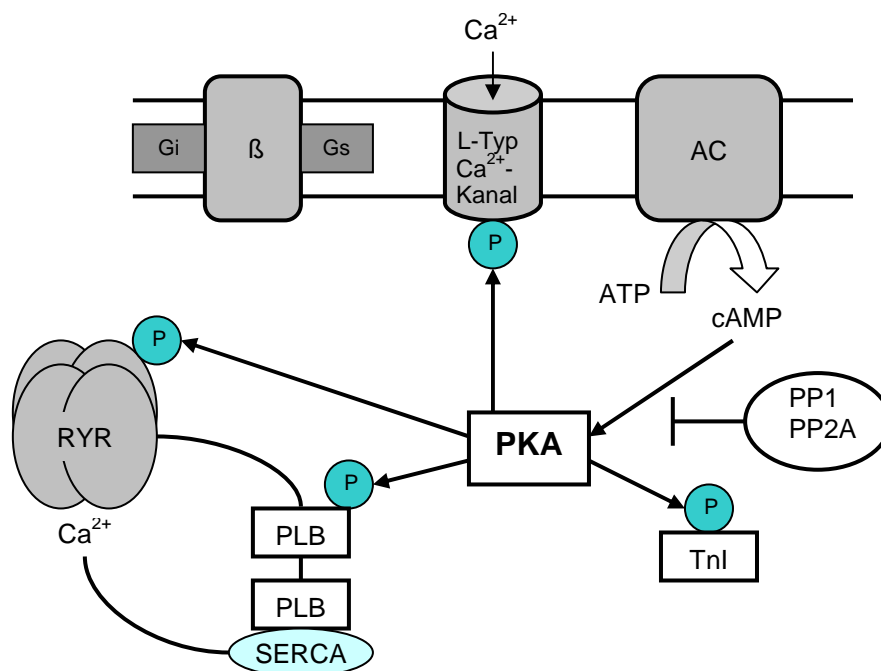


Abbildung 1.1 Vereinfachtes Schema der Kalziumhomöostase im gesunden Kardiomyozyten

nach (69), **AC** – Adenylatcyclase, **β** – beta-Adrenorezeptor, **Gi** – inhibitorisches G-Protein, **Gs** – stimulierendes G-Protein, **P** – Phosphat, **ATP** – Adenosintriphosphat, **cAMP** – zyklisches Adenosinmonophosphat, **PKA** – Proteinkinase A, **PLB** – Phospholamban, **RyR** – Ryanodinrezeptor, **SERCA** – Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, **PP1** – Proteinphosphatase Typ 1, **PP2A** – Proteinphosphatase Typ 2

In Kardiomyozyten des insuffizienten oder hypertrophierten Herzens kommt es zu einer gesteigerten Expression mit nachfolgend vermehrter Aktivität von Proteinphosphatasen (z. B. PP1 und PP2A), welche die beschriebenen Proteinphosphorylierungen hemmen oder antagonisieren. Dadurch kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung von TnI und Phospholamban, was insgesamt zu einer Abnahme des Kalziumgehaltes im SR sowie des Kalziumtransienten führt und somit negativ inotrop wirkt (70). Die Abbildung 1.1 stellt die Kalziumhomöostase am gesunden Kardiomyozyten schematisch dar (71).

Bei der Regulation der myokardialen Kontraktilität spielt die reversible Phosphorylierung eine bedeutende Rolle. Im gesunden Herzmuskel besteht ein Gleichgewicht zwischen phosphorylierender Proteinkinase und dephosphorylierender Proteinphosphatase (PP). Kirchhefer et al. konnten zeigen, dass transgene Tiere mit einer Überexpression des herzmuskelspezifischen Inhibitors der Proteinphosphatase 1 (I2PP1) eine gesteigerte linksventrikuläre Funktion entwickeln (72). Ebenfalls wurde in der gleichen Arbeitsgruppe beobachtet, dass die Hemmung der Proteinphosphataseaktivität durch Überexpression des I2PP1 zu einer Aufhebung der Herzhypertrophie im Tiermodell führt (73). Eine Hemmung der kardialen Proteinphosphatasen könnte demnach eine Therapiemöglichkeit der Herzinsuffizienz darstellen.

1.2.4 Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie beinhaltet eine hohe Variabilität an ursächlichen Einflüssen. Für die Entstehung dieses Krankheitsbildes werden genetische Faktoren, toxisch-myokardiale Schädigungen, infektiöse und autoimmunvermittelte, sowie auch idiopathische Ursachen vermutet (74,75). Des Weiteren kann eine sekundäre Dilatation der Herzkammern durch spezifische kardiale oder systemische Erkrankungen entstehen (sekundäre Kardiomyopathie). Diese können zum Beispiel eine Minderperfusion des Myokards (ischämisch), eine Hypertension, eine Inflammation (Myokarditis) oder eine metabolische Störung darstellen (76). Oft ist die DCM eine Ausschlussdiagnose, wenn eine koronare Herzkrankheit, eine Hypertension, ein Klappenfehler oder ein chronischer Alkoholabusus nicht ursächlich in Betracht gezogen werden können.

1.2.4.1 Genetisch-familiär begründete Erkrankungsfälle

Mehrere systematische Studien haben zeigen können, dass 20 bis 35 % aller DCM-Fälle genetisch bedingt sind und familiär gehäuft auftreten (77-79). Bei dem Versuch die familiäre Form (FDC) von anderen Typen der DCM klinisch zu unterscheiden, konnte festgestellt werden, dass bei der FDC die Patienten bei Krankheitsmanifestation signifikant jünger sind und durchschnittlich eine zunächst höhere LVEF aufweisen als andere DCM-Patienten (80). Von den erkrankten Angehörigen weisen 29 % zunächst asymptomatische Herzveränderungen auf (81).

Die meisten Genmutationen kommen in den Bereichen des Sarkomers, des Zytoskeletts oder in Ionenkanälen vor und führen zum Krankheitsbild der DCM (82). In 56 % der Fälle handelt es sich um autosomal-dominante (AD) Erbgänge (83). Die Tabelle 1.5 zeigt eine Übersicht der wichtigsten aktuell bekannten Mutationsloci bei der DCM (84,85). Olson et al. beschrieben 1998 erstmals ein mutiertes kardiales α -Actin Gen bei DCM-Patienten (86). Am häufigsten wurden Mutationen im β -Myosin-Gen detektiert, wobei Betroffene anscheinend oft erst in der 5. Lebensdekade Symptome entwickeln (87). DCM-Patienten, bei denen eine Troponin T-Mutation beschrieben wurde, zeigten jedoch schon eine vergleichsweise frühe Manifestation (88).

Ein charakteristisches Merkmal für die DCM ist die unausgeglichene Kalziumhomöostase, die durch veränderte intrazelluläre systolische und diastolische Kalziumanreicherungen in den Myozyten auffällt und möglicherweise durch Defizite im sarkoplasmatischen Kalziumaustausch verursacht wird (89). Phospholamban ist ein physiologischer Inhibitor der ATP-abhängigen Kalziumpumpe, die Kalzium aus dem Zytosol zurück ins sarkoplasmatische Retikulum befördert. Phospholamban stellt somit ein Kalzium-regulierendes Protein und einen primären Mediator des beta-adrenergen Effektes dar (90). Haghghi et al. (91) zeigten, dass es bei Mutationen im Phospholamban-Gen zu einer vermehrten Inhibierung der Kalzium-ATPase, nachfolgend zu einer gehemmten Kalzium-Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum und somit zu einer kardialen Kontraktilitätsverminderung kommt.

Protein		Funktion
Sarkomerproteine	α -Actin	Muskelkontraktion
	β -Myosin-Schwerkette	Muskelkontraktion
	Troponin T	Muskelkontraktion
	Troponin I	Muskelkontraktion
	α -Tropomyosin	Muskelkontraktion
	Z-Scheibe	α -Actinin 2
Zytoskelett	Dystrophin	Kraftübertragung
	δ -Sarkoglykan	Transduktion kontraktile Kräfte
Intermediärfilamente	Laminin A/C	Genexpression
	Desmin	Transduktion kontraktile Kräfte
Kalziumhaushalt	Phospholamban	Regulation der Kalziumhomöostase
Modifizierte Gene	β -Adrenorezeptor	positive Chrono- und Inotropie

Tabelle 1.5 Auswahl mutierter Genloci und deren Funktion bei der familiären DCM

Weiterhin scheinen verschiedene Genpolymorphismen von einzelnen β -Adrenorezeptorsubtypen die Myokardfunktion beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass die β -adrenerge Signaltransduktion bei DCM-Patienten alteriert ist. Dies hat neben Gründen wie die Rezeptordownregulation im Zuge erhöhter Katecholaminfreisetzung oder agonistischer Autoantikörper anscheinend auch genetische Ursachen (92). Forleo et al. fanden bei rund 190 Patienten aus Süditalien eine signifikante Assoziation zwischen jeweils einem mutierten Allel der β -1-, β -2-Rezeptoren und der DCM (93). Podlowski et al. konnten im Jahr 2000 elf verschiedene, durch Mutationen entstandene β -1-Rezeptorvarianten beschreiben und stellten fest, dass diese signifikant häufiger bei DCM-Patienten zu finden waren (94).

1.2.4.2 Einfluss viraler Infektionen und die Entwicklung von Autoimmunität

Es konnte gezeigt werden, dass einige Fälle dilatativer Kardiomyopathie mit einer kardialen Virusinfektion assoziiert sind (95-99). Es wird angenommen, das Endbild einer DCM resultiere aus einem phasenhaften Verlauf, in dem eine primäre Virusinfektion, gefolgt von einer autoimmunen Reaktion letztlich zu einer myokardialen Schädigung und Dilatation führt (100,101). Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken wie PCR und in-situ-Hybridisierung ermöglichten es, verschiedene Virusgenome im Myokard von Myokarditis- und DCM-Patienten zu identifizieren.

Frühe Studien diskutierten vor allem eine Beteiligung von Enteroviren, wobei speziell Coxsackie-B-Viren vorherrschend in Endomyokardbiopsien nachgewiesen wurden (102,103). Es konnte nachgewiesen werden, dass Coxsackie- und Adenoviren einen gemeinsamen Rezeptor nutzen (coxsackie-adenovirus-receptor, CAR), der bei adulten Kardiomyozyten physiologisch nicht exprimiert, jedoch bei DCM und chronischer Myokarditis auf dem Kardiomyozytensarkolemm induziert wird (104-106). Außerdem wurde ein Co-Rezeptor (CD₅₅) nachgewiesen (107,108). Beide Rezeptoren konnten eine Coxsackie-B3-Virus-Infektion (CVB3) bewirken, welche durch einen direkten zytopathischen oder immunmodulatorischen Effekt zu Apoptose führten (109,110). Li et al. beschrieben eine Hochregulation von CD₅₅ in 84 % der untersuchten DCM-Patienten (111). Es wurde gezeigt, dass eine Induktion von CD₅₅ bei 63 % der untersuchten DCM-Patienten erfolgte, nicht aber bei anderen, an Kardiomyopathien Erkrankten (112). Neuere Untersuchungen lassen dem Parvovirus B19 und Humanen Herpesvirus Typ 6 (HHV6) eine hohe Bedeutung bei der viralen Genese der DCM zu kommen. In 30 bis 67 % der untersuchten endomyokardialen Biopsien von DCM-Patienten, konnte ein PVB19-Nachweis mittels PCR erfolgen (113,114). Kühl et al. zeigten, dass die Viruspersistenz bei Patienten, die eine linksventrikuläre Dysfunktion aufwiesen, mit einer progressiven LVEF-Verminderung assoziiert ist (115). Diese Funktionsverschlechterung scheint auf der myokardialen Schädigung zu basieren, welche als eine Komponente der Immunantwort auf die Virusinfektion zu verstehen ist (116).

Es wird angenommen, dass diese postvirale Autoimmunität auf einem molekularen Mimikry beruht. Molekulares Mimikry beschreibt das Verbergen von körperfremden Oberflächenstrukturen (-molekülen) vor der Immunabwehr des Organismus durch Ausbildung von ähnlichen Aminosäurestrukturen oder Antigenen (117). Durch ähnliche Epitope von pathogenen Viren und kardialen Antigenen kommt es hierbei zu einer anhaltenden Auto-T-Zell-Aktivierung (118). Die durch Th2-Zellen produzierten Zytokine unterstützen B-Lymphozyten, welche im aktivierten Zustand nun nicht nur gegen virale, sondern auch gegen Myokardantigene kreuzreagierende Antikörper produzieren. Maisch et al. konnten nachweisen, dass eine Kreuzreaktion zwischen Coxsackievirus B3/B4 und Epitopen des kardialen Sarkolemms besteht und dies zu lytischen Zellprozessen führt (119). Es konnte weiterhin ein Antikörper identifiziert werden, welcher mit dem Bakterium *Streptococcus pyogenes*, dem Coxsackievirus-B3 und kardialem Myosin kreuzreagierte (120).

Es wird angenommen, dass Th1-Zytokine wie TNF α , IL-1 und IFN- γ einen zytotoxischen Effekt auf Kardiomyozyten haben und zusätzlich zytotoxische T-Zellen aktivieren, was zu einer direkten Myokardschädigung und zur Induktion von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) führt, die eine Inflammation des Gewebes forcieren (121-123). In einem Maus-Modell von Rose und Hill wurde gezeigt, dass die Mehrproduktion an Zytokinen und zytotoxischen CD8-positiven T-Lymphozyten postviral zu einer Myozytolyse und somit zu einer eingeschränkten Kontraktilität führen (124). In mehreren klinischen Studien wurden exzessiv erhöhte Plasmawerte des Zytokins beobachtet (125,126). Ebenso wurde eine gesteigerte Expression des TNF α -Rezeptors bei DCM-Patienten beschrieben (127). An isolierten Rattenherzen wurde gezeigt, dass Interleukin-1 die kardiale Kontraktilität hemmt (128). In fortgeschrittenen Stadien der DCM findet sich eine vermehrte Expression von MHC-Klasse I und II, sowie VCAM-1-Molekülen, was auf eine anhaltende Inflammation hindeutet (129).

1.2.4.3 Die Bedeutung von Autoantikörpern

In den letzten Jahren wurden verschiedene unterschiedliche Autoantikörper gegen intra- und extrazelluläre Myokardbestandteile entdeckt. Es wurde festgestellt, dass bestimmte Autoantikörper die physiologische Aktivität der Kardiomyozyten, sowie als Mediatoren das Immunsystem beeinflussen können. In Tabelle 1.6 sind einige der bekannten Autoantikörper gegen kardiale Strukturen aufgezeigt.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnten Carforio et al. in 30-40% der untersuchten DCM-Patienten und deren asymptomatischen Verwandten organspezifische Autoantikörper der IgG-Klasse detektieren (130,131). Es gibt Hinweise, dass die Prävalenz von Autoantikörpern bei DCM-Patienten im Verlauf trotz Symptomprogredienz sinkt (132).

Einer der am besten untersuchten autoimmunologischen Mechanismen betrifft das kardiale Myosin und den kardiotropen Myosin-Autoantikörper (133). Li et al. beobachteten DCM-ähnliche Veränderungen und Apoptose an normalen Rattenherzen nach der Injektion von aufgereinigtem IgG Myosin-immunisierter Tiere (134). Nishimura et al. konnten zeigen, dass BALB/c Mäuse, welche eine Defizienz des immunmodulatorischen Programmed-Death-1-Rezeptor aufwiesen, Antikörper gegen sarkomale Proteine und das klinische Bild einer dilatativen Kardiomyopathie ausbildeten (135). Später konnte identifiziert werden, dass diese Antikörper gegen kardiales

Troponin I (cTnI) gerichtet sind (136). Staudt et al. zeigten an Rattenkardiomyozyten, dass Antikörper von DCM-Patienten in-vitro die Kontraktilität und Relaxation des Rattenherzmuskels beeinträchtigen (137). Es wird davon ausgegangen, dass unter anderem cTnI-Autoantikörper die elektrophysiologische Kontraktionsfunktion von Kardiomyozyten beeinflussen, da in-vitro-Experimente an BALB/c-Mäusen einen erhöhten Kalziumeinstrom in Zusammenhang mit diesem Antikörper demonstrierten (138).

Autoantikörper gegen		Referenz
Zytoskelettproteine	Myosin	Caforio et al., 1992 (139)
	Actin	Neumann et al., 1990 (140)
	Troponin I	Shmilovich et al, 2007 (141)
	Tropomyosin	Latif et al., 1993 (142)
	Na-K-ATPase	Baba et al., 2002 (143)
Mitochondriale Proteine	ATP-ADP-Carrier	Schulze et al., 1990 (144)
	NADH-DHG	Pohlner et al., 1997 (145)
	Pyruvat-DHG	Pohlner et al., 1997 (146)
Membranproteine/-rezeptoren	β-1-Adrenorezeptor	Jahns et al., 1999 (147)
	muskarin. Rezeptor	Fu et al., 1996 (148)
	Troponin I	Shmilovich et al, 2007 (149)
	Kalziumkanal	Kuhl et al., 1991 (150)
Hitze-Schock-Proteine	Hsp 60, 70	Portig et al., 1997 (151)

Tabelle 1.6 Autoantikörper bei DCM

Na-K-ATPase – Natrium-Kalium-Adenosintri-phosphatase, **ATP-ADP-Carrier** – Adenosintri-phosphat-Adenosindiphosphat-Transporter, **NADH-DHG** – Nicotinamid-adenindinukleotid-Dehydrogenase, **Pyruvat-DHG** – Pyruvat-Dehydrogenase, **Hsp** - Hitzeschockprotein

Die Prävalenz von Autoantikörpern gegen den G-Protein-gekoppelten β-1-adrenergen Rezeptor bei DCM-Patienten wird auf 33-95 % geschätzt (152-154). Wal-lukat und Wollenberger zeigten, dass IgG-Frak-tionen von DCM-Erkrankten positiv chronotrope Effekte auf isolierte, neonatale Rattenkardiomyozyten ausübten (155) und zeigten später die Bindung der Antikörper an der ersten oder zweiten extrazellulären Schleife des β-1-Rezeptors (156). Staudt et al. beobachteten eine erhöhte Apoptoserate bei Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit β1-Adrenorezeptor-Antikörpern und zeigten, dass diese Wirkung Proteinkinase-A-abhängig ist, da bei gleichzeitiger Vorinkubation mit einem Proteinkinase-A-Inhibitor keine vermehrte Apoptose herbeigeführt werden konnte (157).

Fu et al. beschrieben Antikörper gegen den muskarinergen M2-Acetylcholinrezeptor

in 36-38 % der untersuchten DCM-Patienten (158,159). Diese binden an ein Epitop der zweiten extrazellulären Schleife des G-Protein-Rezeptors und haben einen agonistischen Effekt, welcher sich negativ chronotrop auf neonatale Rattenmyozyten auswirkte. In einem weiteren Tiermodell an Meerschweinchen, konnten Zhao et al. die Hemmung des Kalziumeinstroms und Steigerung des Kaliumaustrittes der Zellen durch diesen Antikörper nachweisen (160).

Durch Schultheiss et al. wurde an Rattenmyozyten die Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen den ATP-ADP-Carrier und dem Kalziumkanalkomplex beschrieben, die zu einem massiven transmembranalen Kalziumeinstrom in die Zellen und zu kalziumabhängigen Zellysen führt (161,162). Eine chronische Kalziumüberlastung induziert nachweislich eine mechanische Insuffizienz des Herzens und Myozytenapoptose (163,164).

In Studien von Staudt et al. konnte gezeigt werden, dass Antikörper der IgG-Subklasse von DCM-Patienten einen negativ-inotropen Effekt auf Kardiomyozyten ausüben, indem sie an deren Fc γ -Rezeptoren binden. Diese kardiodepressiven Antikörper bewirkten an isolierten ventrikulären Rattenkardiomyozyten einen verminderten Kalziumtransienten und eine verringerte Kontraktilität (165,166). Die gleiche Arbeitsgruppe identifizierte insbesondere Antikörper der IgG3-Subklasse mit der höchsten Komplementaktivierung und zytotoxischer Potenz (167). Bei einer Analyse der Antikörperklassen konnten Warraich et al. eine überdurchschnittlich hohe Anzahl von IgG3-Antikörpern gegen kardiale α - und β -Myosin-Schwerkettenproteine finden (168).

1.3 Therapieformen der dilatativen Kardiomyopathie

1.3.1 Konventionelle Therapieformen

Neben der Immunadsorption als alternative Form der Behandlung von Patienten mit DCM werden auch medikamentöse Herzinsuffizienztherapien fortgeführt. Die medikamentöse Therapie der DCM beinhaltet sowohl kausale und symptomatische Ansätze. Größtenteils orientiert sich diese an den allgemeinen Leitlinien zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz (169). Neben der Therapie mit Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmern, welche nachweislich Mortalität und Herzinsuffizienzsymptome senken (CONSENSUS- und SOLVD-Studie (170)), gelten vor allem Beta-

blocker als zielführend. Die Therapie mit Carvedilol, einem nicht-selektiven Betablocker mit zusätzlich α -blockierender Wirkung, führte zu einer signifikanten Abnahme von Sterberate und Hospitalisierung von Herzinsuffizienzpatienten um 35 % im Vergleich zur Placebogruppe (COPERNICUS) (171). Daraufhin wird angenommen, dass eine β -1-Blockade die durch Autoantikörper induzierte Stimulation der Kardiomyozyten neutralisieren kann (172,173).

Zudem wird im Stadium NYHA III-IV auch eine niedrig dosierte Aldosteronantagonistentherapie (Spironolakton) genutzt. Die positiven Effekte von Spironolakton wurden erstmals in der RALES-Studie 1999 belegt. Dabei wurde die Sterblichkeitsrate innerhalb von 36 Monaten um 30 % gesenkt und zudem zeigte sich die Hospitalisierungsrate regredient (174). Zusätzlich ergab die EMPHASIS-Studie 2010 auch einen prognoseverbessernden Einfluss von Aldosteronantagonisten bei leichter Herzinsuffizienz (NYHA II) (175). Die Anwendung von ACE-Hemmern (und Angiotensin-II-Rezeptor-Blockern) in Kombination mit Spironolakton kann jedoch, bei Nichtbeachtung der Kontraindikationen und Limitierungen (Niereninsuffizienz, Hyperkaliämie, Maximaldosis), zu schwerwiegenden bis tödlichen Hyperkaliämien führen (176,177).

In einer retrospektiven Studie zeigte sich, dass Patienten mit nachgewiesenen kardiotropen Autoantikörpern aber ohne Virusgenom im Myokard signifikant besser auf eine Immunsuppression ansprachen und Verbesserungen im klinischen und hämodynamischen Bereich entwickelten (178). Nachdem die Assoziation zwischen chronischer Herzinsuffizienz und persistierender Aktivierung der Entzündungszellen erkannt wurde, untersuchten Skudicky et al. den Effekt von einem Xanthin (Pentoxifyllin) bei DCM-Patienten, welches die Produktion von TNF- α hemmt und Apoptose vermindert. Es zeigte sich, dass die LVEF nach 6 Monaten signifikant stieg und die TNF- α -Spiegel reduziert wurden, gleichzeitig wurden alle Patienten auch mit konventionellen Herzinsuffizienzmedikamenten behandelt (179). Ähnliche Resultate zeigten Deswal et al., die 18 DCM-Erkrankte mit Etanercept, einem spezifischen TNF- α -Antagonisten, behandelten (180). Allerdings zeigte die RENEWAL (Randomised Etanercept Worldwide evALuation)-Studie (welche die nordamerikanische RENAISSANCE-Studie und die europäische RECOVER-Studie zusammenfasste) keine Verbesserung der Morbiditäts- und Mortalitätsraten. Im Gegensatz zeigte sich sogar der Trend einer erhöhten Sterberate in beiden Studien, weshalb die Studie vorzeitig beendet wurde. Patienten unter 65 Jahren sowie mit nicht-ischämischer Herzkrankheit zeigten ein verschlechtertes Outcome (181).

1.3.2 Die Bedeutung der Immunadsorptionstherapie

Um den Einfluss von Autoantikörpern zu untersuchen, wird ein Adsorptionsverfahren zur Entfernung dieser kardiotropen Antikörper aus dem Blut an DCM erkrankter Patienten eingesetzt. Dies konnte mittels Immunadsorption (IA) erreicht werden. Das Prinzip dieser Therapie beinhaltet die unspezifische Aphaese von Immunglobulinen und somit auch pathogener Autoantikörper mittels Plasmaseparation über spezielle Adsorptionssäulen. Hauptsächlich werden hierzu Säulen genutzt, welche Schafs-Anti-IgG-Antikörper, Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan) oder Protein A vom Bakterium *Staphylokokkus aureus* auf Sepharose enthalten, wobei bei letzterem nur Subklassen-unspezifisch Antikörper entfernt werden können. Diese Therapieform konnte bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Guillain-Barré-Syndrom, Myasthenia gravis und systemischem Lupus erythematodes angewendet werden (182). Neben der Antikörperelimination werden bei der IA zudem auch immunmodulatorische Einflüsse beobachtet (183).

1.3.2.1 Einfluss der Immunadsorption auf das humorale und zelluläre Immunsystem bei der dilatativen Kardiomyopathie

Während der IA bindet im Falle vom Staphylokokkenprotein A humanes IgG über das Fc-Fragment der Subklassen IgG1, 2 und 4. Die Subklassen IgG3, IgM, IgE und IgA werden an Protein A über den Fab-Teil gebunden. Hierbei fanden Kessler et al. heraus, dass IgG, welches an Immunkomplexe gebunden ist, eine ungefähr 300fach stärkere Bindung an Protein A aufweist als freie Antikörper (184).

Wallukat et al. behandelten erstmals 1996 DCM-Patienten mit der IA-Therapie. Nachdem der Antikörpertiter sank, verbesserten sich Herzfunktion und Herzinsuffizienzsymptome der Patienten (185). In einer Pilotstudie von Dörffel et al. wurden die akuten hämodynamischen Verbesserungen durch die IA an 9 β 1-Autoantikörperpositiven Patienten (LVEF < 25 %, NYHA III-IV, Herzindex < 2,5 l/min/m²) belegt und die IA als alternative therapeutische Möglichkeit für eine hämodynamische Verbesserung etabliert (186).

Da durch die IA, an drei aufeinander folgenden Tagen, geschätzte 70% des Gesamt-IgGs unspezifisch entfernt werden können, konnten jedoch die genauen Auswirkungen einzelner Autoantikörper nicht beschrieben werden (187) . Die Gabe von intra-

venösem Immunglobulin (IVIg) (188) nach IA wird zum Ausgleich dieses gravierenden Immunglobulinverlustes vorgenommen. Zudem konnte gezeigt werden, dass IVIg B-Lymphozyten direkt beeinflusst, ihre Aktivität reduziert und Antikörper neutralisiert. Indem die zugeführten IgG-Moleküle an den Fc-Rezeptor der B-Zellen binden, hemmen sie auch indirekt die Produktion neuer Autoantikörper (189). Letztendlich moduliert IgG auch die zelluläre Immunität und den Zytokinmetabolismus (190).

Felix et al. konnten in einer kontrollierten follow-up-Studie eine stabile Verbesserung der hämodynamischen Parameter 3 Monate nach IA belegen (191). Hierbei wurden der Herzindex (CI) sowie der Schlagvolumenindex (SVI) gesteigert und der systemische vaskuläre Widerstand (SVR) signifikant reduziert. Müller et al. beobachteten bei Patienten mit DCM eine echokardiographisch sichtbare Abnahme des enddiastolischen und endsystolischen Diameters und einen relativen Anstieg der LVEF um 69,9% ein Jahr nach IA (192). Staudt et al. zeigten, dass eine einmalige IA-Therapie über 5 Tage den gleichen positiven, klinischen Langzeiteffekt (follow-up nach 6 Monaten) erzeugt wie monatliche IA-Sitzungen (193). Knebel et al. konnten in einer retrospektiven Analyse eine signifikante Abnahme der Hospitalisierungen und Sterblichkeit bis zu einem Zeitraum von 2,5 Jahren nach IA bei Patienten mit DCM nachweisen (194).

Die Bedeutung der β -1-Rezeptor-Antikörper in der DCM konnte durch die Verbesserung der Herzfunktion nach der Entfernung der Antikörper bei Tieren und Menschen belegt werden (195,196). Jedoch erkannten Staudt et al., dass die hämodynamischen Verbesserungen nach IA nicht allein auf die spezifische Entfernung des β 1-Autoantikörpers zurückzuführen sind. Vielmehr profitierten Antikörper-negative DCM-Patienten in gleicher Form von der Therapie und zeigten ähnliche Anstiege der LVEF (197). Durch die IA werden zusätzlich zirkulierende Immunkomplexe entfernt, in ihrer Struktur modifiziert und somit in ihrer Pathogenität verändert (198). Braun et al. konnten bei IA-Therapien beim systemischen Lupus erythematoses zeigen, dass C3- und C1q-gebundene zirkulierende Immunkomplexe entfernt werden (199). Bei Antigen- oder Antikörperüberschuss bilden sich lösliche, zirkulierende Immunkomplexe, welche jeweils aus einem Antigen und einem komplementären Antikörper bestehen. Steigt die Menge an Immunkomplexen über die Phagozytoseleistung an, so können sich diese Komplexe an Gefäßwänden und Organen ablagern und dort das Komplementsystem aktivieren (200). Es gibt Hinweise, dass die IA nicht nur stabilisierenden Einfluss auf die Hämodynamik hat, sondern auch die myokardiale Inflammation mo-

duliert. Nach einem IA-Zyklus und anschließender IgG-Substitution beobachteten Staudt et al. einen signifikanten Abfall von Lymphozyten und CD45-positiven Zellen im Myokard sowie einen Rückgang der HLA-Klasse II-Antigenexpression (201). Es wurde beschrieben, dass nach der Immunadsorption mit Protein A an Patienten mit Lupus erythematoses die Antikörperentfernung zunächst zu einer intermittierenden Monozytenaktivierung führt, welche jedoch im weiteren Verlauf regredient ist (202).

2 Fragestellung

Die Fragestellung der vorliegenden Dissertation beinhaltet Untersuchungen des Effektes kardiotoxischer Autoantikörper von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie an Rattenkardiomyozyten vor und nach Immunadsorption in einem Beobachtungszeitraum von einem Jahr.

Folgende Fragen sollten in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Werden klinische Verbesserungen bei Patienten mit DCM über ein Jahr nach Immunadsorption beobachtet?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen kardialer Dysfunktion und pathogenetischer Relevanz von negativ inotrop wirkenden Autoantikörpern?
3. Inwiefern wird eine Abnahme des negativ-inotropen Effektes nach Immunadsorption experimentell an Rattenkardiomyozyten beobachtet? Werden wiederkehrende, negativ-inotrope Autoantikörpereffekte nach einem Jahr beobachtet? Kann/muss die Immunadsorption wiederholt werden? Wenn ja, wann?
4. Welche Patientenkollektive profitieren am ehesten von der Immunadsorption?

3 Materialien und Methoden

Um den Erfolg der Immunadsorptionstherapie (IA) zur Behandlung der dilatativen Kardiomyopathie zu verifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit in-vitro-Testungen des Effektes kardiotoxischer Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten an 18 DCM-Patienten durchgeführt. Es wurde jeweils vor Beginn der IA, am 5. Tag der Therapie, sowie 3, 6 und 12 Monate nach IA den Patienten Plasma entnommen und die aufbereiteten IgG-Fractionen mit isolierten Rattenkardiomyozyten inkubiert. Die zu jedem Messzeitpunkt aufgenommenen Werte hinsichtlich Kontraktilitätsverhalten und Kalziumtransient der Zellen, wurden mit den Ergebnissen vor der Therapie verglichen.

3.1 Studienkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit umfasste insgesamt 18 DCM-Erkrankte aus der Klinik für Innere Medizin B der Universität Greifswald mit folgenden Kriterien (angelehnt an die Kriterien von Maron et al. bezüglich dilatativer Kardiomyopathie sowie diagnostischer Richtlinien der Herzinsuffizienz (203,204)).

- Linksventrikuläre Dysfunktion (LVEF < 45 %), erhöhter LVEDD (> 56 mm), NYHA II-IV nach (205)
- Ausschluss von kardialen Grunderkrankungen wie koronare Herzerkrankungen, hochgradigen Klappenvitien, postpartaler Kardiomyopathie, angeborenen Herzerkrankungen, Cor pulmonale
- Ausschluss von aktiven Infektionskrankheiten, maligne Zweiterkrankungen, chronischem Alkoholabusus, Speichererkrankungen
- Ausschluss von kardiogenem Schock

Vor der IA waren alle Patienten auf eine stabile medikamentöse Herzinsuffizienztherapie nach aktuellen Leitlinien für mehr als 3 Monate eingestellt (206). Die Immunadsorptionstherapie wurde von allen Patienten gut toleriert. Es traten keine mit der Aphaese in Verbindung zu bringenden Komplikationen im Beobachtungszeitraum

auf. Alle Patienten wurden über die Therapie schriftlich aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis über die Verwendung ihres Blutes und ihrer Daten. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Universität Greifswald lag vor.

Das Patientenserum der DCM-Patienten wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Untersuchung der Antikörpereigenschaften nach 3, 6 und 12 Monaten wurden die Proben miniadsorbiert und anschließend dialysiert. Folgend wurde der IgG-Gehalt der Proben bestimmt und die Proben bis zu einer Konzentration von $0,33\text{ mg}/1000\mu\text{l}$ IgG mit Versuchspuffer verdünnt.

3.2 Erhebung der klinischen Parameter

Vor der Immunadsorptionstherapie, am 5.Tag nach IA, sowie 3, 6 und 12 Monate nach IA wurden die echokardiographischen Parameter der Patienten erhoben. Um die linksventrikuläre Funktion und kardiale Konfiguration zu beurteilen, wurde sich hierbei auf die Auswurfraction (LVEF) nach Simpson und die linksventrikulären Durchmesser (LVEDD, LVESD) bezogen, welche mittels transthorakaler Echokardiografie (Vivid 5; GE Healthcare, UK) bestimmt wurden. Hierbei wurden jeweils Bilder im B- und M-Mode aus apikaler und parasternaler Perspektive angefertigt. Die Parameter wurden entsprechend aktueller Leitlinien aus je 3 gemittelten Messungen von erfahrenen, verblindeten Untersuchern berechnet (207).

Zur Feststellung der kardiopulmonalen Belastbarkeit wurden die Patienten einer Spiroergometrie unterzogen, wobei eine Belastung bis zum subjektiven Leistungsmaximum erreicht werden sollte. Die Belastung wurde alle 2 Minuten um 20 Watt bis zum Abbruch gesteigert und dabei maximale Herzfrequenz, maximale Sauerstoffaufnahme, die maximal erreichte Leistung sowie eine EKG-Dokumentation erfasst.

3.3 Erhebung der bioptischen Parameter

Die Endomyokardbiopsien der Patienten wurden vor dem Beginn der IA aus dem interventrikulären Septum des rechten Ventrikels entnommen und histologisch am Universitätsklinikum Tübingen untersucht. Hierbei wurden Inflammationsstatus (Leukozyteninfiltration) und Virusbefall an Paraffinschnitten nach der Dalles-Klassifikation beurteilt (208). Es galten eine Infiltration von >14 Leukozyten/ mm^2 (CD3^+ Lymphozy-

ten und/oder CD68⁺ Makrophagen) als Inflammationskriterium (209,210). Zusätzlich wurde die vermehrte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen in Antigen-präsentierenden Immunzellen begutachtet. Mittels PCR wurden die Biopsieproben auf eine Virusinfektion untersucht. Dabei wurde sich auf die Detektion von Enteroviren (Coxsackie A und B), Epstein-Barr-Viren, Adenoviren, humane Herpesviren (HHV6) und Parvovirus B19 beschränkt.

3.4 Immunadsorptionstherapie

Um Autoantikörper aus dem Blut von DCM-Patienten zu gewinnen, wurde ein modifiziertes Immunadsorptionsverfahren angewendet (211).

Dieses extrakorporale Therapieverfahren wurde einmalig an 5 aufeinander folgenden Tagen bei den zu untersuchenden DCM-Patienten angewendet, wobei ein optimiertes Adsorptionsschema zur Entfernung der IgG-Subklasse 3 angewendet wurde (212). Hierbei wurde eine Verbindung über einen zentralvenösen Zugang zum extrakorporalen Apharesesystem hergestellt. Folgend wurde entnommenes Blut über eine Staphylokokken-Protein A-Säule (Immunosorba[®], Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg) geleitet. Darauf folgte die sofortige Rückführung des Blutes in den Organismus. Nach dem letzten Tag wurde den Patienten 0,5g/kg/KG polyklonales IgG (Venimmun N[®], Centeon Pharma, Österreich bzw. Sandoglobulin[®], CSL Behring, Marburg) infundiert, um das IgG-Plasmalevel auszugleichen und Infektionen vorzubeugen.

3.5 Versuchstiere

Für die beschriebenen Versuche wurden ventrikuläre Kardiomyozyten von adulten weiblichen Wistar-Ratten (180-200g) (Stamm HsdHan[™], Harlan Borchon) genutzt, welche mittels einer Langendorff-Apparatur aus dem Zellverband isoliert wurden.

3.6 Isolation der Rattenkardiomyozyten

3.6.1 Vorbereitungen

Die Langendorff-Apparatur wurde über Nacht mit 70%igem Alkohol gefüllt. Vor Beginn der Isolation wurde die Anlage entleert und mit zwei Liter destilliertem Wasser und anschließend mit 50-70 ml Isolationspuffer gespült. Dann wurde die Apparatur mit 75 ml Isolationspuffer gefüllt und eine halbe Stunde bei 37°C mit Carbogen (5% CO₂ und 95% O₂) begast. Der pH-Wert wurde auf 7,4-7,7 eingestellt. Währenddessen wurden 4-Kammer-Deckgläser (Nunc, Roskilde, Dänemark) für die Zellfixierung und -färbung vorbereitet. Jede Kammer wurde dabei mit 10 µg/ml Laminin (Sigma-Aldrich, Seelze) beschichtet und anschließend eine Stunde im Kühlschrank gelagert.

Puffer	Inhalt	Hersteller
Versuchspuffer (pH=7,3)	117 mM NaCl	Roth, Karlsruhe, Germany
	2,8 mM KCl	Merck, Darmstadt, Germany
	0,6 mM MgCl ₂	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany
	1,2 mM KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Germany
	1,2 mM CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Germany
	20 mM Glucose	Merck, Darmstadt, Germany
	10 mM Hepes (Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure)	Merck, Darmstadt, Germany
Hepes- Isolationspuffer (pH=7,4)	110 mM NaCl	Roth, Karlsruhe, Germany
	2,6 mM KCl	Merck, Darmstadt, Germany
	1,2 mM MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck, Darmstadt, Germany
	1,2 mM KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Germany
	25 mM Hepes* 11 mM Glucose	Merck, Darmstadt, Germany
Enzymlösung	20 mg Kollagenase	Worthington, Freehold, USA
	17 mg BSA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
	20 ml Hepes-Isolationspuffer	Merck, Darmstadt, Germany
	22,5 µl 100 mM CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Germany

Tabelle 3.1 Pufferlösungen und Enzymlösungen

3.6.2 Organentnahme und Präparation

Für jede Versuchsreihe wurden Ratten mit je 375µg/kg KG Trapanal (Altana, Konstanz) mit einer Injektion in den Unterbauch intraperitoneal anästhesiert. Vor der Organpräparation wurde die Reflexlosigkeit getestet. Es wurde nun das Herz durch einen medianen Schnitt entlang des Sternums vom Zwerchfell aus präpariert und in eine Petrischale mit 4°C temperierter Natriumchloridlösung (0,9%ig) überführt. In der Kochsalzlösung durften sich keine Eiskristalle befinden, da dies zu einer mechanischen Verletzung des Herzens hätte führen können. Es folgte die Freipräparation des Herzens. Perikard, Ösophagus, Trachea und Thymus wurden entnommen und die Aorta frei gelegt. Das fertig präparierte Rattenherz wurde mit der Aorta an die Kanüle der luftleeren Langendorffapparatur gehängt, indem der Konus vor den Koronarien positioniert wurde, um so eine gleichmäßige Perfusion zu gewährleisten.

3.6.3 Enzymperfusion und Isolation

Im folgenden Schritt wurde das Herz 3 Minuten mit modifiziertem Krebs-Henseleit-(HEPES)-Isolationspuffer perfundiert. Dann wurden für die Zellisolation 20 ml einer Enzymlösung (Kollagenase Typ II, Worthington, USA, 33µM CaCl₂) hinzugefügt und alles 25 Minuten rezirkulierend mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen/Sekunde perfundiert. Hierbei herrschte in der gesamten Anlage ein konstanter Druck von 65 mmHg, eine fortwährende Carbonbegasung (95% Co₂/5% O₂) und eine Temperatur von 37°C, welche durch ein Heizsystem im Bereich des oberen Reservoirs gewährleistet wurde. Eine integrierte Blasenfalle in der Wendel verhinderte Luftembolien während der Perfusion (Abb. 3.1, modifiziert nach Powell und Piper (213,214)). Bei einer erfolgreichen enzymatischen Lösung zeigte sich eine homogene helle Verfärbung des gesamten Herzens. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde das Herz abgenommen und in 1 x 1 mm große Stücke zerteilt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur die Ventrikelanteile des Herzens für die weitere Zellisolation genutzt wurden. Es folgte eine 10-minütige Zirkulation der zerkleinerten Ventrikelstücken unter Carbonbegasung im unteren Auffangtrichter der Anlage. Durch die mechanischen Verwirbelungen lösten sich nun die Kardiomyozyten endgültig aus ihrem Zellverband. Dies wurde deutlich, indem eine zunehmende Trübung des Puffers einsetzte. An-

schließlich wurde die Zelllösung durch ein Nylonnetz (200 µm Porengröße) in 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert, um Gewebereste zurück zuhalten. Es folgte eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 43G. Danach wurde der Überstand verworfen und das unten abgesetzte Zellpellet zunächst mit 200 µmol und danach mit 500 µmol CaCl_2 -Isolierpuffer suspendiert. Dies geschah als Kalziumgleich an den im weiteren Verlauf genutzten Versuchspuffer.

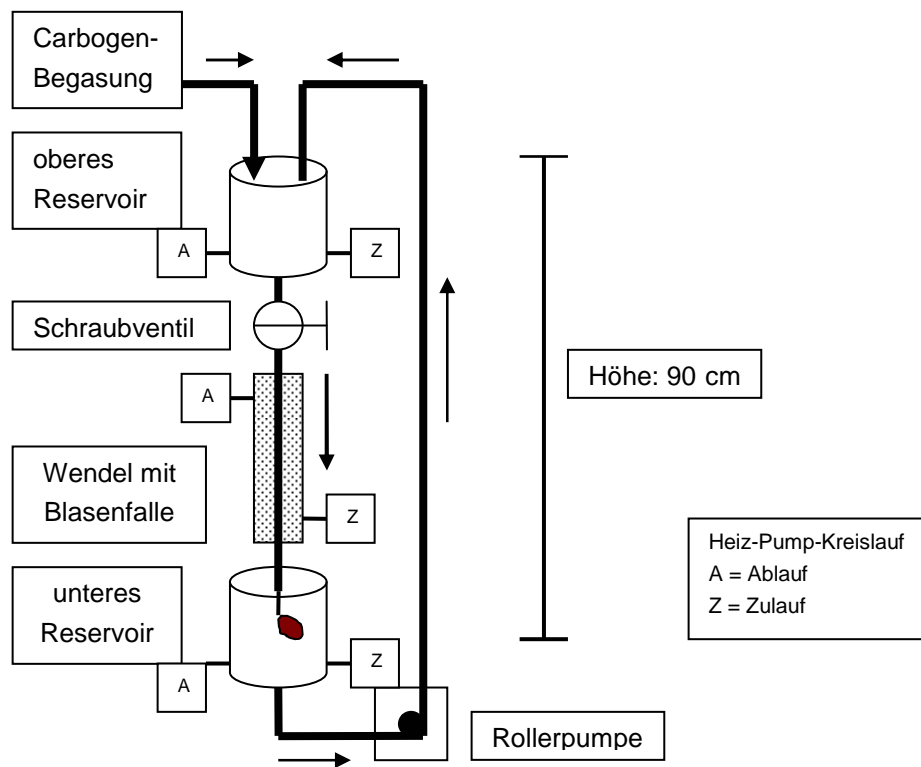


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau der Langendorff-Apparatur

CaCl_2 -Isolierpuffer: 200 µmol: 10 ml Isolationspuffer, 20 µl 100mM CaCl_2

500 µmol: 10 ml Isolationspuffer, 50 µl 100mM CaCl_2

3.6.4 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte nach der Zentrifugation in Fuchs-Rosenthal-Kammern unter dem Mikroskop mit einer 10fachen Vergrößerung. Hierbei wurden alle intakten Zellen mit typischer myokardialer Querstreifung in einer länglichen, viereckigen Form („rod-shaped“) gezählt. Nicht-intakte Zellen, welche sich als rundlich-granulierte Zellhaufen ohne Querstreifung darstellen, wurden außer Acht gelassen. Durchschnittlich sollten

sich etwa zwei bis drei Millionen mit einem Anteil von 70-80 % an gesunden Kardiomyozyten pro Zellisolation gewinnen lassen, um von einer erfolgreichen Isolation ausgehen zu können. Je nach Zellzahl wurde dann das Gemisch mit 10-40 ml Versuchspuffer verdünnt und für eine Stunde bei 4°C gelagert.

3.6.5 Zellfärbung und Zelladhäsion

Die vorbereiteten, mit Laminin beschichteten 4-Kammer-Deckgläser wurden mit 500 µl des Zell-Puffer-Gemisches befüllt (entspricht ca. $3\text{-}5 \times 10^4$ Zellen) und in lichtundurchlässigen Behältern mit feuchtem Papier eine Stunde im Kühlschrank gelagert (feuchte Kammer). In dieser Zeit hefteten sich die Kardiomyozyten an den Lamininbeschichteten Deckplattenboden.

Zum Anfärben der Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM benutzt. Bei diesem Farbstoff handelte es sich um einen Acetonmethylester, der durch seine lipophile Struktur zellgängig ist und dort intrazelluläres Kalzium bindet. Durch zelluläre Esterasen aus dem Zytosol wurde der Farbstoff in-vivo dann in zwei nicht-membrangängige lipophobe Liganden (Fura-2) gespalten, welche nun nicht mehr zellgängig waren und somit nach Anregung Fluoreszenz erzeugten. Die Lagerung erfolgte kalt und lichtgeschützt. Der Farbstoff wurde im Verhältnis 1:1000 mit Versuchspuffer verdünnt.

Die Deckplatten wurden nach der Inkubationszeit dem Kühlschrank entnommen und der Versuchspuffer wurde vorsichtig aus den Kammern entfernt. Folgend wurden pro Kammer 500 µl Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, gefolgt von 10minütiger Inkubation auf dem Schwenker. Anschließend wurde der Farbstoff entfernt, je 500 µl Versuchspuffer in jede Kammer gegeben und diese vorsichtig geschwenkt. Dann wurde der überstehende Versuchspuffer entfernt und durch 500 µl pro Kammer ersetzt. Die Deckplatten waren nun bereit für die Messung.

3.7 Aufarbeitung der Patientenplasmen

Die Aufarbeitung des EDTA-Blutes der DCM-Patienten erfolgte nach Entnahme zum Zeitpunkt vor Immunadsorption und an den jeweiligen Kontrollterminen (nach 3, 6, 12 Monaten) in mehreren laborchemischen Schritten.

Nach einer 10-minütigen Zentrifugation des Blutes bei 3800 Umdrehungen wurde der Überstand in Form von Plasma abpipettiert. Zunächst musste aus dem entnommenen Plasma durch eine Aphaese (Miniadsorption) ein Eluat aus IgG-Molekülen gewonnen werden, welches dann durch eine in-vitro-Dialyse den Elektrolyt- und pH-Bedürfnissen der Rattenkardiomyozyten angepasst wurde.

3.7.1 Miniadsorption (in-vitro-Adsorption)

Bei der Miniadsorption handelte es sich um eine IA aus 6 ml Patientenserum. Nachdem die Sepharose (PlasmaSelect, Teterow) gut durchmischt wurde, wurden 9 ml in eine Adsorptionssäule gegeben. Anschließend wurde die Sepharose mit dem Filter auf 6 ml gepresst. Das überstehende Konservierungsmittel wurde verworfen. Nun wurde die dreifache Menge an NaCl-Lösung auf die Säule gegeben. Nachdem dieses durchlief, wurde die Lösung dann verworfen. Dies diente zum Waschen der Säule von Resten an Konservierungsmittel. Nachdem die Waschung durchgelaufen war, gab man die 6 ml Patientenserum auf den Filter. Nachfolgend wurde das Patienten-IgG an die Sepharose gebunden und alle restlichen Partikel liefen frei durch die Säule. Anschließend wurde die Säule erneut mit 6 ml NaCl gewaschen. Nun wurden 6 ml Glycin-HCl als erste Fraktion auf die Säule gegeben und verworfen. Das Gleiche geschah mit der zweiten Fraktion Glycin-HCl (erneut 6 ml). Der saure pH-Wert des Glycin-HCl von 2,8 führte zu einer Trennung der Bindungen zwischen Schafsantikörper und Patienten-IgG. Die dritte Fraktion wurde gesammelt, da sich hier der Hauptteil des von der Sepharose gelösten IgGs befand.

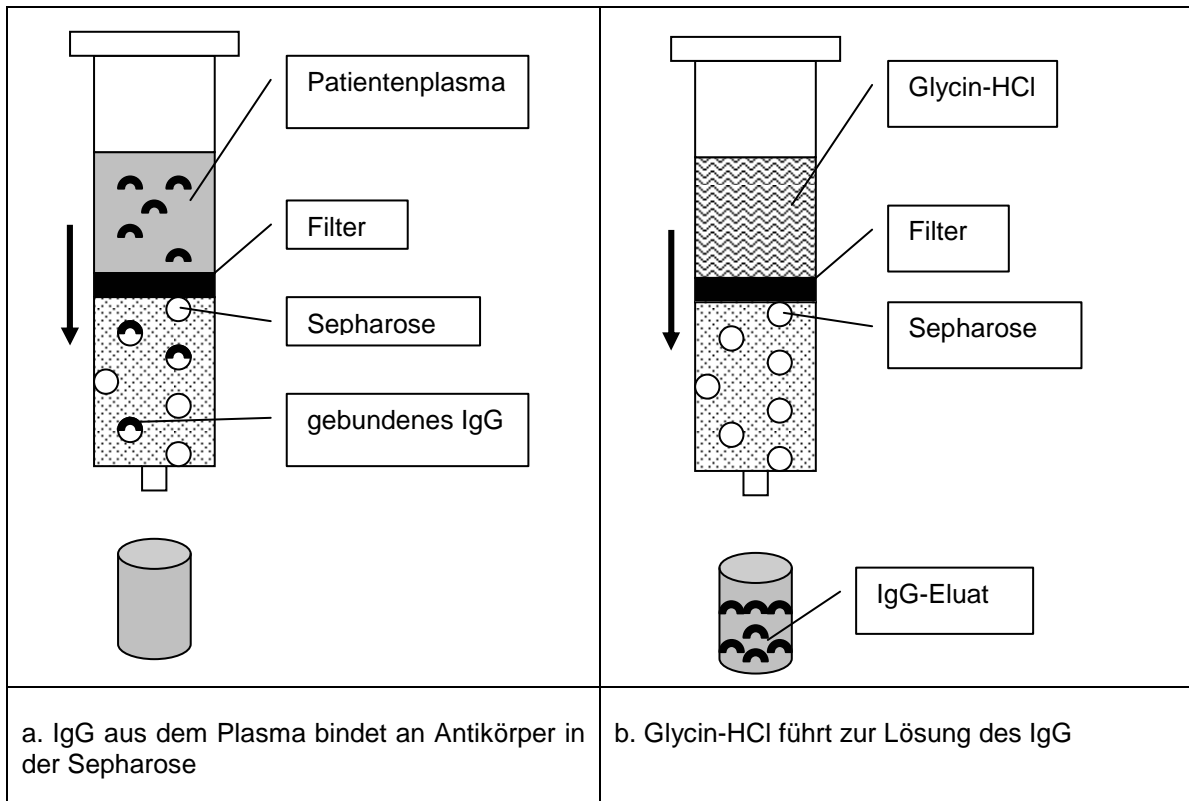


Abbildung 3.2 Verfahren der Miniadsorption zur IgG-Gewinnung aus Patientenplasma

Das IgG-Eluat wurde mittels TRIS-HCl auf einen pH-Wert von 7,2-7,4 eingestellt. Nachdem die letzte Fraktion Glycin-HCl durchgelaufen war, wurde die Säule abermals mit 10 ml Glycin-HCl und anschließend mit 18 ml NaCl gewaschen und stand so für die nächste Adsorption bereit.

3.7.2 Dialyse des In-vitro-Eluats

Die über die Miniadsorption gewonnene IgG-Lösung des Patienten wurde in einem folgenden Schritt in zwei Zyklen dialysiert und den physiologischen Elektrolytbedürfnissen der Kardiomyozyten angepasst. Zunächst wurden drei Liter Versuchspuffer hergestellt und auf je ein-Liter-Gefäße verteilt. Dann wurden drei Abschnitte des Dialyseschlauches (durchlässig bis zu einem Molekulargewicht von 100 000 Dalton) bereitgestellt und an einer Seite mit Einmal-Nabelschnurklemmen zusammengehalten. Nun wurde das IgG-Eluat mit einer Pipette in den Dialyseschlauch gefüllt und anschließend am oberen Ende wiederum mit einer Nabelschnurklemme abgeschlossen. Jetzt wurden die drei Gefäße mit jeweils einem Dialyseschlauch für acht Stunden im Kühlschrank belassen so dass ein Stoff- und Elektrolytaustausch erfolgen

konnte. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Schläuche in je drei-Liter-Gefäße umgesetzt, so dass das Konzentrationsverhältnis geringer wurde (Verhältnis Eluat zu Versuchspuffer ca. 1:1000). Der zweite Dialyseabschnitt dauerte nun 20 Stunden. Anschließend wurden die Proben aus den Schläuchen entnommen und separat 30 Minuten in einem Wasserbad mit 57°C erhitzt. Dies diente zur Komplementinaktivierung.

Letztlich wurden zur IgG-Bestimmung 300 µl des Eluates in das Zentrallabor der Universitätsklinik Greifswald geschickt und nach Erhalt des IgG-Wertes wurden die einzelnen Proben zu einer Konzentration von 0,33 mg IgG/ml mit Versuchspuffer verdünnt. Die Proben standen nun bereit, um am Fluoreszenzmikroskop über die Rattenkardiomyozyten geleitet zu werden.

3.8 Messung der Zellkontraktion und des Kalzium-Transienten

3.8.1 Messvorrichtung

Die Messung der Zellkontraktion und des Kalziumtransienten der adhärenen Kardiomyozyten erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica, DM IRB). Dies war verbunden mit einer Auflicht-Fluoreszenz-Anlage, einer Kamera (Myocam, IonOptix, Milton, MA, USA) und einem Zellstimulator (Myopacer, IonOptix, Milton, MA, USA). Durch die Kamera wurden die unter dem Mikroskop eingestellten Zellen auf einen angeschlossenen Computer übertragen. Der Myopacer wurde über eine Elektrode mit der zu untersuchenden Deckplattenkammer verbunden und stimuliert. Somit kontrahierten die Kardiomyozyten mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Impulsdauer von 5 ms und bei einer Spannung von 12 V. Die Darstellung erfolgte in 40-facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die zytosolische Kalziumkonzentration wurde mittels des Fura-2-AM-Farbstoffes bei UV-Licht beurteilt. Dieser „dual-excitation single-emission“ Farbstoff besteht, wie bereits weiter oben beschrieben, intrazellulär aus einer Ca^{2+} -gebundenen und einer freien Form. Jeweils zwei verschiedene Wellenlängen des eintreffenden UV-Lichtes regten je eine Form des Farbstoffes an (Ca^{2+} -gebundene Form: 360 nm, freien Form: 380 nm). Fura-2-AM emittiert Fluoreszenzlicht in der Wellenlänge von 510 nm. Die Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration wurde dadurch bestimmt, dass die Fluoreszenz jeweils bei 360 nm (F_{360}) und 380 nm (F_{380}) gemessen wurde, wobei der

Quotient der gemessenen Werte dieser beiden Wellenlängen die Kalzium-Ratio (Ratio= F_{360}/F_{380}) der Zelle ergibt. Die fluoreszierenden Lichtstrahlen einer Zellebene wurden durch eine Lochblende aus den restlichen Brennebenen gefiltert.

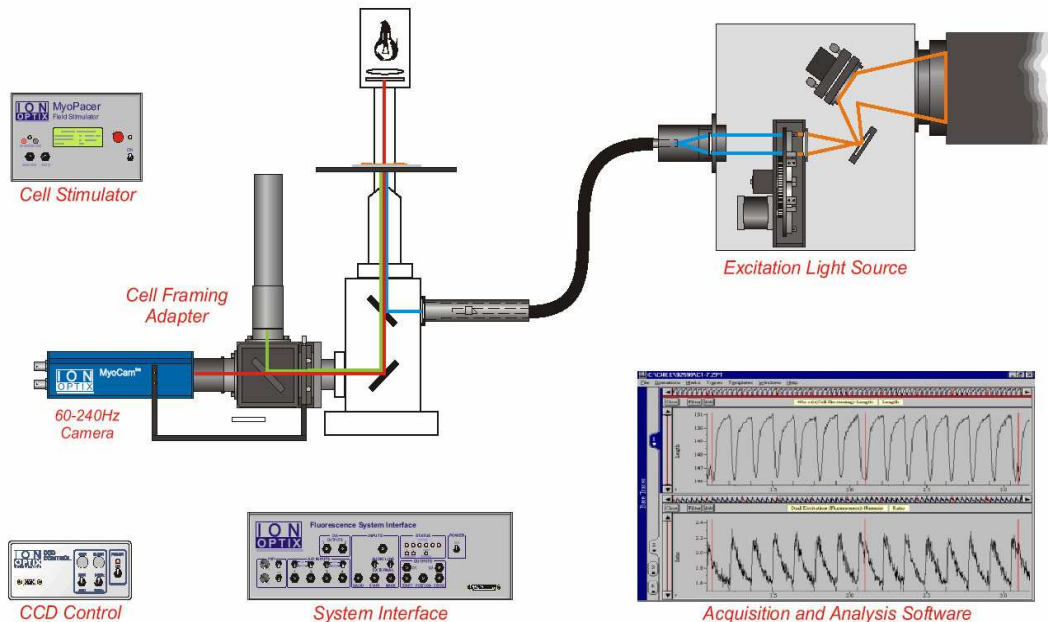


Abbildung 3.3 Ionoptix-Fluoreszenzanlage

aus www.ionoptix.com

3.8.2 Messablauf

Die Deckplatte wurde auf dem Mikroskoptisch mittels Klammern fixiert und die Elektrode des Myopacers in eine Kammer gesetzt. Über diese wurde auch durch ein zu- und ableitendes Schlauchsystem kontinuierlich Versuchspuffer in die Kammer geleitet, um die Elektrolytversorgung der Zellen zu gewährleisten. War der stimulierende Myopacer eingeschaltet und das Pumpsystem aktiviert, sollten die Zellen mit einer Impulsdauer von 5 ms (Frequenz 1 Hz, Spannung 10-12 V) kontrahieren. Daraufhin wurde eine geeignete Zelle mittels des Acquisition-and-Analysis-Programms von IonOptix im Strahlengang des Mikroskopes horizontal eingestellt. Eine Zelle sollte scharf umrandete Zellgrenzen, eine typische Querstreifung und eine rechteckige Form aufweisen. Des Weiteren sollte sie regelmäßig und stark kontrahieren als auch nicht von anderen Zellbeständen überlagert sein. Die Kontraktilität sollte dabei ca. 5-15% der Gesamzelllänge betragen. Die Zellränder wurden mit Markern im Messfeld fixiert. Diese „Soft Edge Detection“ der Software ermöglichte die Aufzeichnung der

Kontraktionsamplitude der Zellen. Die Bilder wurden mit der Kamera mit einer Frequenz von 240 Hz aufgenommen und übertragen.

In Abbildung 3.4 ist eine Zelle unter dem Inversionsmikroskop und der abgeleitete Kontraktionszyklus der Aufzeichnungssoftware dargestellt.

Zunächst wurden 10 Kontraktionen als Baselinemessung aufgezeichnet, um festzustellen ob die Zelle eine stabile Kontraktion und einen gleichmäßigen Kalziumtransienten aufwies. Nun wurde über das Schlauchsystem die Patientenprobe (aufgereinigte IgG-Fractionen) in die Kammer geleitet und danach die Pumpe ausgeschaltet. Anschließend wurde die Akutreaktion der Zelle mit weiteren 10 Kontraktionen aufgezeichnet. Weiterhin erfolgten Messungen auch nach 2 und 5 Minuten. Die Ergebnisse wurden zur späteren Auswertung gespeichert.

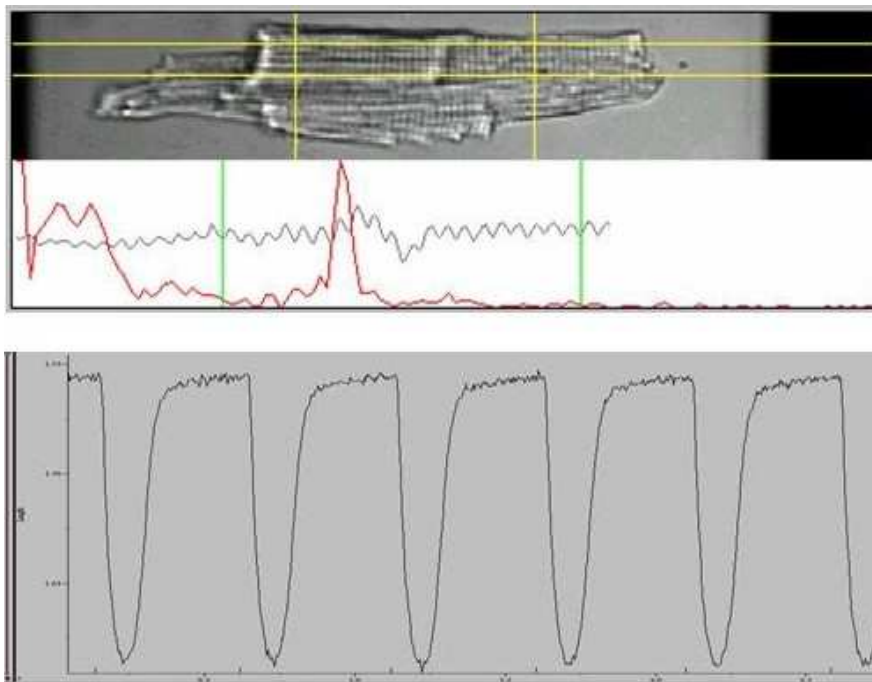


Abbildung 3.4 Kontraktionszyklus am isolierten Rattenkardiomyozyten

oben: lichtmikroskopische Sicht auf einen kontrahierenden Rattenkardiomyozyten, **unten:** Aufzeichnung des Kontraktionszyklus mittels Aquire-Programm (Ionoptix)

3.9 Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit einem Analyse-Programm von IonOptix und Microsoft Excel 2000. Dabei wurde die Zellverkürzung und der Kalziumtransienten ausgewertet. Die Kontraktilität, als Surrogatparameter der Inotropie, ergab die

systolische, prozentuale Veränderung der Zelllänge, gemessen an der Gesamzelllänge in der Diastole. Der Kalziumtransient beschrieb die Veränderung der Kalziumkonzentration im Zytosol der Zellen während Systole und Diastole mit Hilfe der Fura-Fluoreszenz (Ratio). Pro Patientenprobe erfolgten sechs Messungen (Inotropie und Kalziumtransient), wobei der jeweilige Mittelwert von 10 Sekunden Baseline, Akutwert, 2-Minuten-Wert und 5-Minuten-Wert gebildet wurde. Die Werte nach 2 und 5 Minuten wurden gemittelt und als Zusammenfassung jeder Messung notiert. Dabei waren die Differenzen von 2- und 5-Minuten-Wert bezüglich der Baseline für die Bewertung des kardiotropen Effektes des IgG-Eluates ausschlaggebend.

3.10 Statistik und Datenverarbeitung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine experimentelle, retrospektive Interventionsstudie. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit den Softwareprogrammen SigmaStat® 3.5 (Systat Software, CA, USA), Microsoft Excel 2000® (Microsoft Software) und SPSS Statistics® (IBM). Signifikanzniveaus abhängiger Gruppen wurden mit dem gepaarten t-Test (bei Normalverteilung) oder Wilcoxon-Test (bei fehlender Normalverteilung) berechnet. Der Vergleich zweier nicht parametrischer Stichproben mit unbekannter Verteilung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Signifikanzniveaus innerhalb der Subgruppen Geschlecht, Medikamente und Vorerkrankungen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test errechnet. Die lineare Korrelation wurde nach Pearson analysiert und mit dem Programm SigmaPlot® 8.0 (Systat Software, CA, USA) dargestellt. Hierbei bedeutete der Korrelationskoeffizient r bei Signifikanz eine lineare Korrelation. Werte gegen +1 zeigen eine positive, Werte gegen -1 eine negative, lineare Korrelation an. Bei Korrelationen bis 0,5 wird von einer geringen, bei Werten bis 0,2 von einer sehr geringen Korrelation ausgegangen.

Die graphischen Darstellungen und Tabellen geben bei metrischen, stetigen Daten, sofern nicht anders gekennzeichnet, den Mittelwert \pm Standardfehler wieder. Nicht-stetige Daten wurden bei nominalen Werten als absolute Häufigkeiten oder in Prozent angegeben. Signifikante Unterschiede $p < 0,05$ wurden mit (*) gekennzeichnet. Bei der höheren Signifikanz von $p < 0,005$, wurden zwei Sterne (**) verwendet; in der höchsten Signifikanz ($p < 0,001$) wurden drei Sterne (***) genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristik

In der vorliegenden Arbeit wurden 11 Männer und 7 Frauen (n=18) im Alter von $52 \pm 2,3$ Jahren untersucht. Dabei litten diese Patienten zum Zeitpunkt der Beobachtung im Durchschnitt $31,1 \pm 6,4$ Monate an einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Alle Patienten wiesen Symptome einer chronischen Herzinsuffizienz auf, welche anhand der NYHA-Klassifikation eingeteilt wurde (I bis IV) (215). Aus der Tabelle 4.1 sind zusätzlich Komorbiditäten, sowie Medikamenteneinstellungen und echokardiografische Daten des Patientenkollektivs zu entnehmen.

Bioptisch gewonnene Informationen hinsichtlich des Virusnachweises im Herzmuskel ergaben bei insgesamt 13 Patienten (72,2%) vor der Immunadsorption ein positives Testergebnis. Davon konnten in 7 Fällen (38,9%) Parvovirus B-19 und bei 3 Patienten (16,7 %) Humanes Herpesvirus 6 nachgewiesen werden. 2 Patienten wiesen das Epstein-Barr-Virus (11,1%) und einer das Herpes-Simplex-Virus-1 (5,6%) im Myokard auf. Eine Doppelinfektion konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Eine myokardiale Inflammation konnte vor Immunadsorption bei insgesamt 13 Patienten (72,2%) mittels Endomyokardbiopsien nachgewiesen werden, wobei sich von diesen, vier als Borderline-Myokarditiden (bis zu 14 Lymphozyten/mm², keine Myozytolyse) herausstellten. Es galt eine Leukozyteninfiltration von mehr als 14 Zellen/mm² (CD3⁺-Lymphozyten und CD68⁺-Makrophagen) als cut-off (216). In 10 Fällen (55,6%) konnte man sowohl einen positiven Virus- als auch Inflammationsbefund bestätigen. Jeweils drei Patienten wiesen entweder einen Virus oder eine Entzündung auf. Bei zwei Patienten konnte weder eine Entzündung noch eine Viruslast nachgewiesen werden.

Parameter	Mittelwert \pm SEM (n=18)
<i>Alter (Jahre)</i>	52 \pm 2,3
<i>Geschlecht, n (%)</i>	
männlich	11 (61,1)
weiblich	7 (38,9)
<i>Krankheitsdauer (Monate)</i>	31,1 \pm 6,4
<i>BMI (kg/cm²)</i>	26,6 \pm 0,9
<i>NYHA-Stadium, n (%)</i>	
I	3 (16,7)
II	4 (22,2)
III	9 (50)
IV	2 (11,1)
<i>Medikamente, n (%)</i>	
ACE-Hemmer	13 (72,2)
Beta-Blocker	14 (77,8)
Aldosteronantagonist	9 (50)
Diuretika	18 (100)
Digitalis	2 (11,1)
AT-1-Antagonisten	5 (27,8)
<i>Nebenerkrankungen, n (%)</i>	
Arterielle Hypertonie	7 (38,9)
KHK	0
Vorhofflimmern	6 (33,3)
Mitralklappeninsuffizienz	3 (16,7)
Aortenklappenvitium	1 (5,5)
Diabetes mellitus	3 (16,7)
Dyslipoproteinämie	4 (22,2)
<i>Echokardiografie</i>	
LVEF in %	32,9 \pm 1,6
LVEDD in mm	67,8 \pm 1,8
LVESD in mm	54,1 \pm 2,2

Tabelle 4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs vor Immunadsorption

*Darstellung von Mittelwert \pm Standardfehler, n entspricht absoluter Patientenzahl, **DCM** – dilatative Kardiomyopathie, **BMI** in kg/cm² – body mass index, **NYHA** – New York Heart Association (Einteilung der Herzinsuffizienzstadien (217)), **ACE-Hemmer** – Angiotensin-converting-enzyme-Hemmer, **AT-1-Antagonisten** – Angiotensin-1-Antagonisten, **LVEF** in % - linksventrikuläre Ejektionsfraktion, **LVEDD** in mm – left ventricular enddiastolic diameter, **LVESD** in mm – left ventricular end-systolic diameter*

4.2 Messungen von Kontraktilität und Kalziumtransient vor Immunadsorption

Anhand des Einflusses der aufgereinigten IgG-Fraktionen auf die Kontraktilität und den Ca^{2+} -Transienten von Rattenkardiomyozyten, wurden die Patienten in eine negativ-inotrope und eine nicht negativ-inotrope Gruppe unterteilt. Die negativ-inotrope Gruppe beinhaltete 12 Patienten (66,7%), 6 Patienten (33,3%) galten als nicht negativ-inotrop.

Als negativ-inotrope Wirkung wurde die Abnahme der Kontraktilität über -9,2%, beziehungsweise des Ca^{2+} -Transienten über -4,8% fünf Minuten nach Inkubation mit dem IgG-Fraktionen im Vergleich zur Ruhekontraktion definiert. Diese Grenzwerte wurden definiert, indem die Reduktion der Kontraktilität und des Ca^{2+} -Transienten an Rattenmyozyten durch das Plasma von 18 herzgesunden Patienten gemessen wurde (11 männl./7 weibl., $55 \pm 4,6$ Jahre, „age- und gender-matched“). Die IgG-Fraktionen dieser Kontrollpatienten bewirkten keine signifikante Abnahme der Kontraktilität ($-1,85 \pm 3,7\%$) und des Ca^{2+} -Transienten ($-0,57 \pm 2,1\%$) nach 5 Minuten Inkubationszeit. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Grenzwerte der negativen Inotropie/Kalziumtransienten resultieren aus der mittleren Reduktion minus zwei Standardabweichungen dieser Kontrollgruppe.

In der negativ-inotropen Gruppe belief sich vor IA die Kontraktilitätsabnahme der Rattenkardiomyozyten nach 5 Minuten auf $-13,97 \pm 1,2 \%$ und der Verlust des Ca^{2+} -Transienten auf $-7,56 \pm 0,4 \%$. Während dessen konnten bei den IgG-Fraktionen der nicht negativ-inotropen Gruppe vor IA keine kardiodepressiven Effekte beschrieben werden (Inotropie: $-6,96 \pm 1,4 \%$, Ca^{2+} -Transient $-4,67 \pm 0,9 \%$; $p < 0,005$ vs. negativ inotrope Gruppe vor IA) (Abb. 4.1). Wie man aus der Tabelle 4.2 entnehmen kann, unterschieden sich beide Patientenkollektive nicht signifikant hinsichtlich ihrer klinischen Daten.

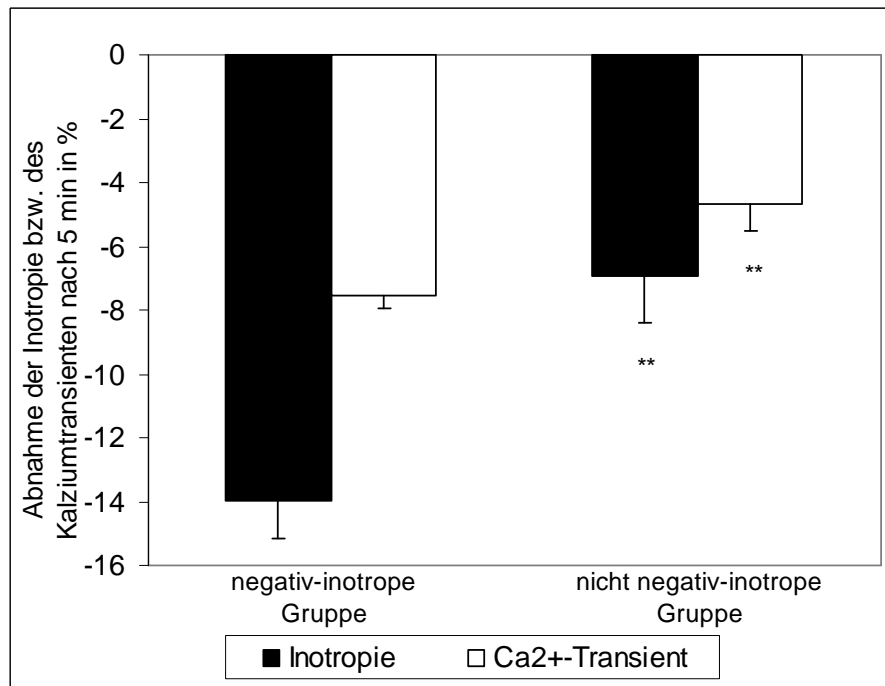


Abbildung 4.1 Inotropie und Ca²⁺-Transient der negativ-inotropen und nicht negativ-inotropen Gruppe vor Immunadsorption

** = $p < 0,005$ vs. negativ inotrope Gruppe

Parameter	Negativ inotrope Gruppe n=12	Nicht-negativ inotrope Gruppe n=6	p-Werte
<i>Alter (Jahre)</i>	54,1 ± 3,4	52,8 ± 2,5	n.s.
<i>Geschlecht, n (%)</i>			
Männlich	6 (50)	5 (83,3)	n.s.
Weiblich	6 (50)	1 (16,7)	n.s.
<i>Krankheitsdauer (Monate)</i>	29,5 ± 8,6	34,3 ± 9,1	n.s.
<i>BMI (kg/cm²)</i>	26,9 ± 1,3	26,0 ± 1,3	n.s.
<i>NYHA, n (%)</i>			
I	2 (16,7)	1 (16,7)	n.s.
II	3 (25)	1 (16,7)	n.s.
III	6 (50)	3 (50)	n.s.
IV	1 (8,3)	1 (16,7)	n.s.
<i>Medikamente, n (%)</i>			
ACE-Hemmer	8 (66,7)	5 (83,3)	n.s.
Beta-Blocker	8 (66,7)	6 (100)	n.s.
CSE-Hemmer	6 (50)	1 (16,6)	n.s.
Diuretika	12 (100)	6 (100)	
AT1-Antagonisten	3 (25)	2 (33,3)	n.s.
<i>Nebenerkrankungen n (%)</i>			
Art. Hypertonie	4 (33,3)	3 (50)	n.s.
Diabetes mellitus	3 (25)	0	n.s.
Dyslipoproteinämie	2 (16,7)	2 (33,3)	n.s.
<i>Echokardiografie</i>			
LVEF in %	33,0 ± 1,7	32,0 ± 3,9	n.s.
LVEDD in mm	67,0 ± 1,7	69,3 ± 4,1	n.s.
LVESD in mm	52,2 ± 1,7	57,3 ± 5,2	n.s.
<i>Virusinfektion, n(%)</i>	9 (75)	4 (66,7)	n.s.
<i>Inflammation, n (%)</i>	10 (83,3)	3 (50)	n.s.

Tabelle 4.2 Klinische Parameter beider Patientengruppen im Vergleich vor IA

Darstellung von Mittelwerten ± Standardfehler, n entspricht absoluter Patientenzahl; n.s.= nicht signifikant, **BMI** in kg/cm² – body mass index, **NYHA** – New York Heart Association (Einteilung der Herzinsuffizienzstadien (218)), **ACE-Hemmer** – Angiotensin-converting-enzyme-Hemmer, **AT-1-Antagonisten** – Angiotensin-1-Antagonisten, **LVEF** in % - linksventrikuläre Ejektionsfraktion, **LVEDD** in mm – left ventricular enddiastolic diameter, **LVESD** in mm – left ventricular endsystolic diameter

4.3 Verlauf nach Immunadsorption

4.3.1 Entwicklung klinischer Parameter nach Immunadsorption

4.3.1.1 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) entspricht dem Schlagvolumen im Verhältnis zum enddiastolischen Volumen des Herzens und wurde jeweils echokardiografisch bestimmt. Der Normwert der LVEF beträgt über 55% (DGK-Leitlinien, (219)). In Abbildung 4.2 ist dargestellt, dass sich die negativ-inotrope ($33,0 \pm 1,72$ %) hinsichtlich der LVEF zum Zeitpunkt vor IA nicht wesentlich von der nicht negativ-inotropen ($32,7 \pm 3,7$ %) Patientengruppe unterschied. Direkt nach Beendigung des Immunadsorptionszyklus (Tag 5) konnte in beiden Patientenkollektiven ein Anstieg der linksventrikulären Funktion beobachtet werden. Die negativ-inotrope Gruppe erreichte eine durchschnittliche Verbesserung der LVEF auf $37,9 \pm 2,9$ % ($p < 0,05$ vs. vor IA). Der LVEF-Anstieg der nicht negativ-inotropen Patienten belief sich auf nicht signifikante $34,0 \pm 3,1$ % am Tag 5 nach IA im Vergleich zum Zeitpunkt vor IA.

In der negativ-inotropen Gruppe konnten nach 3 Monaten eine weitere signifikante Steigerung der LVEF auf $43,0 \pm 3,0$ % ($p < 0,005$ vs. vor IA) feststellen. Nach 6 Monaten zeigte sich die LVEF stabil ($42,0 \pm 3,0$ %; $p < 0,005$ vs. vor IA). Nachfolgend konnte ein Jahr nach IA ein hoch signifikanter Anstieg der Auswurffraktion auf $50,0 \pm 2,9$ % ($p < 0,001$ vs. vor IA) verzeichnet werden. Dies stellt eine relative Verbesserung von 53 % im Vergleich zum Ausgangswert vor Immunadsorption dar.

In der nicht negativ-inotropen Gruppe konnten keine signifikanten Veränderungen der LVEF im Verlauf beobachtet werden (nach 3 Monaten: $32,0 \pm 3,3$ %, nach 6 Monaten: $36,0 \pm 2,8$ %, nach 12 Monaten: $34,8 \pm 4,0$ %).

Die Unterschiede in der LVEF zwischen den beiden Gruppen sind jeweils zum Zeitpunkt 3 und 12 Monate nach IA signifikant ($p < 0,05$). Ein Jahr nach IA lässt sich somit feststellen, dass die negativ-inotrope Gruppe hinsichtlich der linksventrikulären Ejektionsfraktion einen ca. 15%ig höheren absoluten LVEF-Wert als die Vergleichsgruppe aufweist (50% versus 34,8 %).

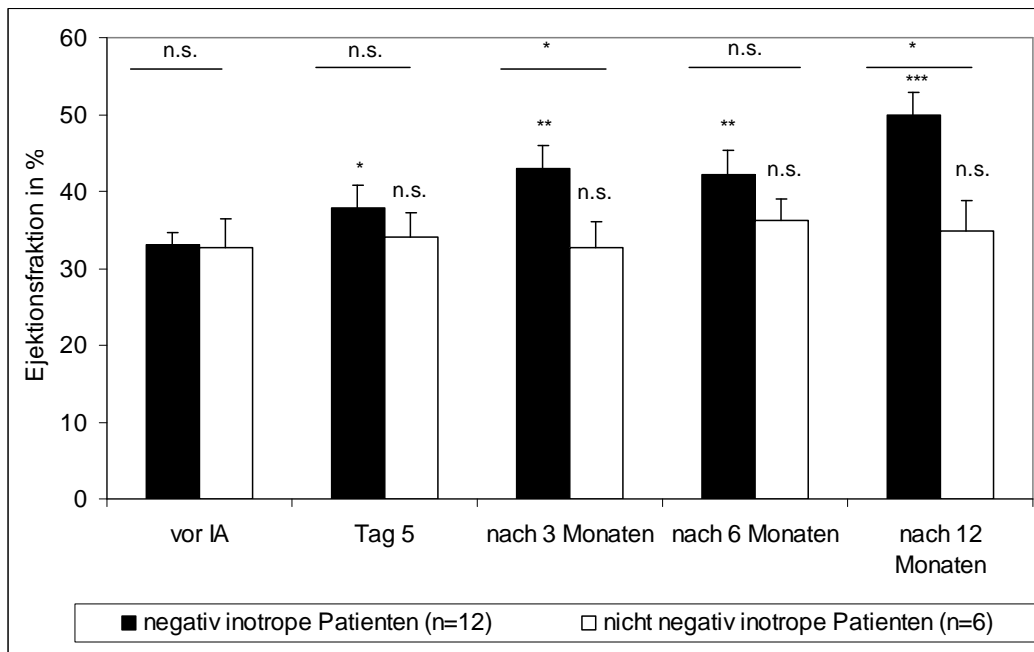


Abbildung 4.2 Entwicklung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) vor und nach Immunadsorption in der negativ-inotropen und nicht negativ-inotropen Gruppe

Signifikanz einzelner Subgruppen (negativ inotrop und nicht-negativ inotrop) versus. vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.3.1.2 Linksventrikuläre Diameter

Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) gilt als Maß der Dilatation der linken Herzkammer. Der Normwert liegt bei 37 bis 56 mm. Ein leichtgradig dilatierter Ventrikel weist Werte von 56-62 mm auf. Bei 62-70 mm spricht man von einem mittelgradig, bei > 70 mm von einem hochgradig dilatierten linken Ventrikel. Der Normwert für den endsystolischen (LVESD) Durchmesser liegt bei 27 bis 37 mm (220).

Die Untersuchungen nach einem Jahr ergaben eine nicht signifikante Abnahme des LVEDD von 3,2 mm in der negativ-inotropen Gruppe (vor IA: $67,0 \pm 1,7$ mm; nach 12 Monaten: $63,8 \pm 2,7$ mm) und von 1,2 mm in der nicht negativ-inotropen Gruppe (vor IA: $69,3 \pm 4,1$ mm; nach 12 Monaten: $68,2 \pm 3,3$ mm). In der Abnahme des LVESD war ein signifikanter Rückgang um 5,1 mm von $52,2 \pm 1,7$ mm auf $47,1 \pm 2,8$ mm ($p < 0,05$ vs. vor IA) zu messen. In der nicht negativ-inotropen Gruppe hingegen war nach einem Jahr annähernd der endsystolische Ausgangsdurchmesser mit $57,5 \pm 3,9$ mm (vgl. vor IA: $57,3 \pm 5,1$ mm) erreicht (nicht signifikant) (Abb. 4.3 und 4.4).

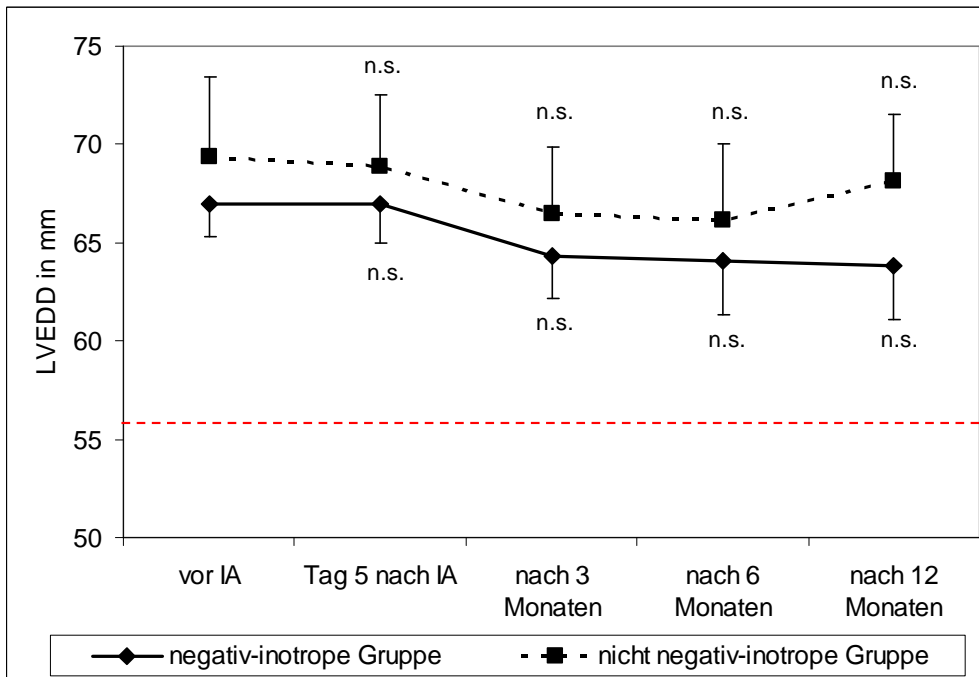


Abbildung 4.3 LVEDD im Verlauf

Normwerte: 32-56 mm (-----), leichtgradig dilatiert: 56-62mm, mittelgradig dilatiert: 62-70 mm, hochgradig dilatiert: > 70 mm,
 Signifikanz einzelner Subgruppen (negativ inotrop und nicht-negativ inotrop) versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

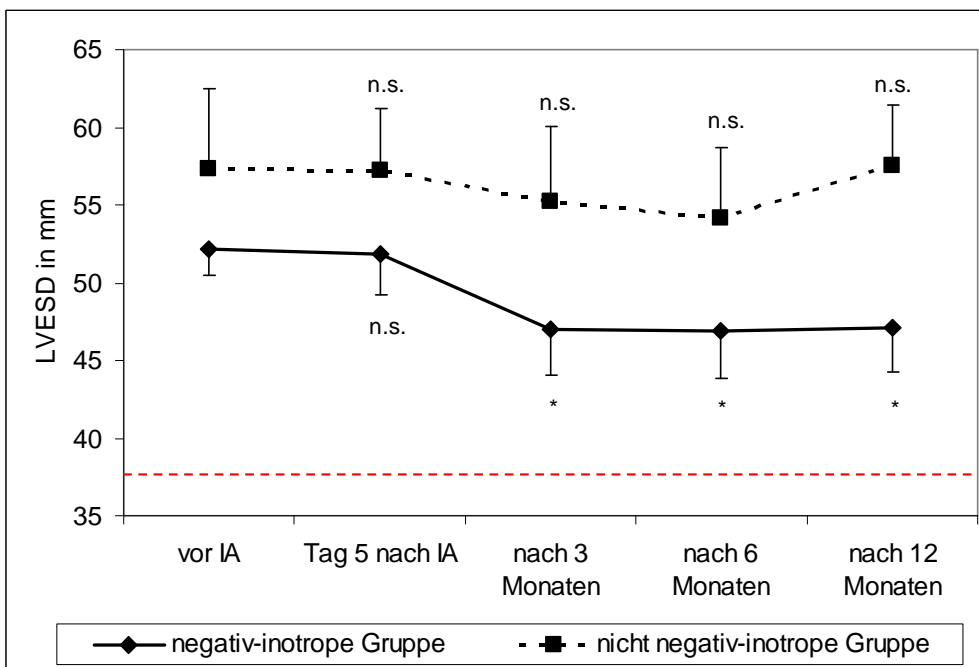


Abbildung 4.4 LVESD im Verlauf

Normwerte: 27-37 mm (-----)
 Signifikanz einzelner Subgruppen (negativ inotrop und nicht-negativ inotrop) versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.3.1.3 NYHA-Stadium

Als Parameter zur klinischen Beurteilung und Verlaufskontrolle bei Herzinsuffizienz wird die NYHA-Klassifikation genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Belastbarkeit der Patienten vor IA und im Verlauf anhand dieser Richtlinien eingeschätzt.

In der negativ inotropen Gruppe konnte nach einem durchschnittlichen NYHA-Grad von $2,5 \pm 0,3$ vor IA, eine Verbesserung auf $1,9 \pm 0,2$ nach 3 Monaten, $2,0 \pm 0,2$ nach 6 Monaten und nach 12 Monaten $1,8 \pm 0,2$ erreicht werden (jeweils $p < 0,05$ vs. vor IA). Dies entspricht eine klinische Verbesserung des Patientenzustandes von Grad II/III vor IA auf Grad I/II 12 Monate nach der Therapie. In der nicht negativ-inotropen Gruppe ließen sich ähnliche Ergebnisse erzielen, welche sich jedoch als nicht signifikant heraus stellten. Hier konnte ebenfalls eine kontinuierliche Reduktion der Herzinsuffizienzsymptome eruiert werden (vor IA: $2,7 \pm 0,4$, nach 3 Monaten: $2,2 \pm 0,3$, nach 6 Monaten: $1,8 \pm 0,4$, nach 12 Monaten: $1,5 \pm 0,2$, jeweils n.s.). Somit konnte auch in dieser Gruppe eine Verbesserung von NYHA II-III auf I-II erreicht werden (Abbildung 4.5).

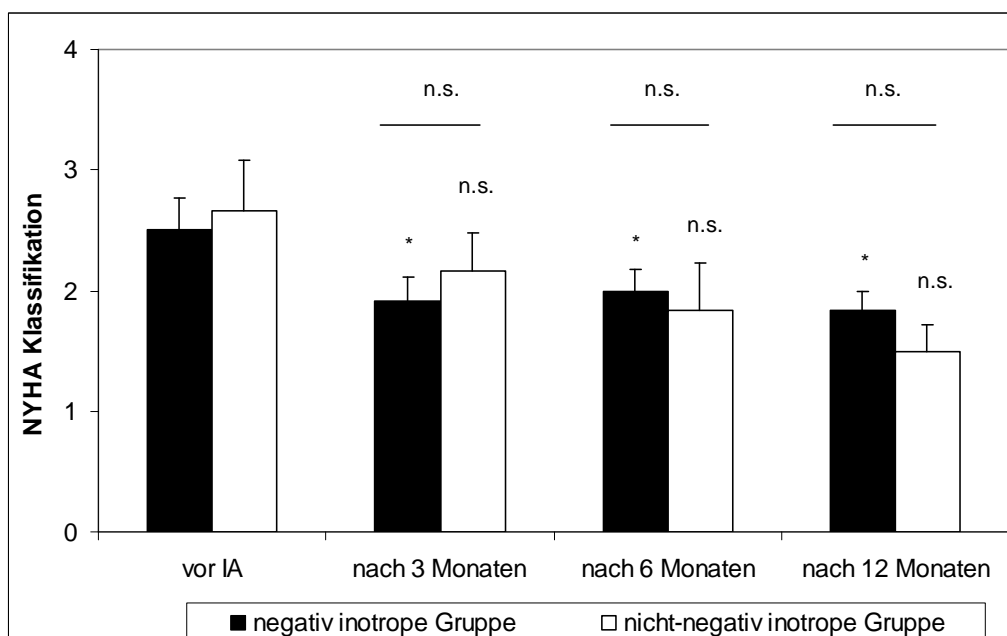


Abbildung 4.5 NYHA-Stadien im Verlauf

Signifikanz einzelner Subgruppen (negativ inotrop und nicht-negativ inotrop) versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.3.1.4 Spiroergometrie

negativ inotrope Gruppe	vor IA	3 Monate post IA	6 Monate post IA	12 Monate post IA
nicht negativ inotrope Gruppe				
max. Belastbarkeit in Watt	99,2 ± 8,8	119,2 ± 10,0 *	120,8 ± 9,5 *	116,7 ± 8,6 (n.s.)
	121 ± 22,8	131 ± 26,4 (n.s.)	149 ± 21,3 (n.s.)	134 ± 22,2 (n.s.)
max. Sauerstoffaufnahme (VO _{2max}) in ml/min/kg	15,51 ± 1,0	18,86 ± 0,9 *	19,26 ± 1,0 ***	18,66 ± 0,6 (n.s.)
	19 ± 3,13	22 ± 3,8 (n.s.)	23 ± 3,1 (n.s.)	21 ± 3,7 (n.s.)
max. Herzfrequenz in 1/min	127,5 ± 7,8	138,1 ± 11,5 (n.s.)	139,2 ± 10,4 (n.s.)	125,7 ± 9,8 (n.s.)
	126 ± 10,2	129 ± 7,9 (n.s.)	131 ± 13,0 (n.s.)	136 ± 10,3 (n.s.)
Sauerstoffverbrauch pro Herzschlag (O ₂ /HR) in ml	9,6 ± 0,7	11,9 ± 1,4 (n.s.)	11,9 ± 1,2 (n.s.)	12,7 ± 1,2 *
	12 ± 1,5	13 ± 1,8 (n.s.)	14 ± 1,5 (n.s.)	13 ± 1,8 (n.s.)

Tabelle 4.3 Entwicklung der körperlichen Belastbarkeit im Verlauf

Normwerte: maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) in ml/min/kg: Männer untrainiert: 35-40 ml, trainiert 80-90 ml, Frauen untrainiert 32-39 ml, trainiert bis 75 ml, **maximale Herzfrequenz in 1/min:** 200- Lebensalter (Jahre), **Sauerstoffverbrauch pro Herzschlag in ml:** 4-6 ml in Ruhe, 10-20 ml bei Maximalbelastung (221,222)

Signifikanz einzelner Subgruppen (negativ inotrop und nicht-negativ inotrop) versus vor IA: * p<0,05, ** p<0,005, *** p< 0,001, n.s.- nicht signifikant

Die Spiroergometriedaten (Tab. 4.3) zeigten eine signifikante Verbesserung der körperlichen Belastbarkeit bei Patienten mit negativ inotrop wirkendem Plasma 3 und 6 Monate nach IA. Die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) als Prognosemarker der Herzinsuffizienz konnte nach 6 Monaten verbessert werden (p<0,001). Auch die maximale körperliche Belastbarkeit konnte zu diesem Zeitpunkt von 99,2 ± 8,8 Watt (vor IA) auf 120,8 ± 9,5 Watt gesteigert werden (p<0,05). Ein Jahr nach IA kam es zu einer erneuten Verschlechterung der kardiopulmonalen Belastbarkeit in dieser Gruppe, wobei aber die niedrigen Ausgangswerte nicht mehr erreicht wurden. In der nicht

negativ inotropen Gruppe kam es ebenfalls zu einer Verbesserung der kardiopulmonalen Belastbarkeit. Diese Leistungssteigerungen waren jedoch nicht signifikant im Vergleich zu den gemessenen Ausgangswerten vor IA.

4.3.2 Entwicklung von Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Beobachtungen von Kontraktilitätsverhalten und Kalziumtransienten an Rattenmyozyten mittels der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Hierbei stellen die angegebenen Mittelwerte die durchschnittliche prozentuale Veränderung von Inotropie/ Ca^{2+} -Transient nach 5 Minuten Inkubationszeit mit den IgG-Fractionen dar.

Um die erfolgreiche Entfernung der kardiotropen Antikörper mit negativ inotropen Effekt zu kontrollieren, wurde am 5. Tag des Immunadsorptionszyklus eine erstmalige post-therapeutische in-vitro-Testung von Kontraktilität und Ca^{2+} -Transient vorgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Messungen des Kontraktilitätsverhaltens bei der negativ inotropen Gruppe einen hoch signifikanten akuten Rückgang des kardiodepressiven Effektes von $-13,97 \pm 1,2 \%$ auf $-4,43 \pm 0,8 \%$ ($p < 0,001$ vs. vor IA) aufwiesen. Dies stellt eine prozentuale Verbesserung von $67,4 \pm 6,5 \%$ dar. Korrelierend hierzu verringerte sich der Ca^{2+} -Transient signifikant von $-7,56 \pm 0,4 \%$ auf $-1,84 \pm 0,8 \%$ ($p < 0,001$ vs. vor IA). Nachdem bereits vor IA bei der nicht negativ-inotropen Gruppe kein eindeutiger kardiodepressiver Effekt der IgG-Fractionen ermittelt werden konnte, kam es nach dem 5. Therapietag zu einer nicht signifikanten Zunahme der Inotropie bei signifikanter Ca^{2+} -Transient-Veränderung ($p < 0,05$) (Abbildung 4.6).

In der negativ inotropen Gruppe konnte 3 Monate nach IA eine signifikante Abnahme des kardiodepressiven Effektes verzeichnet werden. Nach Überleitung der IgG-Fractionen dieser Gruppe reagierten die Rattenkardiomyozyten nun nur noch mit einem Kontraktilitätsverlust von $-7,68 \pm 0,9 \%$ (vgl. $-13,97 \pm 1,2 \%$ vor IA; $p < 0,001$). Sechs Monate nach IA konnte man zunächst eine weitere, hoch signifikante Abnahme der negativ-inotropen Wirkung auf $-5,96 \pm 0,8 \%$ ($p < 0,001$ vs. vor IA) beobachten, bis nach 12 Monaten eine erneute diskrete Zunahme der Kardiodepressivität auf $-8,65 \pm 0,5 \%$ ($p < 0,05$ vs. vor IA, $p < 0,05$ vs. 6 Mon. post IA) nachweisbar war. Somit kann man nach einem halben Jahr von einer 57%igen relativen Verbesserung im

Vergleich zum Inotropieverhalten vor der Therapie sprechen. Nach 12 Monaten beläuft sich diese Reaktion noch auf eine Verbesserung von 34% versus vor IA.

In der nicht negativ-inotropen Gruppe wurden keine signifikanten Verbesserungen im Vergleich zu den Messungen vor IA beobachtet. Hier konnte die größte Veränderung von $-6,96 \pm 1,4$ % zum Zeitpunkt vor IA auf $-4,91 \pm 0,7$ % am Tag 5 verzeichnet werden. Zudem nimmt die negative Inotropie in dieser Gruppe im Beobachtungszeitraum nach 12 Monaten sogar auf $-8,1 \pm 1,0$ zu, dies entspricht einer längerfristigen Kontraktilitätsabnahme von 16,4 % im Vergleich zur Reaktion vor IA.

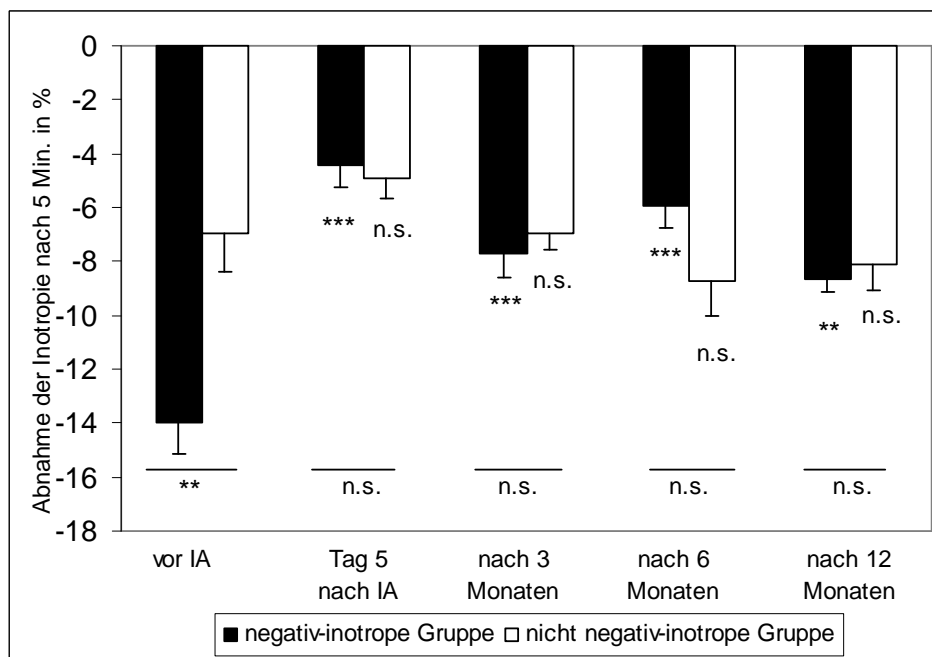


Abbildung 4.6 Inotropieverhalten beider Gruppen im Verlauf nach IA

Signifikanz einzelner Subgruppen (negativ inotrop und nicht-negativ inotrop) versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant
 Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Korrelierend zum Inotropieverhalten beider Gruppen wurden die Veränderungen des Ca^{2+} -Transienten der isolierten Rattenkardiomyozyten in Abbildung 4.7 dokumentiert (Pearson Korrelationskoeffizient Inotropie/ Ca^{2+} -Transient: 0,7 ($p < 0,05$)). Hier war ein signifikanter Unterschied in den Ausgangswerten des Ca^{2+} -Transienten vor IA beider Gruppen nachweisbar (vgl. $-7,56 \pm 0,4$ % negativ-inotrope vs. $-4,67 \pm 0,9$ % nicht negativ-inotrope Gruppe; $p < 0,005$). In beiden Gruppen konnte am 5. Tag nach IA der höchsten Ca^{2+} -Transient nach Überleitung der IgG-Fractionen beobachtet werden (negativ-inotrope Gruppe: $-1,84 \pm 0,8$ %, $p < 0,001$ vs. vor IA; nicht negativ-inotrope

Gruppe: $-1,7 \pm 0,3 \%$, $p < 0,001$ vs. vor IA), jedoch ohne Signifikanz zwischen den Kollektiven (n.s.). Nach 3 und 6 Monaten konnte in der negativ-inotropen Gruppe eine signifikante Verbesserung im Verhalten des Ca^{2+} -Transienten bezüglich vor IA gemessen werden (nach 3 Monaten: $-4,32 \pm 0,8 \%$, $p < 0,05$ vs. vor IA; nach 6 Monaten: $-3,77 \pm 0,6 \%$, $p < 0,005$ vs. vor IA).

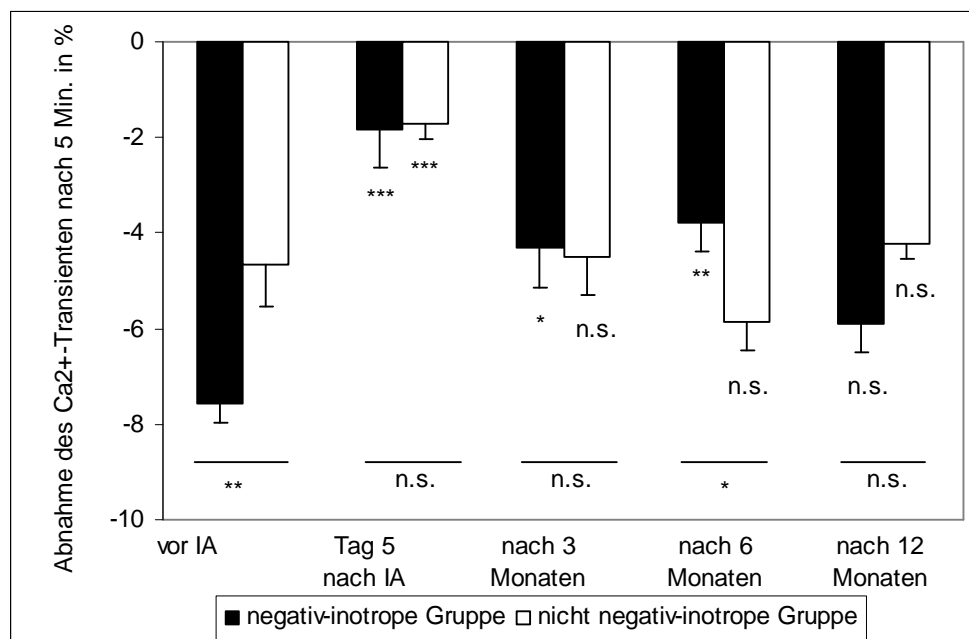


Abbildung 4.7 Verlauf des Ca^{2+} -Transienten beider Gruppen nach IA

Signifikanz einzelner Subgruppen (negativ inotrop und nicht-negativ inotrop) versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

In der nicht negativ-inotropen Gruppe wurden nach dieser Zeit jeweils ähnliche Werte wie vor IA erhoben. Nach 3 Monaten konnte eine erneute Abnahme des Ca^{2+} -Transienten auf $-4,52 \pm 0,8 \%$, nach 6 Monaten auf $-5,87 \pm 0,6 \%$ beobachtet werden, was einen schlechteren Wert darstellt als vor IA. Ein Jahr nach IA wurden in beiden Patientengruppen ähnliche Entwicklungen des Ca^{2+} -Transienten an Kardiomyozyten wie vor IA beobachtet (negativ-inotrope Gruppe: $-5,91 \pm 0,6 \%$, n.s. vs. vor IA; nicht negativ-inotrope Gruppe: $-4,21 \pm 0,3 \%$, n.s. vs. vor IA). Auch im Subgruppenvergleich (negativ inotrope vs. nicht-negativ inotrope Gruppen) zeigten sich ein Jahr nach Immunadsorption keine signifikanten Unterschiede.

4.3.3 Korrelation der linksventrikulären Ejektionsfraktion mit dem Inotropieverhalten und Kalziumtransienten nach Immunadsorption

Die Entwicklung der Kontraktilität und des Ca^{2+} -Transienten zeigte sowohl in der negativ inotropen als auch in der nicht negativ inotropen Gruppe über den Beobachtungsverlauf eine kontinuierliche Korrelation. Zuvor wurde der direkte Zusammenhang zwischen Kontraktilität und Ca^{2+} -Transienten der Rattenkardiomyozyten geprüft (Pearson Korrelationskoeffizient = 0,7, $p < 0,05$). In der negativ inotropen Gruppe konnte bei abnehmendem kardiodepressiven Effekt parallel eine Zunahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion im Verlauf beobachtet werden (Abb. 4.8).

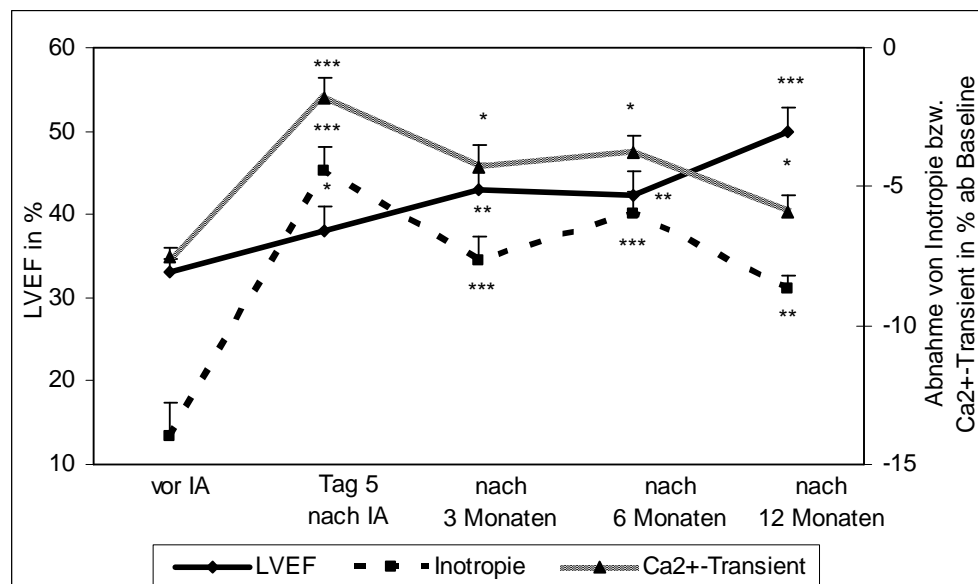


Abbildung 4.8 Entwicklung von LVEF, Kontraktilität und Ca^{2+} -Transienten der negativ inotropen Gruppe im Verlauf

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s. - nicht signifikant

Ein Jahr nach erfolgter IA stieg der negativ inotrope Einfluss erneut geringfügig an (Inotropie $-8,65 \pm 0,4$ %, $p < 0,05$ vs. vor IA, Ca^{2+} -Ratio: $-5,91 \pm 0,6$ %; n.s. vs. vor IA). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion der Patienten ergab ein Jahr nach IA einen signifikanten Anstieg von $50,0 \pm 2,9$ % ($p < 0,005$ vs. vor IA).

In der nicht negativ inotropen Gruppe ist die nicht signifikante Veränderung der LVEF im Beobachtungszeitraum der sich nur schwach verändernden Kardiodepressivität gegenübergestellt (Abb. 4.9).

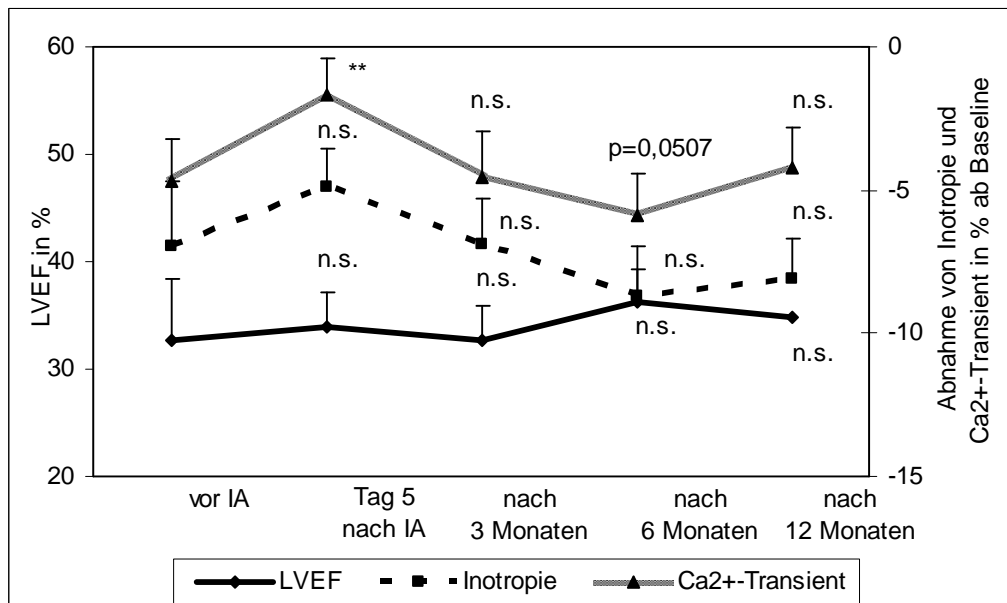


Abbildung 4.9 Entwicklung von LVEF, Kontraktilität und Ca²⁺-Transient der nicht-negativ inotropen Gruppe im Verlauf

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Die akuten und längerfristigen Effekte der IA auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion im Zusammenhang mit der prozentualen Veränderung von negativer Inotropie bzw. Ca²⁺-Transient wurden in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die Differenz der Inotropieabnahme vor IA und den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate nach IA wurde jeweils prozentual berechnet. Hinsichtlich der Veränderung der LVEF wurde die relative prozentuale Steigerung im Vergleich zur Ejektionsfraktion vor IA ermittelt. In diese Untersuchung wurden alle DCM-Patienten eingeschlossen (n=18).

Um die Korrelation der Verbesserung von Inotropie, Ca²⁺-Transient und LVEF zu untersuchen, wurden in den folgenden Abbildungen die Einzelwerte aus den Messungen der 18 Patienten in Scatter Plots dargestellt. Der berechnete Pearson'sche Korrelationskoeffizient und die eingefügten Trendlinien lassen auf den Zusammenhang beider Messdaten schließen.

Zunächst ließ sich bezüglich der Korrelation von Kontraktilitätsmesswerten und Ca²⁺-Transient im Verlauf ein deutlich positiver linearer Zusammenhang feststellen (Daten nicht gezeigt). Dies ermöglicht Rückschlüsse über die Zuverlässigkeit der experimentellen Methode. Die Korrelation konnte statistisch mit dem t-Test zur Prüfung des Korrelationskoeffizienten bestätigt werden. Die deutliche relative prozentuale Reduktion der negativen Inotropie von im Mittel $60,2 \pm 1,5$ % kurz nach der IA an Tag 5

geht einher mit einer ähnlich starken Verbesserung des Ca^{2+} -Transienten ($70,7 \pm 1,9$ %, $p < 0,05$ vs. Kontraktilität). Vergleichbare Entwicklungen beider Messparameter konnten nach 3 (Kontraktilität: $36,0 \pm 1,5$ %, Ca^{2+} -Transient: $24,6 \pm 2,6$ %, $p = 0,064$) und 6 Monaten beobachtet werden (Kontraktilität: $41,5 \pm 2,0$ %, Ca^{2+} -Transient: $27,2 \pm 2,3$ %, $p < 0,05$ vs. Kontraktilität). Bei weiterhin bestehender Korrelation wurde nach einem Jahr sowohl in der Kontraktilitätsmessung ($22,5 \pm 1,49$ %), als auch beim Ca^{2+} -Transient ($18,7 \pm 2,15$ %, n.s. vs. Kontraktilität) eine weniger starke Abnahme der Kardiodepression gesehen.

Zusätzlich wurde der Zusammenhang von experimentell messbarem Kontraktilitätsverhalten der isolierten Rattenkardiomyozyten und der klinischen linksventrikulären Ejektionsfraktion untersucht (Abb. 4.10). Hier konnte eine schwache, negative lineare Korrelation im Beobachtungsverlauf eines Jahres verzeichnet werden ($r = 0,36$). Es zeigte sich im Verlauf eine relative Verbesserung der LVEF im Vergleich zu den Messungen vor IA (Tag 5: $11,9 \pm 1,1$ %, nach 3 Mon.: $22,6 \pm 1,5$ %, nach 6 Mon.: $24,7 \pm 1,5$ %, nach 12 Mon.: $40,2 \pm 1,7$ %). Gleichzeitig konnte eine Abnahme der negativen Inotropie an Rattenkardiomyozyten gezeigt werden.

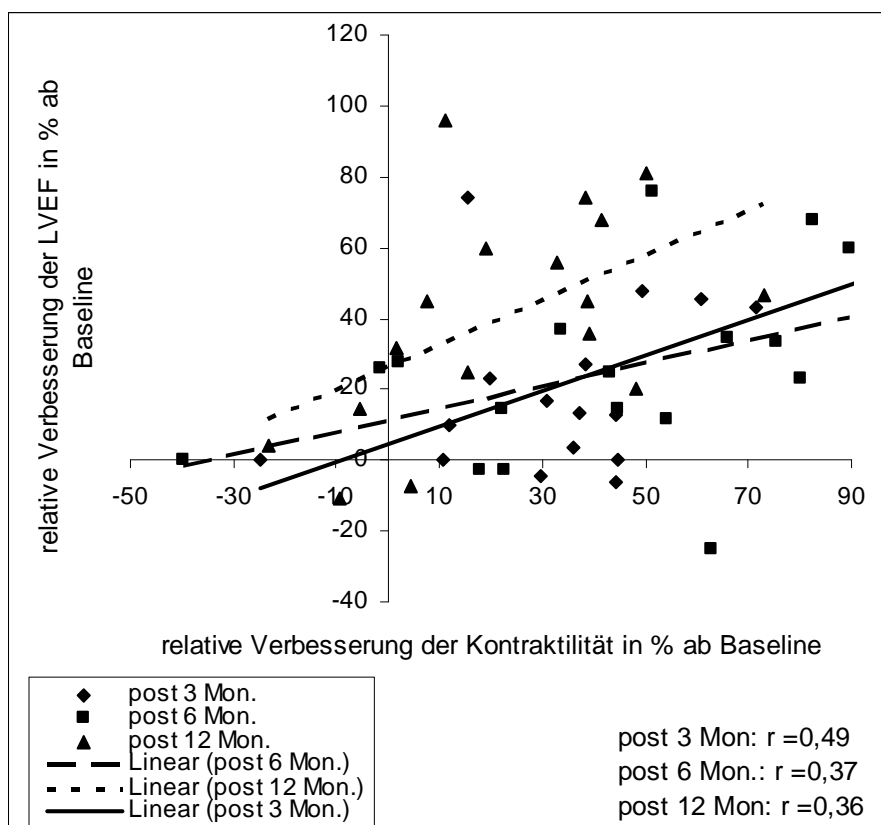


Abbildung 4.10 Korrelation von Kontraktilitätsverhalten und LVEF

Ähnlich verhielt es sich bei der Betrachtung der Korrelation von LVEF und Ca^{2+} -Transient (Abb. 4.11). Hier konnte initial noch ein mittlerer linearer Zusammenhang berechnet werden ($r = 0,36$ nach 3 Monaten). Nach einem Jahr fanden sich keine Korrelationen mehr. Die steigende LVEF korreliert wenig mit der im Verlauf wieder abnehmenden prozentualen Verbesserung des Ca^{2+} -Transienten.

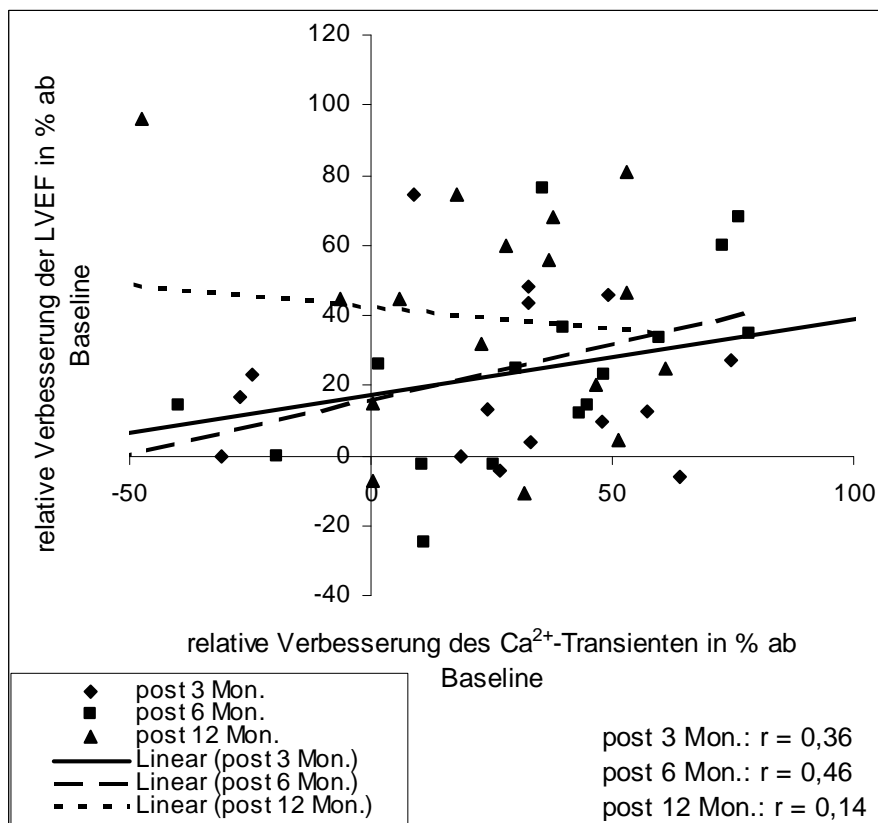


Abbildung 4.11 Korrelation von Ca^{2+} -Transient und LVEF

4.4 Entwicklung von LVEF, Inotropie und Kalziumtransienten in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, Krankheitsdauer und Biopsiefunden

4.4.1 Einfluss des Geschlechtes auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption

Es konnte gezeigt werden, dass die IgG-Fractionen von Männern vor IA einen nur diskret stärkeren kardiodepressiven Effekt auf die isolierten Rattenkardiomyozyten

ausübten, als die von weiblichen Patienten (Kontraktilität Männer: $-11,97 \pm 1,56$ %; Frauen: $-11,1 \pm 2,0$ %; n.s.). Jedoch wurde beobachtet, dass männliche Patienten kurz nach der IA eine ausgeprägtere, signifikante Verbesserung der negativen Inotropie im Vergleich zum Ausgangswert zeigten (Männer: $-66,7\%$, Frauen: $-50,2\%$). Die Messunterschiede der Kontraktilität zwischen beiden Geschlechtern erwiesen sich zu keinem Zeitpunkt als signifikant.

Ein Jahr nach IA bewirkten IgG-Fractionen beider Gruppen einen ähnlichen kardio-depressiven Effekt (Männer: $-8,8 \pm 0,53$ %; Frauen: $-7,81 \pm 0,71$ %) (Abb. 4.12).

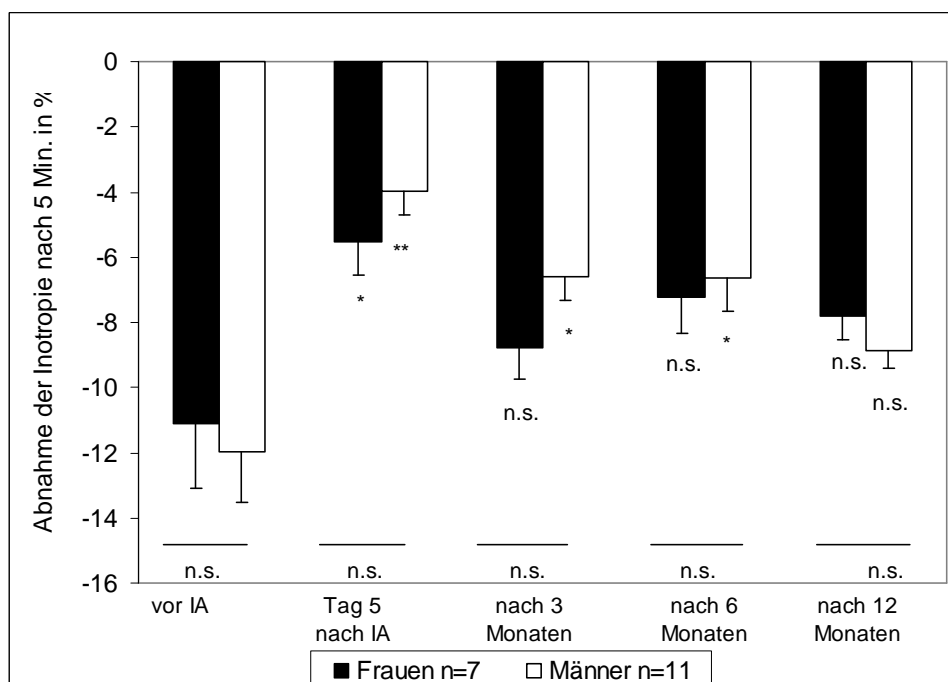


Abbildung 4.12 Vergleich des Inotropieverhaltens beider Geschlechter im Verlauf nach IA

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Das Verhalten des Ca^{2+} -Transienten zeigte korrelierende Ergebnisse. Vor IA wiesen Männer einen niedrigeren Ca^{2+} -Transienten ($-6,99 \pm 0,6\%$) im Vergleich zu Frauen ($-5,97 \pm 0,9$ %, n.s. vs. Männer vor IA) auf. Die Differenzen des Ca^{2+} -Transienten zwischen beiden Geschlechtern waren nicht signifikant und ergaben nach 12 Monaten ähnliche Messergebnisse (Männer: $-5,16 \pm 0,4$ %, Frauen: $-5,62 \pm 0,9$ %).

Es konnte kein Zusammenhang zwischen Geschlecht und Entwicklung der LVEF nach IA gefunden werden. Nach 12 Monaten konnte bei den weiblichen Patienten im Vergleich zu Männern eine nicht signifikant höhere LVEF gemessen werden (Frauen:

46,4 ± 5,3 %, $p < 0,05$ vs. vor IA; Männer: 43,4 ± 3,7 %, $p < 0,05$ vs. vor IA) (Abb.4.13).

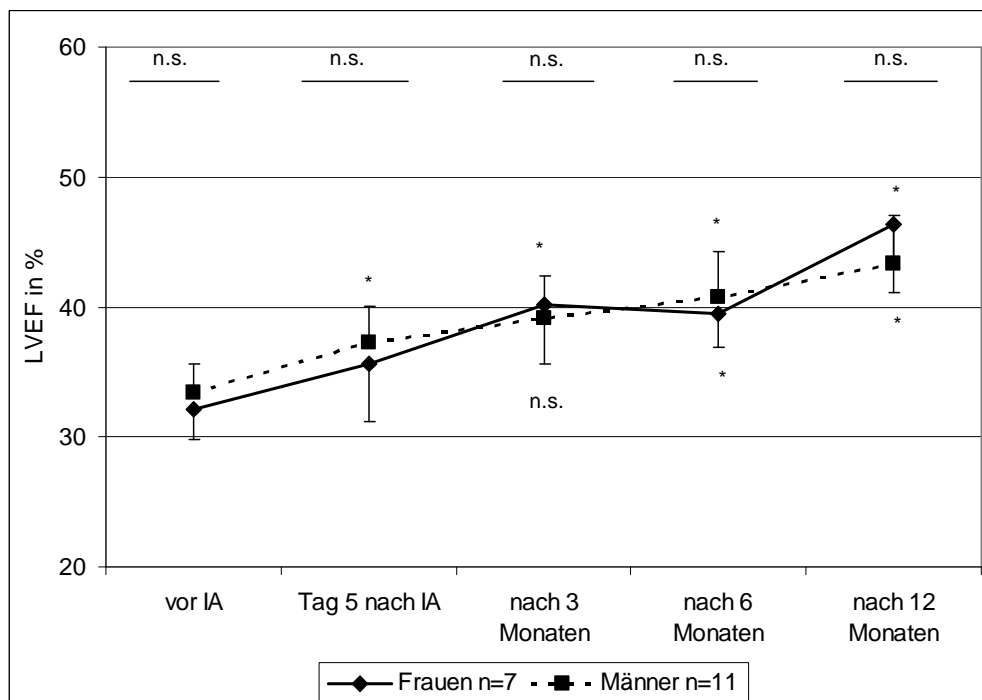


Abbildung 4.13 Entwicklung der LVEF beider Geschlechter im Verlauf nach IA

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.4.2 Einfluss des Alters auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption

Bei der Betrachtung des Inotropieverhaltens und der LVEF im Zusammenhang mit dem Alter wurden die Subgruppen < 56 Jahre bzw. > 56 Jahre mit Hilfe des Median vom Kollektiv gebildet. Es konnte festgestellt werden, dass kein signifikanter Unterschied bezüglich des Kontraktilitätsverhaltens zwischen den Subgruppen „Alter < 56 Jahre“ und „> 56 Jahre“ vor IA besteht. IgG-Fractionen jüngerer Patienten (< 56 J.) erzeugten jedoch am 5. Tag nach IA einen vergleichsweise signifikant höheren kardiodepressiven Effekt an den isolierten Rattenmyozyten als ältere Patienten (Abb. 4.14). Ältere Patienten zeigten zu diesem Zeitpunkt eine Abnahme der negativen Inotropie von relativen -75,4 % im Vergleich zu vor IA. Patienten unter 56 Jahren erreichten eine Abnahme von -51 % am 5. Tag nach IA.

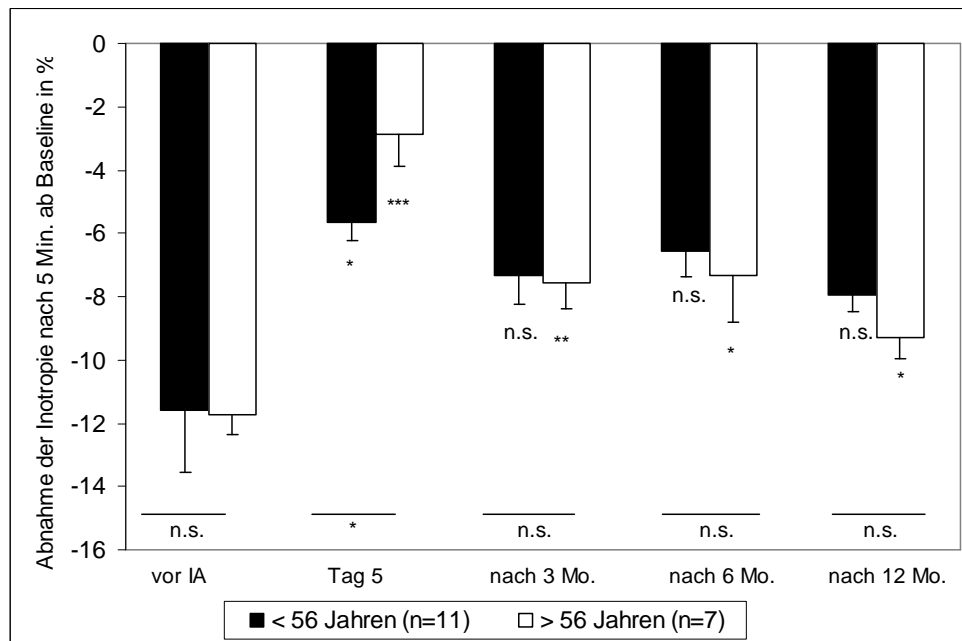


Abbildung 4.14 Veränderung der Inotropie in Abhängigkeit vom Alter

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Des Weiteren wurde die Entwicklung der LVEF in Abhängigkeit vom Alter untersucht (Abb. 4.15). Schon vor Beginn der IA wiesen ältere Patienten eine leicht signifikant höhere LVEF auf als Patienten unter 56 Jahren (> 56 Jahre: $36,3 \pm 2,7$ %, < 56 Jahre: $30,7 \pm 1,8$ %; $p=0,096$). Diese Differenz konnte auch im weiteren Verlauf beobachtet werden. Ein Jahr nach IA wurde bei den über 56jährigen eine höhere, jedoch nicht signifikant verschiedene LVEF gemessen ($49,7 \pm 4,7$ %; $p < 0,05$ vs. vor IA) als in der Vergleichsgruppe ($41,1 \pm 3,6$ %; $p < 0,05$ vs. vor IA) ($p=0,169$).

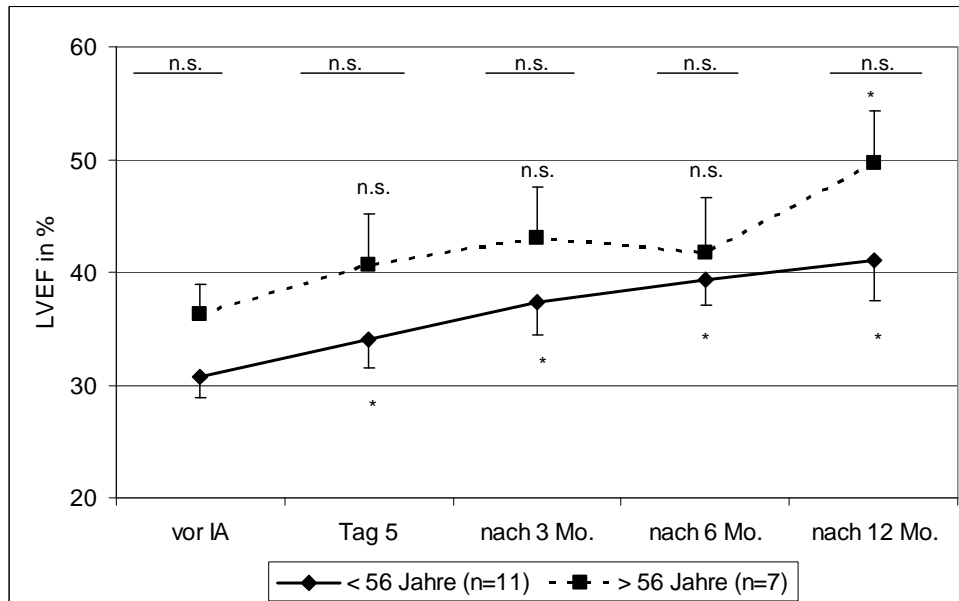


Abbildung 4.15 Veränderung der LVEF in Abhängigkeit vom Alter

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$,
 n.s.- nicht signifikant
 Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$,
 *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.4.3 Einfluss der Krankheitsdauer auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption

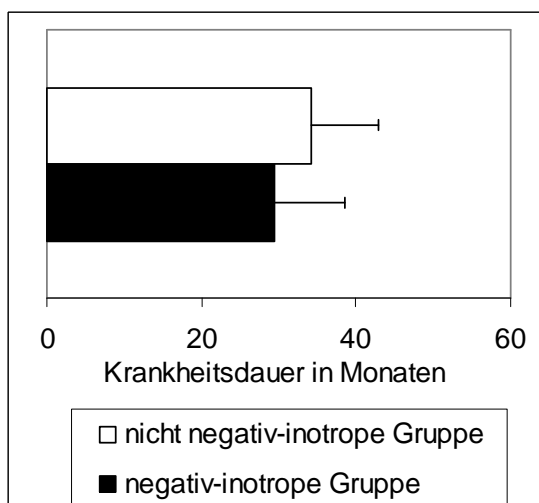


Abbildung 4.16 Mittlere Krankheitsdauer zum Zeitpunkt der Immunadsorption

Die mittlere Krankheitsdauer der Patienten mit negativ-inotropem Effekt betrug $29,5 \pm 8,6$ Monate zum Zeitpunkt der IA. Durchschnittlich belief sich die kardiodepressive Wirkung von IgG-Fractionen dieser Patienten auf $-13,97 \pm 1,17$ % (Ca^{2+} -Transient: $-7,56 \pm 0,39$ %).

Die Patienten der nicht negativ-inotropen Gruppe waren mit $34,3 \pm 9,1$ Monaten ($p=0,731$ vs. negativ-inotrope Gruppe) etwa gleich lang

an DCM erkrankt, bevor sie sich der IA unterzogen. Aus dem Plasma gewonnene IgG-Fractionen bewirkten keinen kardiodepressiven Effekt (Inotropie: $-6,96 \pm 1,43$ %, Ca^{2+} -Transient: $-4,67 \pm 0,87$ %) (Abb. 4.16).

Eine Einteilung der Patienten in zwei Gruppen sollte Unterschiede im Verhalten von Kontraktilität und Ca^{2+} -Transient in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer aufzeigen. Dabei wurde als cut-off der Median gewählt (22,5 Monate Erkrankungsdauer bei Therapiebeginn mit IA). Patienten mit einer kürzeren Erkrankungsdauer (< 22,5 Monate) zeigten vor IA einen höheren, aber nicht signifikanten kardiodepressiven Effekt auf die Rattenmyozyten als, jene mit bereits länger persistierender DCM (> 22,5 Monate). Im Beobachtungsverlauf nach IA ließ sich feststellen, dass es hinsichtlich des abnehmenden negativ inotropen Einflusses zu keinem wesentlichen Unterschied zwischen beiden Subgruppen kam. Unabhängig von der Krankheitsdauer wird nach 12 Monaten ein annähernd gleicher kardiotoxischer Effekt erzielt (Abb. 4.17).

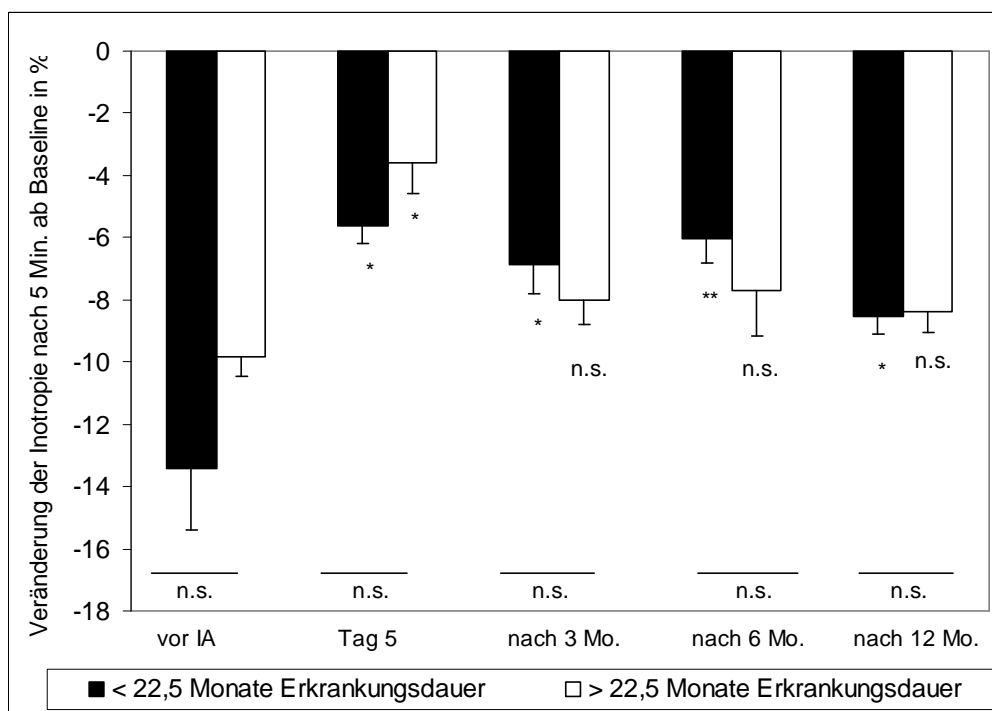


Abbildung 4.17 Einfluss der mittleren Krankheitsdauer auf die Entwicklung der Kontraktilität nach Immunadsorption

Einteilung der Krankheitsdauer der Patienten nach Median = 22,5 Monate
 Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant
 Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

In Abbildung 4.18 ist die Entwicklung der LVEF in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer kurzen Erkrankungsperiode (< 22,5 Monate) vor IA eine signifikant geringere LVEF aufwiesen, als die Vergleichsgruppe mit einer Krankheitsdauer über 22,5 Monate ($29,9 \pm 2,1$ %

vs. $35,9 \pm 2,1$ %; $p=0,062$). Im Zeitraum nach IA relativierten sich diese Differenzen und die LVEF beider Gruppen entwickelte sich ähnlich. Nach 3 bzw. 6 Monaten konnte eine Steigerung der LVEF auf $37,7 \pm 3,5$ % bzw. $37,8 \pm 3,3$ % in der Gruppe Krankheitsdauer < 22,5 Monate erreicht werden. Die Patienten mit einer längeren Erkrankungsperiode konnten in diesem Zeitraum eine Steigerung auf $41,3 \pm 3,7$ % (3 Monate) bzw. $42,5 \pm 3,1$ % (6 Monate) verzeichnen. 12 Monate nach IA konnte in der Gruppe Krankheitsdauer < 22,5 Monate eine signifikante Verbesserung der LVEF bezüglich der Messergebnisse vor IA erreicht werden. In der Gruppe der länger Erkrankten stieg die LVEF nicht signifikant an nach IA. Nach 12 Monaten konnte kein Zusammenhang zwischen Krankheitsdauer und Entwicklung der LVEF festgestellt werden (< 22,5 Monate: $44,2 \pm 3,8$ %; > 22,5 Monate: $44,4 \pm 4,3$ %; n.s.).

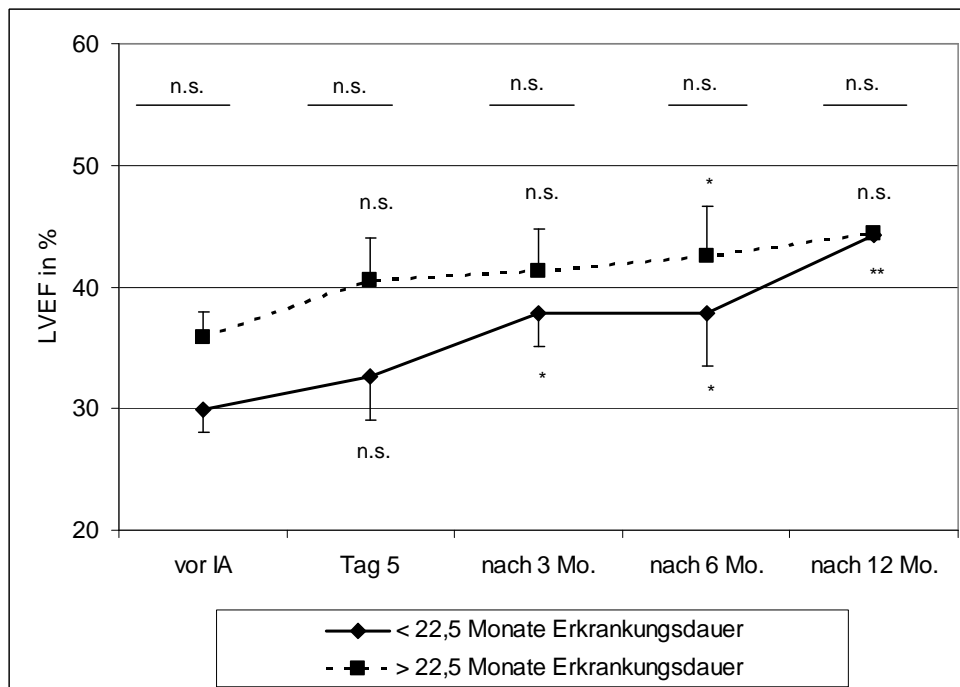


Abbildung 4.18 Einfluss der mittleren Krankheitsdauer auf die Entwicklung der LVEF nach Immunadsorption

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.4.4 Einfluss von präinterventionellen Biopsiebefunden auf linksventrikulärer Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient

Mit Hilfe der Ergebnisse der Endomyokardbiopsien zum Zeitpunkt der Plasmagewinnung vor IA und nach 6 Monaten sollte untersucht werden, inwiefern eine Inflammation oder ein myokardialer Virusnachweis mit der Entwicklung von experimenteller Inotropie bzw. Ca^{2+} -Transient und klinischer LVEF zusammenhängt.

Bei den aufgeführten Diagrammen ist zu beachten, dass in diesem Fall die Kollektivzahl leicht abweicht, da in der negativ-inotropen Gruppe bei einem und in der nicht negativ-inotropen Gruppe bei zwei Patienten kein Biopsiebefund nach 6 Monaten erhoben werden konnte.

4.4.4.1 Einfluss einer Inflammation auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient vor Immunadsorption

Vor IA konnte bei 13 DCM-Patienten (72,2 %) eine Inflammation beobachtet werden. Dabei wurden im Mittel $22,31 \pm 2,6$ CD68+-Zellen und $2,1 \pm 1,7$ CD3+-Zellen nachgewiesen. Bei den verbleibenden 5 Erkrankten konnte bei durchschnittlichen $10,6 \pm 1,5$ positiven CD68-Zellen und keinem Nachweis von CD3+-Zellen nicht von einer Entzündung ausgegangen werden. Es zeigte sich, dass ein nachweisbares Inflammationsgeschehen im Myokard zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zu haben schien. Die LVEF der Patienten mit Inflammation ($32,6 \pm 2,7$ %) unterschied sich nicht signifikant von derer von Patienten ohne Inflammation ($33,6 \pm 2,3$ %) ($p=0,8$). Allerdings konnten in der experimentell messbaren Inotropie und des Ca^{2+} -Transienten zwischen beiden Gruppen signifikante Unterschiede beobachtet werden. IgG-Eluat von Patienten mit nachweisbarer Entzündung hatte einen deutlich kardiodepressiven Effekt auf Rattenkardiomyozyten ($-13,1 \pm 2,1\%$ nach 5min ab Ausgangswert). Hingegen konnte keine eindeutige negative Inotropie durch das Eluat der Patienten ohne nachweisbares Inflammationsgeschehen hervorgerufen werden ($-7,88 \pm 2,2$ % nach 5min ab Baseline; $p<0,05$). Ähnlich verhielt sich auch der Ca^{2+} -Transient ($-7,2 \pm 2,2$ % in der Inflammations-Gruppe, $-5,0 \pm 1,6$ % in der nicht-Inflammations-Gruppe, $p<0,05$) (Abbildung 4.19).

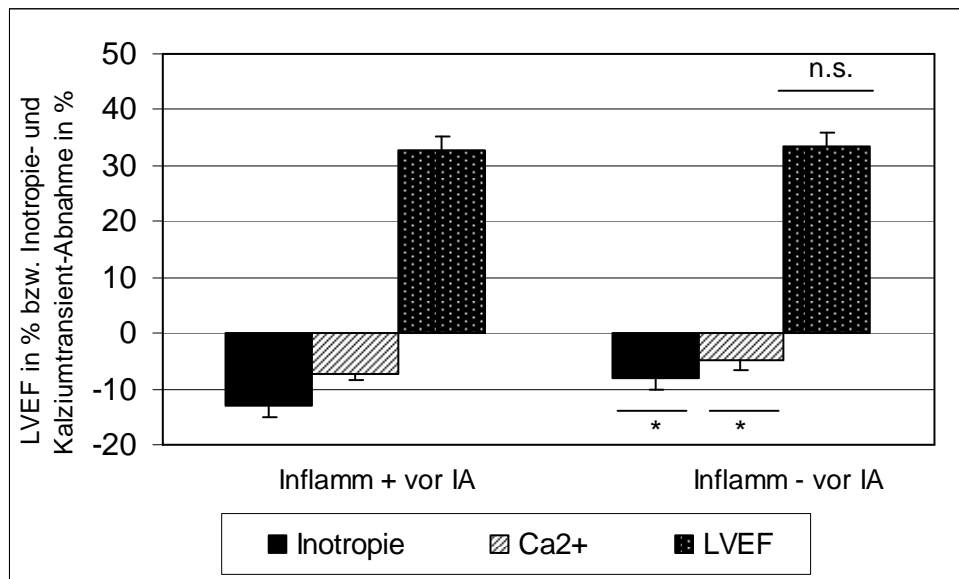


Abbildung 4.19 Verhalten von LVEF, Inotropie und Ca²⁺-Transient in Abhängigkeit eines positiven (Inflamm +) oder negativen Inflammationsbefundes (Inflamm -) vor IA

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.4.4.2 Verlauf von LVEF, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption in Abhängigkeit einer Inflammation

Vor IA konnten keine signifikanten Unterschiede in der LVEF bei Patienten mit und ohne Inflammationsbefund gefunden werden. Der Verlauf der linksventrikulären Ejektionsfraktion zeigte sich auch nach IA in beiden Subgruppen ähnlich. Ein Jahr nach IA unterscheidet sich die linksventrikuläre Pumpfunktion nicht signifikant ($43,2 \pm 2,4$ % in der Inflammations-positiven-Gruppe vs. $46,8 \pm 3,5$ % in der Inflammations-negativen Gruppe, n.s.). Am Tag 5 nach IA zeigten Patienten ohne Inflammationszeichen eine nicht signifikant höhere LVEF ($41,6 \pm 3,8$ % nach 3 Monaten) als diejenigen mit Inflammation ($38,7 \pm 3,1$ % nach 3 Monaten) (Abbildung 4.20).

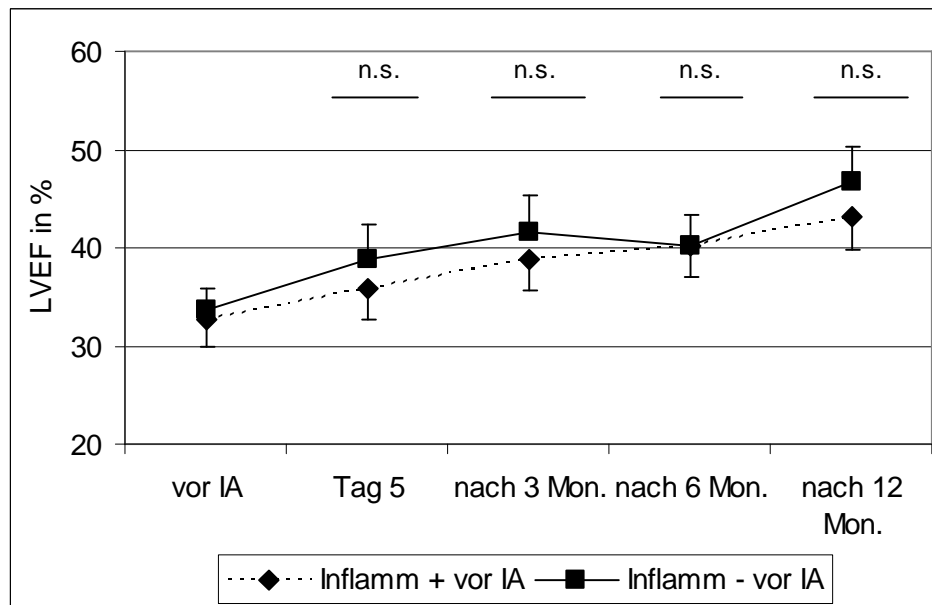


Abbildung 4.20 Verlauf der LVEF nach Immunadsorption in Abhängigkeit eines positiven (Inflamm+) oder negativen (Inflamm-) Inflammationsbefundes vor IA

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Bezüglich des Verlaufes der Inotropie ist in Abbildung 4.21 der signifikant unterschiedliche Ausgangspunkt beider Gruppen deutlich zu erkennen (Inflammations-positive Gruppe: $-13,1 \pm 1,25\%$ vs. Inflammations-negative Gruppe: $-7,9 \pm 2,2\%$, $p < 0,05$). Im Verlauf konnten keine Unterschiede bei der Inotropieentwicklung festgestellt werden.

Ähnliche Beobachtungen zeigten sich auch für den Ca^{2+} -Transienten in Abhängigkeit der präinterventionellen Inflammation. Nach einem signifikant unterschiedlichen Start zum Zeitpunkt vor IA (Inflammations-positive Gruppe: $-7,2 \pm 0,44\%$ vs. Inflammations-negative Gruppe: $-5,0 \pm 1,8\%$, $p < 0,05$) zeigte sich ein ähnlicher, nicht signifikant abfallender Verlauf (keine Abbildung).

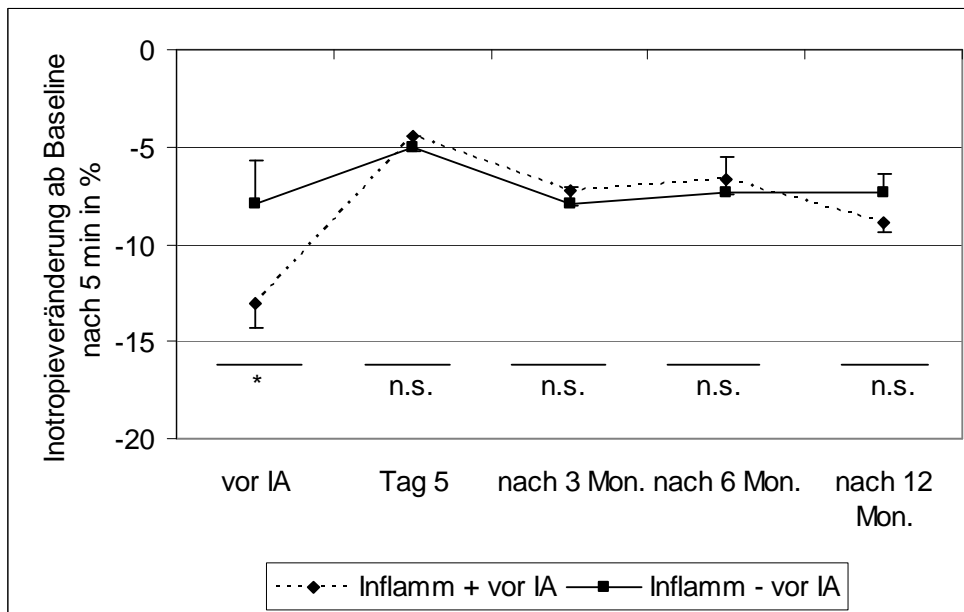


Abbildung 4.21 Verlauf der Inotropie nach Immunadsorption in Abhängigkeit eines positiven (Inflamm+) oder negativen (Inflamm-) Inflammationsbefundes vor IA

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.4.4.3 Einfluss von Immunkomplexmarkern auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient vor Immunadsorption

Vor der IA konnten bei 33,3% der DCM-Patienten keine erhöhte Expression von MHC-II festgestellt werden (MHC-II-Grad 0) (major histocompatibility complex). Ein Großteil der Patienten wies eine mittlere Erhöhung der Immunkomplexe auf (55,6%, MHC-II-Grad 1). Nur ein kleiner Anteil konnte als zweitgradig eingestuft werden (11,1%, MHC-II-Grad 2). Hinsichtlich der LVEF unterscheiden sich die Gruppen nicht wesentlich voneinander (Grad 0: LVEF $32,6 \pm 2,4\%$, Grad 1: LVEF $32,5 \pm 2,5\%$, Grad 2: LVEF $35,5 \pm 4,0\%$; n.s.). Es konnten jedoch Zusammenhänge zwischen dem Grad der Expression von MHC-II und des messbaren Inotropieverhaltens aufgezeigt werden (Abb. 4.22). Demnach kann bei einem MHC-II-Grad 0 von keinem kardio-depressivem Effekt gesprochen werden (Inotropie: $-8,8 \pm 2,2\%$, Ca^{2+} -Transient: $-4,9 \pm 1,5\%$ nach 5 min. ab Baseline). Der Nachweis eines mäßigen (MHC-II-Grad 1) und starken Autoimmungeschehens (MHC-II-Grad 2) kann dagegen einem negativ-inotropen Effekt des IgG-Eluates entsprechen (Inotropie: $-13,4 \pm 2,2\%$, Ca^{2+} -Transient: $-7,5 \pm 1,2\%$ nach 5 min. ab Baseline bei MHC-II-Grad 1; Inotropie: $-11,2 \pm 1,8\%$, Ca^{2+} -Transient: $-6,6 \pm 1,1\%$ nach 5 min. ab Baseline bei MHC-II-Grad 2).

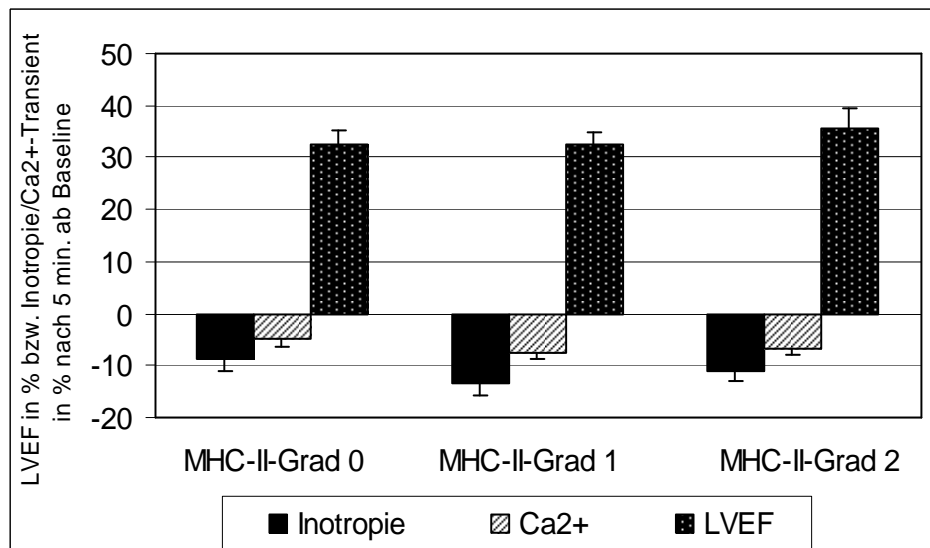


Abbildung 4.22 Verhalten von LVEF, Inotropie und Ca²⁺-Transient in Abhängigkeit der MHC-II-Expression vor IA

4.4.4.4 Verlauf von linksventrikulärer Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption in Abhängigkeit von MHC-II-Expression

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zeigte einen ähnlichen Verlauf sowohl in der Gruppe ohne erhöhte Expression des MHC-II, als auch in der MHC-II-Grad-1-Gruppe. In beiden Subgruppen konnte letztlich nach 12 Monaten eine ähnlich hohe, signifikante Verbesserung der LVEF verzeichnet werden (Grad 0: $44,8 \pm 3,9$ %, $p < 0,05$ vs. vor IA; Grad 1: $46,0 \pm 3,1$ %, $p < 0,05$ vs. vor IA). Lediglich in der Gruppe mit einer hohen Expression von Immunkomplexen (MHC-II-Grad 2) konnte im Beobachtungsverlauf und nach 12 Monaten ein nur unwesentlicher, nicht signifikanter Anstieg der LVEF nachgewiesen werden ($36,0 \pm 2,9$ %, im Vgl. vor IA: $35,5 \pm 4,0$; n.s.) (Abb. 4.23). Es scheint in dieser Arbeit Hinweise darauf zu geben, dass ein hoher Entzündungsgrad mit einer Beeinträchtigung der LVEF einher geht. Die Ergebnisse der einzelnen Subgruppen im Vergleich fielen nicht signifikant aus.

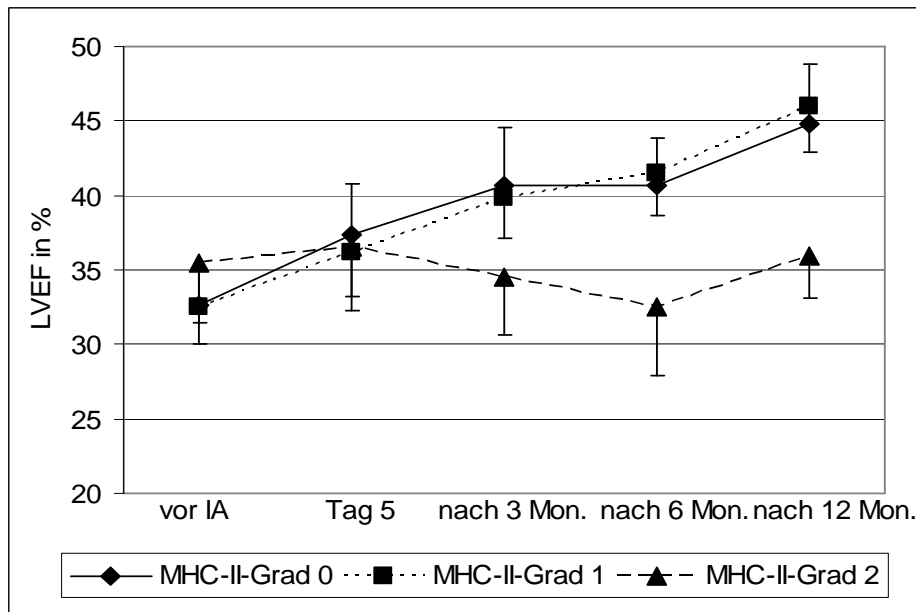


Abbildung 4.23 Verlauf der LVEF nach Immunadsorption in Abhängigkeit des Ausprägungsgrades der MHC-II-Expression

Es ließen sich bezüglich der negativen Inotropie vor IA Unterschiede in Abhängigkeit der MHC-Klassifizierung feststellen (siehe oben). Diese Differenzen zeigten eine zunehmende Kardiodepressivität bei höhergradiger MHC-II-Expression. Diese Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant. Im Verlauf wurden keine Unterschiede bei der Inotropieentwicklung in Abhängigkeit des MHC-II-Grades beobachtet (Abb. 4.24). Für den Ca^{2+} -Transienten ergaben sich analoge Messergebnisse.

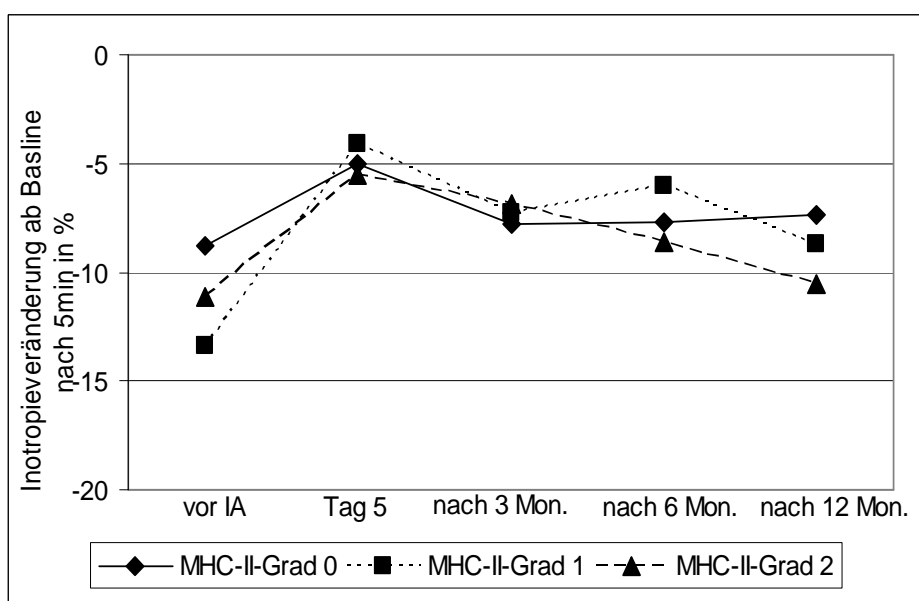


Abbildung 4.24 Verlauf der Inotropie nach Immunadsorption in Abhängigkeit des Ausprägungsgrades der MHC-II-Expression

4.4.4.5 Einfluss einer Viruserkrankung auf linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient vor Immunadsorption

Ein positiver oder negativer Virusbefund im Myokard der untersuchten Patienten hatte keinen signifikanten Einfluss auf Inotropie und Ca^{2+} -Transient vor IA. Das Patienteneluat der Virus-positiven Gruppe hatte vor IA einen kardiodepressiven Effekt von $-11,9 \pm 2,4\%$ (Ca^{2+} -Transient $-6,4 \pm 1,4\%$ nach 5min. ab Ausgangswert) auf isolierte Rattenkardiomyozyten. In der Virus-negativen Gruppe beliefen sich diese Ergebnisse auf $-10,9 \pm 1,7\%$ (Inotropie) bzw. $-7,1 \pm 1,5\%$ (Ca^{2+} -Transient) (n.s.). Die Virus-positive Gruppe zeigte vor IA eine höhere LVEF ($34,5 \pm 2,6\%$) als Patienten ohne Virusnachweis ($28,6 \pm 2,2\%$). Alle Messunterschiede erwiesen sich jedoch als nicht signifikant (Abbildung 4.25).

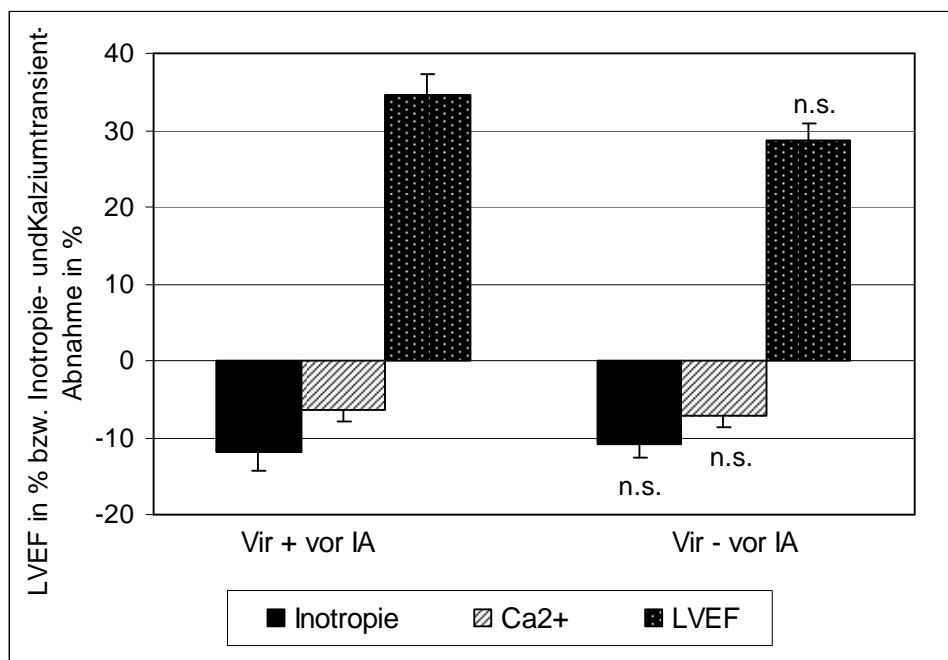


Abbildung 4.25 Verhalten der experimentellen und klinischen Parameter in Abhängigkeit des positiven (Vir +) oder negativen (Vir -) Virusnachweises vor Immunadsorption

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

4.4.4.6 Verlauf der linksventrikulären Ejektionsfraktion, Inotropie und Kalziumtransient nach Immunadsorption in Abhängigkeit einer Viruserkrankung

Im Verlauf nach IA konnte kein eindeutiger Zusammenhang der linksventrikulären Ejektionsfraktion mit einem positiven oder negativen Virusbefund gefunden werden. Beide Gruppen zeigen einen ähnlichen Verlauf einer LVEF von $45,8 \pm 3,4 \%$ ($p < 0,005$ vs. vor IA) in der Virus-positiven und $41,0 \pm 3,7 \%$ ($p < 0,05$ vs. vor IA) in der Virus-negativen Gruppe nach einem Jahr (Abb 4.26). Korrelierend zu diesen Ergebnissen konnte in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg der Inotropie festgestellt werden (Abb. 4.27). Ebenso verhielt sich der Ca^{2+} -Transient. Es konnten jedoch keine statistischen Unterschiede zwischen der Virus-positiven und Virus-negativen Gruppe bezüglich des Inotropieverlaufes bzw. der Ca^{2+} - Transient festgestellt werden. In beiden Gruppen nimmt der Einfluss der negativen Inotropie im Verlauf eines Jahres stetig wieder zu.

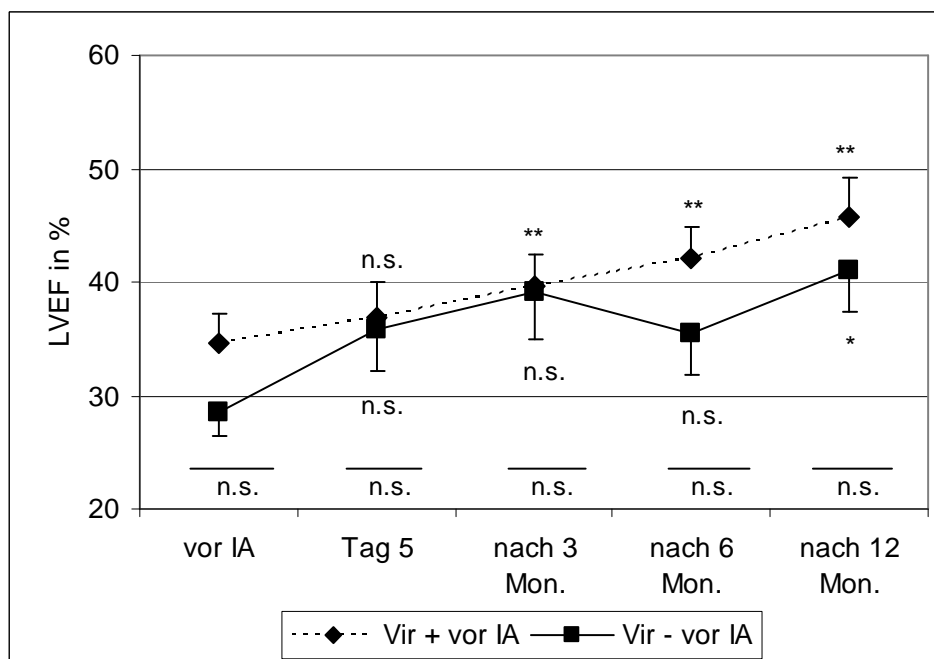


Abbildung 4.26 Verlauf der LVEF nach Immunadsorption in Abhängigkeit des Virusbefundes vor Immunadsorption

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$,

*** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$,

*** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

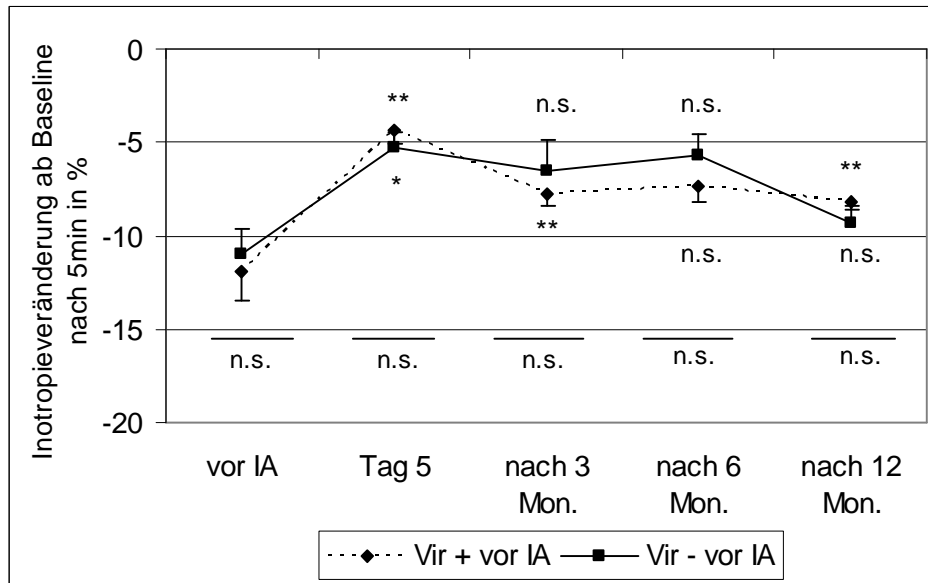


Abbildung 4.27 Verlauf der Inotropie nach Immunadsorption in Abhängigkeit des Virusbefundes vor Immunadsorption

Signifikanz einzelner Subgruppen versus vor IA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$,

*** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

Signifikanz der Subgruppen untereinander (_____): * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$,

*** $p < 0,001$, n.s.- nicht signifikant

5 Diskussion

5.1 Autoimmunität bei der dilatativen Kardiomyopathie

Die multiple, zum Teil autoimmune Genese der DCM brachte über Jahre eine Vielzahl verschiedenster Therapiestrategien mit sich. Man versuchte unter anderem bei nachweisbaren Diskrepanzen der zellulären und humoralen Immunität an dieser Stelle wirksam anzugreifen. Zum einen wurde erkannt, dass es zu einer virusinduzierten Immunantwort kommen kann, welche sich über ein molekulares Mimikry gegen körpereigene Myokardproteine richtet und so eine Autoimmunreaktion auslöst (223-225). Es gelang hinsichtlich der humoralen Störungen, unterschiedliche Autoantikörper gegen kardiale Strukturen und deren Pathophysiologie zu beschreiben (226). Als Ziele dieses Autoimmunprozesses konnten beispielsweise der kardiale β_1 -Rezeptor (227) und der M_2 -Rezeptor (228), sowie Ionenkanäle wie der Ca^{2+} -Kanal (229), aber auch mitochondriale Proteinstrukturen und kontraktile Elemente (230,231) identifiziert werden. Es wurde beobachtet, dass einige Autoantikörper negativ inotrop und somit kardiodepressiv auf isolierte Kardiomyozyten wirkten (232,233). Durch die Immunadsorption (IA) als invasives Therapieverfahren konnten unter anderem bereits durch Felix et al. (234) akute und mittelfristig klinische sowie hämodynamische Fortschritte bei DCM-Patienten beschrieben werden.

Es gelang in der vorliegenden Arbeit eine kleine Patientengruppe von DCM-Erkrankten ($n=18$) über einen Zeitraum von einem Jahr bezüglich des Effektes der Immunadsorption auf symptomatische, diagnostische und experimentelle Parameter zu untersuchen. Hierfür wurde der Einfluss isolierter Autoantikörper in den IgG-Fractionen des Patientenplasmas an feldstimulierten Rattenkardiomyozyten hinsichtlich Kontraktilitäts- und Ca^{2+} -Transient-Verhalten jeweils vor, am 5. Tag der Intervention, als auch 3 Monate, 6 Monate und 12 Monate nach IA beobachtet.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, neben der Darstellung von klinischen und experimentellen Zusammenhängen des Einflusses der Autoantikörper, den Langzeitnutzen dieser Therapieform für DCM-Patienten und mögliche besonders profitierende Patientencharakteristika zu untersuchen. Zu den genannten Zeitpunkten wurden die Antikörper aus dem Patientenplasma mittels in-vitro-Adsorption isoliert. Dies entspricht dem Ablauf der eigentlichen Immunadsorption. Das resultierende Eluat wurde

dann über Rattenkardiomyozyten geleitet, welche zuvor mit Hilfe einer modifizierten Langendorff-Anlage isoliert wurden. In Folge dessen konnten durch Fluoreszenzmikroskopie Veränderungen von systolischer Zellverkürzung (Kontraktilität) und Ca^{2+} -Transient (Ratio) der Rattenkardiomyozyten gemessen und somit Rückschlüsse auf die funktionelle Wirkung der Antikörper getroffen werden. Einerseits wird die prozentuale Veränderung des Kontraktilitätsverhaltens zunächst ohne und folgend mit Antikörpereluat gemessen. Andererseits kann die Änderung der Kalziumkonzentration der Kardiomyozyten mittels einem Kalziumindikatorstoffes (Fura-2-AM) beurteilt werden. Es können somit die Änderungen der Kalziumkonzentration während des Kontraktionszyklus bestimmt werden (235). Diese Methode wurde bei unterschiedlichen Studien etabliert (236-239).

Es wird davon ausgegangen, dass kardiotope Autoantikörper die Zellphysiologie derart beeinflussen können, dass es je nach gekoppelter Antigenstruktur zu unterschiedlichen pathologischen Auswirkungen innerhalb der Myozyten kommt. Unter den beobachteten Patienten konnten 66,7 % (n=12) vor der Immunadsorption identifiziert werden, deren IgG-Fractionen (Antikörpereluat) bei isolierten Rattenkardiomyozyten eine negativ inotrope Wirkung hatten. Dies beinhaltet definitionsgemäß einen Rückgang der systolischen Zellverkürzung von mindestens -9,2 % bzw. des Ca^{2+} -Transienten von mehr als -4,8 % nach Kontakt mit dem Antikörpereluat, wobei dies dem Kriterium für einen kardiodepressiven Effekt entspricht. Diese Grenzwerte wurden mittels der doppelten Standardabweichung der Untersuchungsergebnisse von 18 gesunden Kontrollpatienten festgelegt. Das IgG-Eluat der anderen DCM-Patienten (33,3 %, n=6) konnte vor Immunadsorption keinen kardiodepressiven Einfluss auf die Testzellen ausüben. Statistisch konnten diese Messergebnisse als hoch signifikant gewertet werden ($p < 0,005$).

In der vorliegenden Arbeit wurde die experimentelle Untersuchung an Rattenkardiomyozyten so gewählt, dass davon ausgegangen werden kann, dass der Einfluss von kardiotropen Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Myozyten beobachtet wurde. Innerhalb der großen Anzahl von bisher beschriebenen Antikörpern bei der DCM sind solche, die Antigene der Zelloberfläche binden, vor allem Antikörper gegen den β_1 -Adrenozeptor, gegen kardiales Troponin I (cTnI) und gegen den muskarinergen M2-Acetylcholin-Rezeptor (240). Es konnte zwar schon frühzeitig von Schulze et al.

beschrieben werden, dass nachgewiesene Antikörper gegen den ADP-ATP-Carrier bei Myokarditis und DCM-Erkrankten auch ins Zellinnere penetrieren und den Energiemetabolismus beeinflussen können (241), jedoch ist der Mechanismus der Endozytose bei den akut einsetzenden Kontraktilitätsveränderungen nach nur geringer Inkubationszeit in der vorliegenden Arbeit eher unwahrscheinlich.

In Abhängigkeit der angewendeten Detektionsmethode durch verschiedene Arbeitsgruppen schwanken die Prävalenzangaben von kardiotropen Antikörpern bei DCM-Patienten. Unter anderem können quantitative Nachweismethoden wie Immunfluoreszenz, Immunoblot oder ELISA dazu dienen, zirkulierende Autoantikörper nachzuweisen. Mit Hilfe von Elektrophorese und Western Blot konnten beispielsweise bei 46 % der DCM-Patienten kardiotope IgG-Antikörper gegen myokardiale Proteine nachgewiesen werden (242). Caforio et al. konnten bei Fällen von familiärer und nicht-familiärer DCM mittels Immunfluoreszenz spezifische Antikörper in 60 % nachweisen (243). Eine weitere Arbeitsgruppe beschreibt einen Nachweis von kardiodepressiven Antikörpern bei 63 % der Patienten mittels Immunfluoreszenz, ELISA oder Immunoblot (244). Der Nachweis von kardiodepressiven Antikörpern vor Immunadsorption bei 66,7 % der Patienten in der vorliegenden Arbeit reiht sich somit trotz der geringeren Fallzahl (n=18) in die etablierten Prävalenzzahlen ein.

Es konnte gezeigt werden, dass kardiale Antikörper der IgG-Fraktion angehören und hierbei vor allem Antikörper der Klassen IgG1 und IgG3 immunregulatorische Aktivität und eine große Bedeutung bei der Induktion von Immunreaktionen haben (245,246). Staudt et al. zeigten, dass hämodynamische Verbesserungen nach der Immunadsorption auf die Entfernung von kardiotropen Antikörper der IgG-3-Subklasse zurückzuführen sind (247,248), wobei diese Subklasse eine besonders effektive Komplementaktivierung bewirkt und es damit zu massiven proinflammatorischen Effekten und Zytotoxizität führt (249). Für die Komplement- und Immunreaktionsaktivierung ist das nicht variable Fc-Fragment der Antikörper durch seine Bindung an Fc-Rezeptoren immunkompetenter Moleküle verantwortlich. Es wurde herausgefunden, dass auch humane Kardiomyozyten Fc-Rezeptoren exprimieren können (sog. Fc γ -Rezeptoren IIa) (250). In einem in-vitro-Experiment an isolierten Rattenkardiomyozyten beobachtete man, dass IgG-Antikörper aus dem Plasma von 11 DCM-Patienten mit ihrem F(ab)-Fragment an ihrem kardialen Antigen binden, jedoch zusätzlich mit ihrem Fc-Fragment an den Fc γ -Rezeptor des Kardiomyozyten

andocken und somit negativ inotrope Effekte ausgelöst werden.

Der β -Adrenorezeptor bietet mit seinen drei extrazellulären Schleifen und dem N-terminalen Ende vier mögliche Bindungsorte für Autoantikörper ausserhalb der Zellmembran. Relevante Autoantikörper gegen den β_1 -Adrenorezeptor sind bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie gegen die erste oder zweite extrazelluläre Schleife dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors gerichtet und je nach Detektionssystem in 30-80 % der Patientenseren nachweisbar (251-253). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der β_1 -Autoantikörper als partieller Agonist fungiert und seinen positiv-inotropen Wirkmechanismus über die Kaskade der Proteinkinase A vermittelt (254,255). Staudt et al. beschrieben, dass über den gleichen Signalweg auch ein apoptotischer Effekt induziert wird (256). Der positiv chronotrope Einfluss des β_1 -Autoantikörpers ist auch partiell antagonisierbar mit β -Blockern, was bei der konventionellen Therapie von DCM-Patienten neben den bekannten herzkraftsteigernden Wirkungen dieser Medikamente von Vorteil zu sein scheint. Die pathologische Relevanz dieses Autoantikörpers konnte unter anderem in unterschiedlichen Tiermodellen nachgewiesen werden. Matsui et al. immunisierten Kaninchen ein Jahr lang aktiv mit einem Peptid, welches an die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors binden konnte. Im Verlauf wurden ähnliche histopathologische Myokardveränderungen nachgewiesen wie bei der DCM (257). Wallukat et al. beobachteten einen positiv chronotropen Effekt über 6 Stunden an kultivierten Rattenkardiomyozyten, die mit β_1 -Autoantikörpern versetzt wurden (258). Durch eine solche chronisch permanente adrenerge Stimulation in-vivo durch persistierende β_1 -Autoantikörper werden eine progrediente Herzinsuffizienz forciert und durch Modulation der Ca^{2+} -Homöostase zusätzlich metabolische und elektrophysiologische Störungen geschaffen, welche zu einer Reduktion der Herzfunktion führen (259).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde bei keinem der Patienten ein positiv inotroper Effekt auf isolierte Rattenkardiomyozyten beobachtet. Zum einen ist davon auszugehen, dass eine Überlagerung des positiv-inotropen Effektes der β_1 -Autoantikörper durch andere kardiodepressiv wirkende Autoantikörper im verwendeten Versuchsablauf möglich ist. Da kardiale Autoantikörper zur IgG-Fraktion gehören (260), ist es denkbar, dass Antikörper mit unterschiedlichen kardiotropen Wirkmechanismen während der Immunadsorption entfernt wurden und ihre Effekte im Experiment an Rattenkardiomyozyten kumulieren. Weiterhin werden auch regionale Un-

terschiede der Verbreitung von β 1-Autoantikörpern diskutiert. In einer frühen Studie konnten bei Patienten in der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik in 27 % der Fälle Antikörper gegen die erste extrazelluläre Schleife des β 1-Rezeptors gefunden werden, wohingegen DCM-Erkrankte in der südlichen Bundesrepublik Deutschland 57 % derartige Autoantikörper aufwiesen (261,262). In der vorliegenden Arbeit wurde keine explizite Identifizierung der kardiotropen Antikörper vorgenommen. Es gibt des Weiteren Hinweise, dass eine besonders hohe Inzidenz von β 1-Rezeptorautoantikörpern bei DCM-Patienten detektierbar sind, welche sich im Endstadium der Erkrankung befinden und eine Form von mechanischer Herzstimulation (left ventricular assist device, LVAD) benötigen (263). Mehrere andere Studien beschreiben eine enge Beziehung zwischen der Anwesenheit von β 1-Autoantikörpern und ventrikulären Arrhythmien (264,265). Jedoch befand sich keiner der in der vorliegenden Arbeit beobachteten DCM-Patienten per definitionem im Finalstadium der Erkrankung, litt an ventrikulären Herzrhythmusstörungen oder wurde in einer Form extern kardial stimuliert.

Autoantikörper gegen den muskarinergen M2-Acetylcholinrezeptor wurden bei DCM-Erkrankten erstmals durch Fu et al. beschrieben. In kultivierten, spontan kontrahierenden, neonatalen Rattenkardiomyozyten kam es nach Inkubation mit dem Autoantikörper, welcher aus den DCM-Patientenseren gewonnen wurde, zu einer negativ-chronotropen, agonistischen Reaktion. Dieser Effekt war mit dem Acetylcholinantagonist Atropin, sowie einem Peptid, welches an die zweite extrazelluläre Schleife dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors bindet, neutralisierbar (266,267). Ein ähnlicher Effekt konnte bei isolierten Meerschweinchenkardiomyozyten beobachtet werden. Hier kam es nach Autoantikörperkontakt zu einer Verschiebung des Elektrolytgleichgewichts der Zelle (268). Wang et al. beobachteten eindeutige negativ chronotrope und inotrope Effekte des Autoantikörpers an Ratten in-vivo. Diese Wirkung entsprach dem muskarinergen Rezeptoragonisten Carbachol (269). Es ist zu vermuten, dass auch in den vorliegenden Untersuchungen die Aktivität dieses Autoantikörpers eine hohe Bedeutung hat. Bei einer Detektion des M2-Autoantikörpers von 36-50 % der DCM-Erkrankten (270,271) ist unter anderem auch eine Koexistenz mit dem β 1-Rezeptorautoantikörper beschrieben. Wallukat et al. vermuteten einen moderaten Einfluss des antikörperinduzierten β 1-adrenergen, positiv-chronotropen Effektes durch den gegensätzlich wirkenden M2-Autoantikörper (272). Demnach ist

bei den vorliegenden Ergebnissen eine Überlagerung der kardiodepressiven und stimulierenden Wirkmechanismen denkbar.

Eine weitere Autoantikörperstruktur, welche an den Kontraktilitätsveränderungen der Rattenkardiomyozyten in der vorliegenden Arbeit beteiligt sein könnte, ist gegen kardiales Troponin I (cTnI) gerichtet. Es wurden bereits Mutationen in den cTnI-kodierenden Genen bei familiärer HCM und DCM beschrieben (273,274). Während der Diastole bindet cTnI an Aktin und hemmt somit die Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Durch die Verbindung von einströmendem Kalzium und kardialem Troponin C, wird die Bindung zwischen cTnI und Aktin gelöst und eine Kontraktion infolge der Aktin-Myosin-Interaktion wird möglich (275). Okazaki et al. konnten im Tiermodell zeigen, dass in den Seren von DCM-Mäusen, welche defizient waren für das programmed cell death 1-Molekül (Pdc1^{-/-}), hohe Titer von Autoantikörper gegen cTnI nachzuweisen waren. Weiterhin wurde beschrieben, dass eine Injektion von monoklonalen Antikörpern gegen cTnI eine linksventrikuläre Dilatation, sowie eine Verminderung der kontraktilen Funktion mit einer Ejektionsfraktion von teilweise unter 15% zur Folge hat (276). Diese Erkenntnisse sprechen für einen funktionellen Einfluss dieses Antikörpers bei der Genese der DCM. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass dieses herzspezifische Antigen nicht nur als sarkolemmaler Bestandteil fungiert, sondern auch auf der Oberfläche von Kardiomyozyten exprimiert wird. Insbesondere konnten cTnI-Signale an der Aussenseite der transversalen Tubuli (T-Tubuli) von Kardiomyozyten nachgewiesen werden, was zu der Annahme führt, dass Anti-cTnI-Antikörper einen möglichen Einfluss auf die elektromechanische Funktion der Myozyten haben könnte. T-Tubuli spielen eine zentrale Rolle im Exzitations-Kontraktionszyklus (277). Landsberger et al. konnten in einer Studie mit 98 DCM-Erkrankten in 20,4 % der Fälle Autoantikörper gegen cTnI nachweisen (278). Die Immunisierung von Mäusen mit cTnI bewirkte in einer anderen Untersuchung eine schwere Inflammation, sowie steigende linksventrikuläre Diameter (LVED und LVEDD) (279). Es steht fest, dass durch cTnI der spannungsabhängige Kalziumstrom beeinflusst wird und auch im vorliegenden Fall einen bedeutenden Einfluss auf die Kontraktilität der isolierten Myozyten haben kann. Okazaki et al. beschrieben jedoch eine Änderung des Kalziumstroms nach ca. 15 min (280), wobei in dieser Dissertation bereits nach 5 Minuten die Registrierung des Kalziumtransienten erfolgte. Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es auch im Fall der DCM zu einer diastoli-

schen Funktionsstörung. Diese wird wie die physiologische Kontraktilität über die intrazelluläre Kalziumhomöostase gesteuert und beeinflusst. Es kommt einerseits zu einer verminderten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum während der Systole, andererseits zu einer steigenden Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol während der Diastole, wodurch wiederum ein sogenannter calcium-overload entsteht. Es wird vermutet, dass dieser in Verbindung mit dem langsamen diastolischen Kalziumabfalls für die Relaxationsstörung des Herzens verantwortlich ist (281). Diese Befunde lassen sich vor allem bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz beobachten. In der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend akut einsetzende Veränderungen der Kalziumhomöostase in Form von einer Abnahme des Kalziumtransienten nach Antikörperkontakt an vitalen nicht-insuffizienten Rattenkardiomyozyten beobachtet. Der Kalziumstrom der Zelle kann zum einen über spannungs-abhängige Kalziumkanäle (v.a. vom L-Typ), den Natrium/Kalzium-Austauscher (NCX) oder die Kalzium-ATPase erfolgen. Der Kalzium-Kanal vom L-Typ kann durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus intrazellulär gehemmt oder β -adrenerg durch Phosphorylierung stimuliert werden (282,283), wobei es zum intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom kommt. Der sarkolemmale NCX entfernt intrazelluläres Kalzium nach extrazellulär und wird indirekt über die Natrium/Kalium-ATPase moduliert, worauf der therapeutische Erfolg von Herzglykosiden basiert. Die Kalzium-ATPase wird durch ihr langsames Ausschleusen von Kalziumionen zu den Mechanismen der längerfristigen Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase gezählt und kann bei den vorliegenden Untersuchungen als Antigenstruktur eher vernachlässigt werden. Hierbei ist es vielmehr denkbar, dass Kalziumkanal-blockierende Substanzen wie entsprechende Autoantikörper die beobachtete Abnahme des Kalziumtransienten bewirken. Es konnte gezeigt werden, dass ein reduzierter Kalziumstrom auch durch post-ischämisch freigesetzte negativ inotrop wirkende Substanzen (wobei viele noch nicht identifiziert sind) möglich ist (284). Auch Autoantikörper gegen die Natrium/Kalium-ATPase wurden bei DCM-Patienten bereits nachgewiesen und führen über den oben beschriebenen chronischen Kalziumoverload durch Hemmung der NCX und somit des Kalziumausstroms zur Herzinsuffizienz (285).

In unserem Fall sind insbesondere Autoantikörper gegen den L-Typ-Kalziumkanal interessant, da es bei einer Blockade akut zum reduzierten Kalziumioneneinstrom in die Zelle kommen würde mit nachfolgend negativ inotropem Effekt. Eine frühe Arbeit von Schultheiss et al. zeigte, dass Autoantikörper gegen mitochondriale ADP/ATP-

Carrier eine Kreuzreaktion mit Kalziumkanälen der Zelloberfläche aufweisen und somit den Kalziumtransienten durch reduzierte Kalziumpermeabilität hemmen. Dies führte im weiteren zu einem zytotoxischen Effekt (286). Auch dieser Mechanismus ist in unserem Fall zur Erklärung des abnehmenden Kalziumtransienten denkbar.

Die Erkenntnisse, welche man durch Tiermodelle bezüglich des möglichen direkten Einflusses von Antikörpern bei der Entwicklung einer DCM gewann, implizieren einen durchaus kausalen Zusammenhang in der Genese. Jane-wit et al. beschrieben zuletzt, wie zuvor andere Arbeitsgruppen (287-289), den agonistischen und Apoptose-induzierenden Pathomechanismus des β 1-Rezeptor-Autoantikörper, welcher bei 7 von 12 Mäusen 3 Wochen nach Immunisierung eine fulminante DCM bewirkte (290). Auch die Injektion von monoklonalen Antikörpern gegen kardiales Troponin I zeigte ähnliche Effekte im Tierexperiment (291). Geht man anhand von diesen Untersuchungen davon aus, dass Autoantikörper bei der Pathogenese der DCM eine signifikante Rolle spielen, so liegt nahe, dass entsprechend hohe Antikörperkonzentrationen vor allem zu Beginn der Erkrankung nachweisbar sein sollten. Caforio et al. fanden mittels indirekter Immunfluoreszenz an 110 Patienten heraus, dass kardiale Autoantikörpertiter im Verlauf der Erkrankung sinken (Diagnosezeitpunkt vs. 14 Monate follow-up), es jedoch ungeachtet dessen zu einer deutlichen Progression der klinischen Symptomatik kommt (292). Diese Hypothese kann zum Teil auch in der vorliegenden Dissertation bestätigt werden, ohne dass dabei absolute Konzentrationen von Autoantikörpern bestimmt wurden. Patienten mit einer Krankheitsdauer von maximal 22 Monaten seit Erstdiagnose zeigten einen stärkeren negativ inotropen Effekt als länger Erkrankte (über 22 Monate Krankheitsdauer). Insgesamt konnte in der negativ inotropen Gruppe (n=12) eine kürzere Erkrankungs-dauer ($29,5 \pm 8,61$ Monate) als in der nicht negativ inotrop reagierenden Gruppe ($34,3 \pm 9,1$ Monate) verzeichnet werden. Diese Angaben können jedoch nur bedingt gewertet werden, da einer manifesten dilatativen Kardiomyopathie erwiesenermaßen oft ein symptomfreies Intervall vorausgeht, in dem die Patienten zum Teil diagnostisch noch nicht erfasst werden. Ungeachtet dessen unterstützen die Daten der vorliegenden Arbeit die Annahme, dass kardiodepressive Antikörper ein Phänomen der frühen Krankheitsperiode sind und in der nicht negativ inotropen Gruppe (n=6), welche durchschnittlich länger erkrankt waren, mit der gegenwärtigen Methode nicht mehr nachweisbar waren. Es konnte jedoch nicht festgestellt werden, dass Patienten

mit kürzerer Erkrankungsdauer mildere Symptome aufweisen, als weniger lang Erkrankte. Es wurde vielmehr deutlich, dass die LVEF bei einer Krankheitsdauer unter 22 Monaten geringer ausfiel, als bei einer Krankheitsdauer über 22 Monate.

5.2 Langzeituntersuchungen nach Immunadsorption

Es konnte bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen gezeigt werden, dass zirkulierende Antikörper durch die Immunadsorption aus dem Patientenplasma entfernt wurden. Erkrankungen wie beispielsweise dem Guillain Barré Syndrom oder der Myasthenia gravis, bei denen eine Störung des humoralen Immunsystems mit Ausbildung von Autoantikörpern erwiesen ist, profitieren vom Einsatz der Immunadsorption (293,294).

Die Immunadsorption wurde erstmals in einer unkontrollierten Pilotstudie von Wallukat et al. bei DCM-Patienten eingesetzt (295). Dörrfel et al. konnten in einer zweiten Studie bei neun Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz aufgrund einer DCM (LVEF < 25 %, NYHA III-IV, Herzindex < 2,5 l/min/m²) durch eine unspezifische Immunadsorption an 5 aufeinanderfolgenden Tagen signifikante, akute hämodynamische Verbesserungen sowie einen Anstieg der LVEF beobachten (296). Es wurde eine effektive Reduktion des Gesamt-IgGs als auch des β 1-adrenergen Rezeptorantikörpers nachgewiesen. Diese Ergebnisse konnten bei der ersten kontrollierten Studie an 18 DCM-Patienten mit schwerer symptomatischer Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) von Felix et al. bestätigt werden (297). Erkrankte mit einer LVEF < 30 % wurden initial einer dreitägigen IA-Sitzung unterzogen. Folgend wurde die Therapie in monatlichen Abständen 3-malig wiederholt (je 2 Sitzungen) mit jeweils anschließender Substitution von IgG. Im Vergleich zur konservativ medikamentös therapierten Kontrollgruppe konnte bereits während des ersten Zyklus ein bedeutender Anstieg von LVEF und Herzindex dokumentiert werden. Die Plasmalevel der β 1-Rezeptorautoantikörper sanken signifikant.

Diese akuten Verbesserungen konnten auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, wobei jedoch hier insbesondere das in-vitro-Verhalten von Kontraktilität und Kalziumtransient im Zusammenhang mit den klinischen Verbesserungen betrachtet wurde. Ausgehend von einer etwa ähnlichen LVEF vor IA in der negativ inotropen und nicht negativ inotropen Gruppe kam es bei ersterer zu einem signifikanten An-

stieg der Pumpfunktion bereits am 5. Tag nach erfolgter Immunadsorption ($p < 0,05$ vs. vor IA). Die IgG-Konzentration in dieser Gruppe sank hoch signifikant ($p < 0,001$ vs. vor IA) während der Immunadsorption. Korrelierend dazu konnte experimentell eine akute und hoch signifikante Reduktion des kardiodepressiven Effektes der vor IA stark negativ-inotropen Gruppe am 5. Tag an isolierten Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden, was der sicheren Entfernung kardiodepressiver Antikörper entspricht. Ebenfalls konnte eine weniger starke Beeinflussung des Ca^{2+} -Transienten so kurz nach der IA beobachtet werden, was auf eine Stabilisierung der Kalziumhomöostase hinweist. Diese Ergebnisse bestätigen sich auch in einer Studie von Felix et al. aus dem Jahr 2001, in der mit der gleichen Methode bei DCM-Patienten ein früher hämodynamischer Benefit nach der Immunadsorption verzeichnet werden konnte (298). Es konnte sogar eine Korrelation zwischen der hämodynamischen Verbesserung und dem negativ-inotropen Effekt gezeigt werden. Umso höher sich der akute Benefit eines Patienten nach IA gestaltete, desto stärker zeigte sich auch der kardiodepressive Effekt seines Eluates auf isolierte Zellen. Diese Daten belegen einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis zirkulierender kardiotoxischer Autoantikörper im Patienteneluat und der akuten Verbesserung nach IA.

Nachdem die akuten hämodynamischen Verbesserungen nach der Immunadsorption von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurden (299,300) und auch in dieser Dissertation belegt werden konnten, ist perspektivisch vor allem der Nutzen dieser Therapieform über einen längeren Zeitraum für einen an DCM erkrankten Patienten wichtig. In einer oben bereits erwähnten randomisierten Studie an 18 DCM Patienten untersuchten bereits Felix et al. auch die prolongierten klinischen und hämodynamischen Effekte der Immunadsorption nach 3 Monaten. Dabei konnte in der IA-Gruppe (9 Patienten, NYHA III-IV, LVEF $< 30\%$) gezeigt werden, dass der Herzindex (cardiac index, CI) und der Schlagvolumenindex (stroke volume index, SVI) um 30 % signifikant anstiegen, sowie der systemische vaskuläre Widerstand sank. In der Kontrollgruppe konnten diese hämodynamischen Veränderungen nicht beobachtet werden (301). In einer follow-up Studie an 22 Patienten (LVEF $< 35\%$) von Staudt et al. konnten 6 Monate nach Immunadsorption signifikante Verbesserungen der LVEF von bis zu 9 % absolut erreicht werden. Diese echokardiografisch feststellbare Funktionsverbesserung des Herzens korrelierte mit einem deutlich geringeren NYHA-Herzinsuffizienzlevel. Es konnte eine Abnahme dieser symptomatischen Einteilung

von 3,1 auf 1,5 nach einem halben Jahr verzeichnet werden. In der gleichen Arbeit wurde zudem erstmals randomisiert untersucht, ob eine in monatlichen Intervallen wiederholte Immunadsorption ähnliche akute und prolongierte hämodynamische Verbesserungen bewirkt, wie eine einmalig durchgeführte IA-Therapie. Es konnte gezeigt werden, dass ein IA-Zyklus linksventrikuläre Funktionsverbesserungen (LVEF, CI, SVI, NYHA) nach 6 Monaten bewirkt, welche vergleichbar sind mit den Ergebnissen, die man mit monatlich wiederholten Immunadsorptionssitzungen erzielt (302). Diese Erkenntnisse bedeuteten einen wesentlichen Gewinn in Bezug auf die Therapiestrategie bei DCM-Patienten. Da es sich hierbei um eine invasive und kostenintensive Therapieform handelt, gilt die Durchführung von nur einem IA-Zyklus sowohl patientenfreundlicher als auch wirtschaftlicher.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein einmaliger IA-Zyklus durchgeführt. In der Gruppe mit zuvor nachgewiesenen kardiodepressiven Antikörpern (negativ-inotrope Gruppe) konnte nach 3 Monaten ein Anstieg der LVEF von $33,0 \pm 1,7 \%$ auf $43,0 \pm 3,0 \%$ ($p < 0,005$ vs. vor IA) verzeichnet werden, welcher nach 6 Monaten persistierte ($42,0 \pm 0,3 \%$, $p < 0,005$ vs. vor IA). Dies entspricht einer ähnlichen absoluten Verbesserung der linksventrikulären Auswurffraktion, wie sie Staudt et al. beschreiben konnten (303). Dem gegenüber steht ein moderater, nicht signifikanter Anstieg der LVEF nach 3 und 6 Monaten in der Gruppe ohne nachweisbare kardiotope Antikörper vor IA (nicht negativ-inotrope Gruppe). Der mangelnde Benefit dieser Gruppe unterstützt die Hypothese, dass bei einer DCM ohne zuvor nachgewiesene kardiodepressive Autoantikörper, die Durchführung der Immunadsorption nur bedingte Verbesserungen mit sich bringt, welche womöglich vielmehr immunmodulatorischer Natur sind. Es konnte gleichzeitig eine signifikante Abnahme des experimentellen kardiodepressiven Effektes in der zuvor deutlich negativ-inotropen Gruppe nach 3 und 6 Monaten verzeichnet werden (jeweils $p < 0,001$ vs. vor IA). Dieser prolongierte in-vitro Effekt der Immunadsorption durch die Entfernung funktionaler Antikörper spiegelt sich in-vivo in den oben erwähnten klinischen Verbesserungen wieder. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Benefit von DCM-Patienten nach Immunadsorption mit dem negativ-inotropen Effekt ihres Eluates prätherapeutisch korreliert.

Bei der klinischen Klassifikation mittels NYHA-Schema konnten ebenfalls vergleichbare Beobachtungen gemacht werden wie in früheren Studien. In der negativ-inotropen Gruppe wurde hier eine Verbesserung von $2,5 \pm 0,2$ auf $1,9 \pm 0,2$ nach 3

Monaten erreicht, wobei sich wiederum ein prolongierter Effekt nach 6 Monaten feststellen ließ. In dieser subjektiven Bewertung konnten auch Patienten ohne nachweisbare kardiotope Antikörper profitieren. In der nicht negativ-inotropen Gruppe konnten ähnlich geringere NYHA-Level erreicht werden, was sich jedoch womöglich aufgrund der kleinen Fallzahl (n=6) als nicht signifikant herausstellte. Unabhängig der entfernten Autoantikörper durch die Immunadsorption konnte gezeigt werden, dass zusätzlich eine signifikante Reduktion von Herzinsuffizienz-spezifischen Markern wie nt-BNP und nt-ANP zu verzeichnen ist, wobei ausgeschlossen werden konnte, dass beide Mediatoren durch den Adsorptionsvorgang entfernt werden (304,305). Die neurohumoralen Mediatoren ANP (atrial natriuretic peptide) und BNP (brain natriuretic peptide) mit ihren aktiven Peptiden nt-pro-ANP und nt-pro-BNP, sind bei einer linksventrikulären Dysfunktion des Herzens erhöht und steigen proportional zur Schwere der Herzinsuffizienz. Die symptomatischen Verbesserungen beider Patientengruppen, eruierbar mittels der NYHA-Klassifikation, könnten unter anderem mit einer Abnahme dieser Parameter in Verbindung mit einem zum Teil auch nur leichten Anstieg der LVEF (in der nicht-negativ inotropen Gruppe) erklärt werden. Des Weiteren zeigten Gullestad et al., dass eine IgG-Substitution positive Effekte bei Patienten mit Herzinsuffizienz, sowie eine Abnahme des nt-pro-ANPs zur Folge hat (306). Die Rolle der IgG-Substitution wird später noch ausführlich diskutiert.

Es gibt Hinweise darauf, dass durch die Entfernung der Antikörper der pathogenetische Autoimmunprozess durchbrochen wird und es zu einer abnehmenden myokardialen Depression kommt. Man kann womöglich zusätzlich von einem Erholungseffekt des Gewebes sprechen, in dem inflammatorische Prozesse und Mediatoren rückläufig sind. Dieser weitere Aspekt der Immunadsorption umfasst die Immunmodulation und das mögliche Eingreifen in bestehende Autoimmun- und Inflamationsprozesse des Organismus, was zur Forcierung antientzündlicher Prozesse führt (307). Nachdem einige Publikationen einen Zusammenhang zwischen Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie beschrieben (308,309), wird die Hypothese diskutiert, dass es sich bei der progredienten DCM um einen weiterhin aktiven Immunprozess handelt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Infiltrationen mit Lymphozyten und monoklonalen Zellen, sowie eine erhöhte Expression von HLA-Antigenen, bei der DCM ein häufiges Phänomen darstellen (310-312). Hierzu untersuchten Staudt et al. die immunhistologischen Veränderungen des myokardialen

Gewebes nach IA und folgender IgG-Substitution im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Es wurden Biopsien des rechten Ventrikels vor Beginn der Therapie und nach 3 Monaten entnommen. Die Ergebnisse zeigten einen Abfall der Lymphozyteninfiltration (313) und LCA (leukocyte common antigen)-positiver Zellen, sowie eine Verminderung der HLA-Klasse-II-Antigenexpression 3 Monate nach IA, was einen signifikanten Rückgang der Myokardinflammation widerspiegelt. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der LVEF von 21,3 % auf 27 % beobachtet werden (314). Ähnliche Ergebnisse konnten in dieser Dissertation beobachtet werden. Die Parameter der Leukozyteninfiltration, des MHC-Klasse-II-Grades sowie die CD68- und CD3-positiven Zellen zeigten sich nach 6 Monaten rückläufig. Dabei wurden nur vor IA und nach 6 Monaten Myokardbiopsien der Patienten entnommen. Demnach kann keine Aussage über die längerfristige Entwicklung der inflammatorischen Zellinfiltration nach einem Jahr getroffen werden. Es wurde jedoch die Entwicklung der LVEF in Abhängigkeit vom prätherapeutischen Biopsiebefund untersucht.

Die Testung des Patientenuates an isolierten Rattenkardiomyozyten ergab einen deutlich nachweisbaren kardiodepressiven Effekt bei gleichzeitig positivem Inflammationsbefund, wohingegen bei Patienten ohne Inflammationsgeschehen keine negative Inotropie beobachtet werden konnte. Diese Erkenntnis unterstützt die Hypothese der autoreaktiven Genese der DCM. Direkte virale Zytotoxizität und antivirale Immunantwort können eine Inflammation begünstigen. Durch Kreuzreaktionen zwischen Virusantigenen und körpereigenen Proteinen ist die Entwicklung einer Autoreaktivität gegen myokardiale Strukturen möglich, welche von regulatorischen T-Zellen- und T-Helfer-Zellen gesteuert wird, die letztlich zur Ausbildung von kardiotropen Autoantikörpern führt (315). Es ist möglich, dass bei persistierender Inflammation eine hohe Prävalenz kardiodepressiver Antikörper nachgewiesen werden kann, welche den erhöhten kardiodepressiven Effekt erklären.

Zum gleichen Zeitpunkt konnte kein Einfluss eines bioptisch gesicherten Inflammationsbefundes auf die LVEF festgestellt werden. Demnach übt IgG-Eluat von DCM-Patienten mit gleichzeitiger Entzündung einen stärkeren kardiodepressiven Effekt aus als ohne bei jeweils gleicher LVEF. In diesem Fall könnte postuliert werden, dass kardiale Kompensationsmechanismen in-vivo dazu beitragen, dass die effektive Schlagleistung des Herzens trotz Inflammation noch beibehalten wird, wohingegen experimentell der negative Einfluss von entzündlichem Plasma auf Myozyten nicht gepuffert werden kann. Um diesem Mechanismus entgegenzuwirken und überwie-

gend den Effekt der Autoantikörper zu beobachten, wurde zur Komplementinaktivierung eine Hitzephase in die Aufbereitung des Patientenplasmas eingefügt. Demzufolge wurden zumindest hitzelabile proinflammatorische Substanzen eliminiert. Schlussfolgernd kann jedoch bei diesen Daten festgestellt werden, dass ein positiver Inflammationsbefund in-vivo keinen signifikanten Einfluss auf die präinterventionelle Schwere der Herzinsuffizienz in dieser kleinen Fallzahl zu haben scheint. Im follow-up kann der nicht signifikante Trend beobachtet werden, dass Patienten mit prätherapeutisch positivem Inflammationsbefund einen geringen LVEF-Anstieg erreichen als solche ohne nachweisbares Inflammationsgeschehen.

Weiterhin konnte auch in Abhängigkeit der erhöhten Expression von Histokompatibilitätskomplexen der Klasse II (MHC-II) eine zunehmende negativ inotrope Wirkung des Patientenplasmas festgestellt werden bei jeweils ähnlicher LVEF. Demnach wurde bei MHC-II-Grad 0 kein kardiodepressiver Effekt, bei Grad 1 und 2 jedoch ein deutlicher kardiodepressiver Effekt nachgewiesen. Im Verlauf wurde deutlich, dass Patienten mit nachweislich starkem Autoimmungeschehen (MHC-II-Grad 2) vor der Immunadsorption einen weniger starken Anstieg der LVEF im Verlauf erreichten. Autoreaktive T-Zellen erlangen ihre Aktivierung, indem sie an antigene Peptide der MHC-Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen binden. Eine Hypothese der kardialen Autoreaktivität besagt, dass durch myokardiale Nekrose intrazelluläre, kardiale Antigene freigesetzt werden, welche durch ihre extrazelluläre Lage nun Autoantigene in hoher Konzentration darstellen, die zur T-Zell-Aktivierung führen. Weiterhin könnte ein inflammatorischer Prozess durch Modifizierung kardialer Antigene zur Präsentation dem Immunsystem unbekanntem, sonst verborgenen Peptiden führen, wobei bei zuvor nicht stattgehabter Toleranzentwicklung eine Aktivierung des Autoimmunsystems eintritt. Eine dritte Hypothese beinhaltet eine Induktion der Autoreaktivität durch fremde Antigene, welche durch ein molekulares Mimikry zu einer Aktivierung von autoreaktiven T- und B-Zellen führen (z.B. Streptokokken der Gruppe A und kardiales Myosin) (316). Im vorliegenden Fall können eine hohe Rate an MHC-Molekülen im Biopsiematerial der DCM-Patienten vor allem als Hinweise auf eine erhöhte Nekroserate des Myokards oder persistierende Inflammation gedeutet werden. Der mangelnde Anstieg der LVEF nach IA bei Patienten mit hohem MHC-Klasse-II-Grad ist möglicherweise mit der fortgeschrittenen myokardialen Schädigung zu erklären, welche eine Funktionsverbesserung aus strukturellen Gründen nicht mehr zulässt. Die nachgewiesene verstärkte negative Inotropie des Eluates der Pati-

enten mit Inflammation korreliert mit der oben genannten Hypothese der hohen Prävalenz von Autoantikörpern und könnte die Entwicklung der LVEF im Verlauf beeinflussen.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass ein positiver Inflammationsbefund und der Nachweis eines höhergradigen Autoimmungeschehens zum Beginn der Immunadsorption mit einem deutlichen negativ-inotropen Effekt des Eluates an isolierten Myozyten assoziiert ist. Die funktionelle Herzarbeit ist zu diesem Zeitpunkt davon nur wenig beeinträchtigt. Vielmehr scheint es Anhalt dafür zu geben, dass ein prätherapeutischer Inflammationsnachweis respektive eine hohe MHC-Molekül-Expression einen frühen Hinweis für eine schlechtere Prognose hinsichtlich des längerfristigen Effektes der IA darstellen, da diese Patienten post-interventionell in der vorliegenden Untersuchung einen geringeren LVEF-Anstieg erreichten. In diesem Fall können die kardiodepressiven Antikörper eine myokardiale Schädigung anzeigen und machen eine Prognoseaussage möglich.

Diese Beobachtungen unterstützen unter anderem die Hypothese, dass bei einer myokardialen Inflammation womöglich ein Zusammenhang zwischen dem zellulären und humoralen Immunsystem besteht. Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben erhöhte Plasmalevel von zirkulierenden Zytokinen und deren Rolle als essentielle Marker der Immunantwort bei Herzinsuffizienz (317-321). Es konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF α (Tumornekrosefaktor α) vermehrt freigesetzt werden (322). Yokoyama et al. beschrieben einen konzentrations- und zeitabhängigen negativ-inotropen Effekt von TNF α an isolierten Herzzellen. Dieser Mechanismus war vollständig regredient nach Eliminierung des Zytokins und nach Gabe von anti-TNF α -Antikörpern. Man kam zu dem Schluss, dass TNF α einen verminderten intrazellulären Kalziumgehalt während der systolischen Zellverkürzung und somit Abnormalitäten der Kontraktilität bewirkt (323). Man kann davon ausgehen, dass Zytokine wie TNF α durch die IA nicht entfernt werden (324) und somit nach der Autoantikörperadsorption in-vivo immer noch potenziell kardiotrop wirkende Substanzen zirkulieren. Im vorliegenden in-vitro Versuch kann somit der TNF α -Effekt nicht miteinbezogen werden.

In der Vergangenheit konnten nur wenige Langzeituntersuchungen an DCM-Erkrankten, welche mit der IA therapiert wurden, zum näheren Verständnis der pro-

longierten Wirkung dieser modernen Intervention beitragen.

In einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie an 34 Patienten mit mittlerer bis fortgeschrittener Herzinsuffizienz und nachgewiesenen β 1-Autoantikörpern untersuchten Müller et al. im 1-Jahres-follow-up echokardiografische Parameter, β 1-Autoantikörperlevel und klinische Aspekte. Die Kontrollgruppe (n=17) wurde konservativ-medikamentös nach den aktuellen Standards der Herzinsuffizienztherapie behandelt. Sie konnten zeigen, dass ein Jahr nach IA die LVEF von $22,3 \pm 3,3\%$ auf $37,9 \pm 7,9\%$ anstieg, die linksventrikulären diastolischen Diameter um 14,5 % abnahmen und die subjektive NYHA-Beurteilung signifikant sank (325). In der Kontrollgruppe konnten keine ähnlichen Erfolge erreicht werden.

Diese klinischen Ergebnisse können mit der vorliegenden Arbeit weitestgehend bestätigt werden. Zusätzlich konnte jedoch durch die experimentelle Untersuchung der Funktionalität möglicher Autoantikörper mittels Immunfluoreszenzmikroskopie eine Aussage über langfristige Auswirkungen der IA auf die Kontraktilität von Myozyten getroffen werden. Es gelang somit ein Einblick bezüglich der funktionalen Effekte des Patientenplasmas von DCM-Erkrankten nach erfolgter IA-Therapie. Neben den weiter oben beschriebenen kurz- und mittelfristigen symptomatischen Verbesserungen der Patienten zeigte sich nach einem Jahr in der vor IA negativ-inotropen Gruppe ein hoch signifikanter Anstieg der LVEF auf $50 \pm 2,9\%$. Dies stellt eine relative Verbesserung von 53 % im Vergleich zum Ausgangswert vor Immunadsorption dar (vgl. $33,0 \pm 1,7\%$). Zusätzlich konnte eine Reduktion der NYHA-Klassifikation von $2,5 \pm 0,2$ vor IA auf $1,8 \pm 0,17$ nach einem Jahr erreicht werden. Hinsichtlich der linksventrikulären Durchmesser konnte eine Reduktion des LVEDD von 4,7 % und des LVESD von 9,8 % nach einem Jahr erreicht werden. Im Vergleich mit den Daten von Müller et al. fällt auf, dass die Kontrollgruppe ohne Immunadsorption in dieser Arbeit eine ähnliche Entwicklung der LV-Diameter zeigt wie die nicht-negativ inotrope Gruppe in der vorliegenden Arbeit. Beide Gruppen zeigen im Verlauf eine leichte Verminderung der linksventrikulären Durchmesser, es kommt jedoch nach ca. 12 Monaten zu einer erneuten Dilatation der Ventrikel. Demnach können in der nicht negativ-inotropen Gruppe im Verlauf LV-Diameter erhoben werden, welche einem Patientenkollektiv mit konservativer Therapie ohne IA entsprechen. Die Gruppe, bei der vor IA keine kardiodepressiven Effekte von Autoantikörpern nachgewiesen werden konnte, scheint somit in Bezug auf die Dilatation des linken Ventrikels keinen Benefit zu erlangen. Auch die längerfristige Entwicklung der LVEF in dieser Gruppe

zeigte keine signifikanten Verbesserungen ein Jahr postinterventionell. Lediglich in der Entwicklung der NYHA-Levels konnten hier leichte Verbesserungen verzeichnet werden.

Vom klinisch-diagnostischen Aspekt scheint die IA demnach bei Patienten mit zuvor nachweisbarem negativ-inotropen Effekt ihres Eluates auf isolierte Rattenkardiomyozyten (und somit potentiell nachgewiesenen kardiotropen Autoantikörpern) einen deutlichen längerfristigen Erfolg mit sich zu bringen. Es konnten deutliche Steigerungen der linksventrikulären Pumpfraktion in Verbindung mit verringerten und längerfristig stabilen linksventrikulären Diametern und letztlich mit einer subjektiv-symptomatischen Verbesserung der Patienten erreicht werden. Experimentell konnte in der zuvor kardiodepressiven Gruppe mittelfristig ein Rückgang des negativ-inotropen Einflusses beobachtet werden ($p < 0,001$ vs. vor IA). Es wurde im Rahmen dieser Dissertation jedoch beobachtet, dass nach einem Jahr dieser kardiodepressive Effekt wieder zunimmt ($p < 0,05$ vs. vor IA). Hinsichtlich des Ca^{2+} -Transients kann auch hier nach 12 Monaten eine deutliche Verschlechterung im Vergleich zu stabilen Verbesserungen nach einem halben Jahr beobachtet werden. Es wurden weiterhin Korrelationsbetrachtungen durchgeführt, welche einen kontinuierlichen Zusammenhang zwischen der LVEF-Verbesserung und dem experimentellen Kontraktionsverhalten im Beobachtungszeitraum beweisen. Man kann damit postulieren, dass je höher die relative prozentuale Verbesserung der Pumpfraktion des Herzens im Vergleich vor Immunadsorption ist, desto weniger negativ-inotrope Effekte konnten durch das Patientenuelat ausgelöst werden.

Die wiederkehrenden negativ-inotropen Effekte nach einem Jahr könnten einen Hinweis für eine frühzeitig detektierte erneute Progredienz der Kardiomyopathie darstellen. Wird davon ausgegangen, dass die gefundene, progrediente kardiodepressive Funktionalität nach einem Jahr als Spiegelbild erneut auftretender Autoantikörper fungiert, so ist ein steigender Antikörpertiter zu diesem Zeitpunkt anzunehmen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Arbeitsgruppe um Dörrfel (326) fand jedoch in einer kleinen Studie mit 9 DCM-Patienten, welche über einen Zeitraum von 3 Jahren begleitet und untersucht wurden, heraus, dass eine progrediente Verschlechterung der kardiovaskulären Funktion mit steigenden $\beta 1$ -Antikörpertitern einhergeht. Diese Untersuchungen bestätigen die Hypothese der vorliegenden Arbeit, wobei es denkbar ist, dass es zu einer erneuten Progredienz

des Autoimmungeschehens mit dem erneuten Auftreten kardiotroper Autoantikörper beispielsweise bei Viruspersistenz oder Neuinfektion im Verlauf nach IA kommen kann.

Ungeachtet dessen scheinen zum gleichen Zeitpunkt jedoch klinische und diagnostische Parameter weiterhin stabil oder sogar verbessert zu sein. Es ist denkbar, dass die experimentell-mikroskopisch nachgewiesenen kontraktile Defizite 12 Monate postinterventionell, ausgelöst durch wiederkehrende kardiodepressive Effekte, noch kein myokardial-funktionales Korrelat mit sich bringen, diese Form der Kompensation nach einer gewissen Zeitspanne jedoch rückläufig ist und folgend eine erneute Progredienz der Herzinsuffizienz symptomatisch wird.

Es gibt derzeit einige wenige Studien, welche den Langzeitbenefit der IA bei DCM-Patienten beweisen. Knebel et al. (327) untersuchten die Reduktion der Morbidität nach IA an 34 Patienten (LVEF < 35 %, NYHA II-III) über drei Jahre. Es konnte gezeigt werden, dass für DCM-Erkrankte, welche sich einer Immunadsorption unterzogen, die jährliche Hospitalisierungszeit bezüglich der Herzinsuffizienz signifikant gesenkt werden konnte (17,2 Tage/Jahr vor IA versus 4,3 Tage/Jahr nach IA). Tendenziell konnte mit dieser Arbeit weiterhin nachgewiesen werden, dass die Anzahl der Krankenhausaufenthalte in Abhängigkeit der Zeitspanne nach IA wieder zunehmen. Diese These könnte im Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bedeuten, dass eine erneute Progredienz der Herzinsuffizienzsymptomatik respektive der DCM, mit einem symptomverbesserten Intervall von ein bis drei Jahren nach IA, erwartet werden kann. Ein früher Hinweis auf eine erneute myokardiale Insuffizienz könnte mittels in-vitro-Testung des Eluateffektes an isolierten Myozyten erfolgen, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen. Die Schlussfolgerung dieser Untersuchung würde eine Identifizierung derjenigen Patienten bedeuten, welche von der IA profitieren (negativ-inotrope) und bei wiederkehrenden kardiodepressiven Effekten nach einem bestimmten symptomverbesserten Zeitraum womöglich einem erneuten Immunadsorptionszyklus unterzogen werden sollten. Schon Staudt et al. (328) diskutierten, dass der Nachweis kardiotroper Antikörper eine prädiktive Bedeutung für die Effizienz der IA haben könnte. Gleichbedeutend damit ist der ausbleibende Benefit in der Gruppe ohne nachgewiesene kardiodepressive Effekte (nicht negativ-inotrope) ein Hinweis darauf, dass diese Patienten möglicherweise der IA nicht unterzogen werden müssten. Es sind jedoch weitere größere Studien nötig, um den prolongier-

ten Effekt der IA und die Pathophysiologie potenziell wiederkehrender Autoantikörper zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit kann ein Trend von Abhängigkeiten beobachtet werden. So konnten zwar keine geschlechtsspezifischen Zusammenhänge zwischen Inotropie- und LVEF-Verlauf beobachtet werden, jedoch gab es Hinweise darauf, dass beispielsweise bei älteren Patienten (>56 Jahre) im Verlauf es zu einer höheren LVEF kam als bei Jüngeren. Ein Grund hierfür könnten niedrigere Antikörpertiter im höheren Stadium der Erkrankung sein (siehe weiter oben diskutiert). Diese Ergebnisse waren womöglich auch aufgrund der niedrigen Stichprobe nicht signifikant und müssen in größeren Studien untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation unterstützen den aktuellen Kenntnisstand bezüglich des positiven Effektes der IA als additive Therapieform bei DCM-Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere bei zuvor nachgewiesenen funktionalen kardiodepressiven Antikörpereffekten ein längerfristiger klinischer Benefit zu verzeichnen ist. Experimentell wurden jedoch im follow-up nach einem Jahr wiederkehrende zunehmend negativ inotrope Auswirkungen im Patienteneluat beobachtet. Es ist bekannt, dass Aphaese-Therapien bei anderen Autoimmunerkrankungen mit nachgewiesener Antikörpergenese nur durch wiederholten Einsatz Symptomverbesserungen erzielen. Ein Teil des beobachteten Patientenkollektivs in der vorliegenden Arbeit zeigte zwar eine tendenziell erneut auftretende Kardiodepressivität ein Jahr nach IA-Therapie, konnte jedoch hinsichtlich klinischer und subjektiver Parameter weiterhin steigende Verbesserungen vorweisen. Eine erneute IA nach ca. einem Jahr bei diesen Patienten wäre denkbar. Müller et al. konnten selbst 12 Monate nach IA keinen signifikanten Antikörperanstieg feststellen (329). Der genaue Zeitpunkt einer IA-Wiederholung könnte individuell festgelegt werden. Die physiologischen Hintergründe der wiederkehrenden negativen Inotropie könnten neben potenziell wieder auftretenden Antikörpern auch in einem erneuten inflammatorischen Prozess begründet liegen. Es wurde in mehreren Studien bewiesen, dass bei der DCM eine vermehrte Präsenz immunkompetenter Zellen besteht und die IA diesbezüglich einen positiven Einfluss hat (330,331). Mit diesem Wissen sind womöglich auch die diskreten, nicht signifikanten und kurzfristigen Verbesserungen der Patientengruppe zu erklären, bei der zuvor keine funktionell aktiven Antikörper nachgewiesen werden konnten. In diesen Fällen ist der Benefit aufgrund einer positiven Immunmodulation in Verbindung mit der postinterventionellen intravenösen Immunglobulinsubstitution

zu diskutieren. Zukunftsweisend ist es wichtig, diejenigen Patienten zu identifizieren, welche von der IA, beispielsweise bei nachgewiesenen kardiodepressiven Antikörpern, längerfristig profitieren. Auch konnte in der vorliegenden Arbeit im Ansatz gezeigt werden, dass im Verlauf keine signifikanten Unterschiede bezüglich der präinterventionell nachgewiesenen Viruslast bei LVEF und Inotropie/ Ca^{2+} -Ratio zu erwarten sind. Es konnten jedoch Hinweise erarbeitet werden, dass ein hoher Grad an MHC-Expression im Verlauf trotz IA mit einer geringeren LVEF einhergeht. Um dies zu untersuchen, wären umfangreichere Studien mit einem großen Patientenkollektiv über einen längeren Zeitraum notwendig.

Ein anderer diskussionswürdiger Aspekt ist das zum Teil uneinheitliche Therapieprotokoll verschiedener Arbeitsgruppen. Diesbezüglich wird unter anderem die postinterventionelle Substitution von intravenösem Immunglobulin (IVIg) (332) diskutiert. Dies geschieht zur Prävention von Infektionen, welche möglicherweise aus einem zu niedrigen zirkulierenden IgG-Level nach Immunadsorption resultieren könnten. Unbestritten ist, dass IVIg das Immunsystem beeinflusst, indem Antikörper neutralisiert werden und ihre Synthese gehemmt wird durch die Bindung von IVIg an Fc-Rezeptoren der B-Lymphozyten. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass IgG die Produktion inflammatorischer Zytokine über Bindung an Fc-Rezeptoren bei einer in vitro induzierten Myokarditis hemmen kann (333,334). Weitere antiinflammatorische Effekte von IgG werden durch die Auswirkungen auf das Komplementsystem vermittelt. Es wurden regulierende Einflüsse auf die Faktoren C3a, C3b, C4b und C5a beschrieben, wodurch es zu einer verminderten Granulozyteninvasion und Präsenz monozytärer Inflammationszellen kommt (335,336). Es wird kontrovers argumentiert, inwiefern der klinische und hämodynamische Benefit nach Immunadsorption allein auf der Elimination der Autoantikörper und möglicher Immunmodulation beruht oder ob die Gabe von IVIg einen bedeutenden Anteil an diesen Verbesserungen leistet. Placebo-kontrollierte Untersuchungen konnten zeigen, dass hoch dosierte IgG-Substitutionen positive Auswirkungen bei chronischer Herzinsuffizienz haben (LVEF < 40 %, NYHA II-IV). Nach der monatlichen IVIg-Substitution über ein halbes Jahr zeigte sich eine signifikante LVEF-Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe (337). Um den alleinigen IA-Effekt zu verifizieren, verzichteten Cooper et al. in einer Pilotstudie an 9 DCM-Patienten auf die IVIg-Gabe nach Immunadsorption. Sie beobachteten eine signifikante Steigerung der Lebensqualität für die nächsten 6 Monate, sowie einen Anstieg der LVEF von 35 % auf 44 % (338). McNamara et al. konnten in

einer Placebo-kontrollierten Studie an 62 Patienten zeigen, dass eine hochdosierte IgG-Substitution (2g/kg KG) keinen signifikanten Therapiebenefit bei der recent-onset (akuter) DCM mit sich bringt (339). In der vorliegenden Arbeit wurde nach Immunadsorption jedoch eine weitaus geringere Dosis an IVIG (0,5 g/kg KG) verabreicht. Es kann davon ausgegangen werden, dass etwaige positive Auswirkungen des polyklonalen IgG in diesem Fall in die Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen, jedoch anteilig vernachlässigt werden können. Unter Umständen können die nicht signifikanten Verbesserungen in der Gruppe ohne funktionale Antikörper auf diesem immunmodulatorischen Effekt basieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur eine kleine Fallzahl beobachtet. Ergebnisse, bei denen in dieser Arbeit aufgrund des kleinen Kollektivs Trends gesehen, jedoch keine signifikanten Aussagen getroffen werden konnten, müssen in größeren Studien untersucht werden. Die Methode des experimentellen Anteils ergab zuverlässige Ergebnisse, ist jedoch störanfällig hinsichtlich der Messmethode bei Nichteinhaltung der vorgegebenen zeitlichen Intervalle beispielsweise bei der Zellextraktion und Eluatherstellung. Die Methode eignet sich nicht für eine Screeningmethode aufgrund der aufwendigen Durchführung. Bezüglich der Erhebung der klinischen Parameter muss die Abhängigkeit vom Untersucher kritisch diskutiert werden. Hier sind möglicherweise Messfehler möglich, so dass sämtliche Messungen (z.B. Echokardiografie oder Spiroergometrie) durch einen Untersucher durchgeführt werden sollte.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen klinischem Benefit nach IA und experimenteller Effekte von kardiotropen Autoantikörpern bei DCM-Patienten nachgewiesen werden. Es bleibt jedoch unklar, inwiefern Antikörper eine direkte pathogenetische Rolle spielen oder humorale Marker eines Autoimmungschehens darstellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es auch im Vergleich mit anderen langfristigen Studien Hinweise zu geben scheint, die eine notwendige erneute IA nach einem bestimmten symptomverbesserten Zeitintervall denkbar machen. Hierfür scheinen sich insbesondere Patienten mit deutlichen kardiodepressiven Wirkungen der Autoantikörper zu eignen, denn diese haben einen signifikant höheren Gewinn durch die Therapie mittels Immunadsorption.

6 Zusammenfassung

Bei der DCM führt eine ausgeprägte Dilatation einer oder beider Herzkammern zu einer fortschreitenden Herzinsuffizienz, wobei oft nur eine Herztransplantation die einzige Heilungsoption darstellt. Die Immunadsorption bietet bei der Behandlung der dilatativen Kardiomyopathie eine Therapieoption, welche neben der konventionellen medikamentösen Herzinsuffizienztherapie in der Pathophysiologie dieser Erkrankung angreift. Kardiotrope Autoantikörper als Folge eines inflammatorischen Autoimmunprozesses können hierbei effektiv ausgewaschen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Immunadsorption auf die klinische Entwicklung bei DCM-Patienten über ein Jahr, in Abhängigkeit von verschiedenen Charakteristika untersucht werden. Ausserdem wurde experimentell die Wirkung von IgG-Fractionen dieser Patienten auf isolierte Rattenkardiomyozyten vor der Immunadsorption und im Verlauf untersucht. Es sollte eine Aussage über den Effekt der Immunadsorption nach einem Jahr, besonders profitierende Patientenkollektive sowie die Korrelation von klinischer Entwicklung und messbarem Kontraktions- und Kalziumtransientverhalten an isolierten Rattenkardiomyozyten getroffen werden. Es wurden dafür jeweils die IgG-Fractionen des Plasmas der DCM-Patienten vor der Immunadsorption, am 5.Tag nach der Intervention sowie im Verlauf nach 3, 6 und 12 Monaten unter einem Fluoreszenzmikroskop über isolierte Rattenkardiomyozyten geleitet. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde der kardiotrope Effekt evaluiert und ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass einige Patientenproben einen negativ-inotropen, andere hingegen keinen Effekt auf das Kontraktionsverhalten der Zellen hatten.

Es konnte gezeigt werden, dass vor und nach Immunadsorption eine Korrelation zwischen der klinischen Entwicklung der Patienten und experimentellen Ergebnissen besteht. Die negative-inotrope Gruppe zeigte im Verlauf deutlichere Verbesserungen hinsichtlich der linksventrikulären Pumpfunktion (LVEF) und Verminderung der linksventrikulären Dilatation. Beide Gruppen profitieren von der Immunadsorption, betrachtet man die klinische Einschätzung der Herzinsuffizienz (NYHA-Stadien) und Spiroergometriedaten. Ältere Patienten konnten nach Immunadsorption einen stärkeren Anstieg der LVEF verzeichnen als Jüngere. Es wurden Hinweise gefunden, dass eine kurze Krankheitsdauer eine schlechtere LVEF und einen höheren kardiodepres-

siven Effekt mit sich bringt. Außerdem scheint ein initial hoher Inflamationsgrad (MHC-II-Grad) einen nur geringen LVEF-Anstieg im Verlauf zu bewirken. Es wurden kein Einfluss des Geschlechtes oder einer Virusinfektion auf den Verlauf klinischer und experimenteller Parameter nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass eine erneut zunehmende negative Inotropie nach 12 Monaten beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation belegen den positiven Effekt der Immunadsorption auf die klinische Entwicklung von DCM-Patienten vor allem in Form von verbesserter Herzinsuffizienzsymptomatik sowie gesteigerter linksventrikulärer Pumpfunktion über einen Zeitraum von einem Jahr, dies gilt vor allem für Patienten mit zuvor negativ-inotrop wirkenden Autoantikörpern.

7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den 21.06.2013

Susanne Pohle

8 Danksagung

Ich danke dem Chefarzt der Klinik für Innere Medizin B, Herrn Prof. Dr. med. Stephan B. Felix sowie meinem früheren Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. med. Alexander Staudt für das Überlassen des Themas, die Möglichkeit dieser Dissertation sowie das Vertrauen in meine selbstständige Arbeit, welche sie mir stets entgegengebracht haben. Ich danke Herrn PD Dr. med. Alexander Riad für die hilfreichen Kritiken und Ratschläge im Rahmen der Fertigstellung dieser Dissertation.

Ich danke den Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors für die wunderbare Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank Frau Sandra Grugel, Frau Claudia Zymelka und Frau Brita Püschel. Für ihre außerordentliche Unterstützung danke ich Frau Dr. rer. med. Christiane Trimpert, welche mich in wissenschaftliches Arbeiten angelernt und die mit ihrer konstruktiven Kritik die Arbeit vorangebracht hat. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Lars Herda für die erste Durchsicht der Arbeit und seine Anmerkungen.

Ich möchte mich bei meinen Eltern, meiner Schwester sowie meinen langjährigen Freunden für die Unterstützung während dieser Promotionsarbeit und meines Studiums bedanken.

9 Literaturverzeichnis

1. McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83: 596-602, 2000.
2. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
3. Pankuweit S, Richter A, Ruppert V, Funck R, Maisch B. [Classification, genetic predisposition and risk factors for the development of cardiomyopathies]. *Internist (Berl)* 49: 441-7, 2008.
4. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
5. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 44: 672-3, 1980.
6. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
7. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
8. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.

9. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 29: 270-6, 2008.
10. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
11. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-2, 1996.
12. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
13. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Deng MC, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult heart transplant report--2005. *J Heart Lung Transplant* 24: 945-55, 2005.
14. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ, III. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 80: 564-72, 1989.
15. McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, Granger CB, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Yusuf S, Pfeffer MA. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet* 362: 767-71, 2003.
16. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
17. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 331:

- 1564-75, 1994.
18. Unverferth DV, Magorien RD, Moeschberger ML, Baker PB, Fetters JK, Leier CV. Factors influencing the one-year mortality of dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 54: 147-52, 1984.
 19. Komajda M, Jais JP, Reeves F, Goldfarb B, Bouhour JB, Juillieres Y, Lanfranchi J, Peycelon P, Geslin P, Carrie D, . Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 11: 824-31, 1990.
 20. Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation* 98: 2334-51, 1998.
 21. McNamara DM, Starling RC, Cooper LT, Boehmer JP, Mather PJ, Janosko KM, Gorcsan J, III, Kip KE, Dec GW. Clinical and demographic predictors of outcomes in recent onset dilated cardiomyopathy: results of the IMAC (Intervention in Myocarditis and Acute Cardiomyopathy)-2 study. *J Am Coll Cardiol* 58: 1112-8, 2011.
 22. McNamara DM, Starling RC, Cooper LT, Boehmer JP, Mather PJ, Janosko KM, Gorcsan J, III, Kip KE, Dec GW. Clinical and demographic predictors of outcomes in recent onset dilated cardiomyopathy: results of the IMAC (Intervention in Myocarditis and Acute Cardiomyopathy)-2 study. *J Am Coll Cardiol* 58: 1112-8, 2011.
 23. Grunig E, Benz A, Mereles D, Unnebrink K, Kucherer H, Haass M, Kubler W, Katus HA. Prognostic value of serial cardiac assessment and familial screening in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 5: 55-62, 2003.
 24. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
 25. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 45: 969-81, 2005.
 26. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94: 488-509, 2005.
 27. Hershberger RE, Cowan J, Morales A, Siegfried JD. Progress with genetic cardiomyopathies: screening, counseling, and testing in dilated, hypertrophic, and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2: 253-61, 2009.
 28. R.H.Swanton, Shrilla Banerjee. Swanton`s Cardiology. 6. ed. Wiley-Blackwell, 2008.
 29. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 331: 1564-75, 1994.

30. Bielecka-Dabrowa A, Wierzbicka M, Dabrowa M, Goch A. New methods in laboratory diagnostics of dilated cardiomyopathy. *Cardiol J* 15: 388-95, 2008.
31. Elliott P. Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart* 84: 106-12, 2000.
32. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
33. Elliott P. Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart* 84: 106-12, 2000.
34. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
35. Elliott P. Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart* 84: 106-12, 2000.
36. Henry WL, Gardin JM, Ware JH. Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age. *Circulation* 62: 1054-61, 1980.
37. Cohn JN, Johnson GR, Shabetai R, Loeb H, Tristani F, Rector T, Smith R, Fletcher R. Ejection fraction, peak exercise oxygen consumption, cardiothoracic ratio, ventricular arrhythmias, and plasma norepinephrine as determinants of prognosis in heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 87: VI5-16, 1993.
38. Juilliere Y, Barbier G, Feldmann L, Grentzinger A, Danchin N, Cherrier F. Additional predictive value of both left and right ventricular ejection fractions on long-term survival in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 18: 276-80, 1997.
39. La VL, Paccanaro M, Bonanno C, Varotto L, Ometto R, Vincenzi M. Left ventricular versus biventricular dysfunction in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 83: 120-2, A9, 1999.
40. McNamara DM, Starling RC, Cooper LT, Boehmer JP, Mather PJ, Janosko KM, Gorcsan J, III, Kip KE, Dec GW. Clinical and demographic predictors of outcomes in recent onset dilated cardiomyopathy: results of the IMAC (Intervention in Myocarditis and Acute Cardiomyopathy)-2 study. *J Am Coll Cardiol* 58: 1112-8, 2011.
41. McNamara DM, Starling RC, Cooper LT, Boehmer JP, Mather PJ, Janosko

- KM, Gorcsan J, III, Kip KE, Dec GW. Clinical and demographic predictors of outcomes in recent onset dilated cardiomyopathy: results of the IMAC (Intervention in Myocarditis and Acute Cardiomyopathy)-2 study. *J Am Coll Cardiol* 58: 1112-8, 2011.
42. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 50: 1914-31, 2007.
43. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 50: 1914-31, 2007.
44. 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* 312: 885-90, 1985.
45. Bettencourt PM. Clinical usefulness of B-type natriuretic peptide measurement: present and future perspectives. *Heart* 91: 1489-94, 2005.
46. Angermann CE, Ertl G. [Natriuretic peptides--new diagnostic markers in heart disease]. *Herz* 29: 609-17, 2004.
47. Ishikawa C, Tsutamoto T, Fujii M, Sakai H, Tanaka T, Horie M. Prediction of mortality by high-sensitivity C-reactive protein and brain natriuretic peptide in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J* 70: 857-63, 2006.
48. Nellessen U, Goder S, Schobre R, Abawi M, Hecker H, Tschoke S. Serial analysis of troponin I levels in patients with ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 29: 219-24, 2006.
49. Miller WL, Hartman KA, Burritt MF, Grill DE, Rodeheffer RJ, Burnett JC, Jr., Jaffe AS. Serial biomarker measurements in ambulatory patients with chronic heart failure: the importance of change over time. *Circulation* 116: 249-57, 2007.
50. Sato Y, Yamada T, Taniguchi R, Nagai K, Makiyama T, Okada H, Kataoka K, Ito H, Matsumori A, Sasayama S, Takatsu Y. Persistently increased serum concentrations of cardiac troponin t in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy are predictive of adverse outcomes. *Circulation* 103: 369-74, 2001.
51. Gibbons RJ, Balady GJ, Beasley JW, Bricker JT, Duvernoy WF, Froelicher VF, Mark DB, Marwick TH, McCallister BD, Thompson PD, Jr., Winters WL, Yanowitz FG, Ritchie JL, Gibbons RJ, Cheitlin MD, Eagle KA, Gardner TJ,

- Garson A, Jr., Lewis RP, O'Rourke RA, Ryan TJ. ACC/AHA Guidelines for Exercise Testing. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Exercise Testing). *J Am Coll Cardiol* 30: 260-311, 1997.
52. Martin SB, Morrow JR, Jr., Jackson AW, Dunn AL. Variables related to meeting the CDC/ACSM physical activity guidelines. *Med Sci Sports Exerc* 32: 2087-92, 2000.
53. Fleg JL, Pina IL, Balady GJ, Chaitman BR, Fletcher B, Lavie C, Limacher MC, Stein RA, Williams M, Bazzarre T. Assessment of functional capacity in clinical and research applications: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation* 102: 1591-7, 2000.
54. Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, Froelicher VF, Leon AS, Pina IL, Rodney R, Simons-Morton DA, Williams MA, Bazzarre T. Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 104: 1694-740, 2001.
55. Morris CK, Ueshima K, Kawaguchi T, Hideg A, Froelicher VF. The prognostic value of exercise capacity: a review of the literature. *Am Heart J* 122: 1423-31, 1991.
56. Weber KT, Janicki JS, McElroy PA. Determination of aerobic capacity and the severity of chronic cardiac and circulatory failure. *Circulation* 76: VI40-VI45, 1987.
57. Wonisch M, Fruhwald FM, Hofmann P, Hödl R, Klein W, Kraxner W, Maier R, Pokan R. Spiroergometrie in der Kardiologie - Klinische Anwendungsmöglichkeiten. *Austrian Journal of Cardiology* 440-6, 2003.
58. Weber KT, Janicki JS, McElroy PA. Determination of aerobic capacity and the severity of chronic cardiac and circulatory failure. *Circulation* 76: VI40-VI45, 1987.
59. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem* 278: 444-53, 2003.
60. Hobai IA, O'Rourke B. Enhanced Ca^{2+} -activated Na^{+} - Ca^{2+} exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res* 87: 690-8, 2000.
61. Hobai IA, O'Rourke B. Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation* 103: 1577-84, 2001.
62. Hosenpud JD, Campbell SM, Mendelson DJ. Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant* 8: 460-4, 1989.

63. Rapundalo ST. Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 38: 559-88, 1998.
64. 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* 89: 1320-4, 1992.
65. Rapundalo ST. Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 38: 559-88, 1998.
66. Simmerman HK, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-47, 1998.
67. Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 264: 11468-74, 1989.
68. Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res* 76: 1028-35, 1995.
69. Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J. Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 279: 40827-34, 2004.
70. Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29: 265-72, 1997.
71. Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J. Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 279: 40827-34, 2004.
72. Kirchhefer U, Baba HA, Boknik P, Breeden KM, Mavila N, Bruchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, paoli-Roach AA, Neumann J. Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res* 68: 98-108, 2005.
73. Bruchert N, Mavila N, Boknik P, Baba HA, Fabritz L, Gergs U, Kirchhefer U, Kirchhof P, Matus M, Schmitz W, paoli-Roach AA, Neumann J. Inhibitor-2 prevents protein phosphatase 1-induced cardiac hypertrophy and mortality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1539-H1546, 2008.
74. Towbin JA, Bowles KR, Bowles NE. Etiologies of cardiomyopathy and heart failure. *Nat Med* 5: 266-7, 1999.
75. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-2, 1996.

76. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-2, 1996.
77. Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesebro JH, Tazelaar HD. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326: 77-82, 1992.
78. Schonberger J, Seidman CE. Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 69: 249-60, 2001.
79. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104: 557-67, 2001.
80. Mestroni L, Rocco C, Gregori D, Sinagra G, Di LA, Miodini S, Vatta M, Pinamonti B, Muntoni F, Caforio AL, McKenna WJ, Falaschi A, Giacca M, Camerini. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. *J Am Coll Cardiol* 34: 181-90, 1999.
81. Baig MK, Goldman JH, Caforio AL, Coonar AS, Keeling PJ, McKenna WJ. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J Am Coll Cardiol* 31: 195-201, 1998.
82. Osterziel KJ, Hassfeld S, Geier C, Perrot A. [Familial dilated cardiomyopathy]. *Herz* 30: 529-34, 2005.
83. Taylor MR, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis* 1: 27, 2006.
84. Osterziel KJ, Hassfeld S, Geier C, Perrot A. [Familial dilated cardiomyopathy]. *Herz* 30: 529-34, 2005.
85. Poller W, Kuhl U, Tschoepe C, Pauschinger M, Fechner H, Schultheiss HP. Genome-environment interactions in the molecular pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 83: 579-86, 2005.
86. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 280: 750-2, 1998.
87. Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, Benaiche A, Conraads V, Sylvius N, Komajda M. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *Eur Heart J* 26: 794-803, 2005.
88. Osterziel KJ, Perrot A. Dilated cardiomyopathy: more genes means more phenotypes. *Eur Heart J* 26: 751-4, 2005.
89. Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. Car-

- diovasc Res 37: 279-89, 1998.
90. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 566-77, 2003.
 91. Haghghi K, Schmidt AG, Hoit BD, Brittsan AG, Yatani A, Lester JW, Zhai J, Kimura Y, Dorn GW, MacLennan DH, Kranias EG. Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. *J Biol Chem* 276: 24145-52, 2001.
 92. Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz* 27: 683-90, 2002.
 93. Forleo C, Sorrentino S, Guida P, Romito R, De TE, Iacoviello M, Pitzalis M. Beta1- and beta2-adrenergic receptor polymorphisms affect susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 8: 589-95, 2007.
 94. Podlowski S, Wenzel K, Luther HP, Muller J, Bramlage P, Baumann G, Felix SB, Speer A, Hetzer R, Kopke K, Hoehe MR, Wallukat G. Beta1-adrenoceptor gene variations: a role in idiopathic dilated cardiomyopathy? *J Mol Med* 78: 87-93, 2000.
 95. 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* 312: 885-90, 1985.
 96. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 343: 1388-98, 2000.
 97. Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res* 60: 5-10, 2003.
 98. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 99: 1091-100, 1999.
 99. Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res* 60: 5-10, 2003.
 100. Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res* 60: 5-10, 2003.
 101. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 104: 1076-82, 2001.
 102. Baboonian C, Treasure T. Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart* 78: 539-43, 1997.
 103. Kandolf R, Ameis D, Kirschner P, Canu A, Hofschneider PH. In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: an approach to the diagnosis of viral heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6272-6, 1987.

104. Noutsias M, Fechner H, de JH, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 104: 275-80, 2001.
105. Bergelson JM. Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem Pharmacol* 57: 975-9, 1999.
106. Zhang S, Jia HB, Gong BS, Zhang SJ, Li X, Yu B. Role of coxsackievirus and adenovirus receptor in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy and its influencing factor. *Chin Med J (Engl)* 121: 1445-9, 2008.
107. Miteva K, Haag M, Peng J, Savvatis K, Becher PM, Seifert M, Warstat K, Westermann D, Ringe J, Sittlinger M, Schultheiss HP, Tschope C, van LS. Human cardiac-derived adherent proliferating cells reduce murine acute Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *PLoS One* 6: e28513, 2011.
108. Martino TA, Petric M, Brown M, Aitken K, Gauntt CJ, Richardson CD, Chow LH, Liu PP. Cardiovirulent coxsackieviruses and the decay-accelerating factor (CD55) receptor. *Virology* 244: 302-14, 1998.
109. Yuan JP, Zhao W, Wang HT, Wu KY, Li T, Guo XK, Tong SQ. Coxsackievirus B3-induced apoptosis and caspase-3. *Cell Res* 13: 203-9, 2003.
110. Huber SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 45: 579-87, 2000.
111. Li HY, Li YH, Zhu TJ. [The expression of coxsackie B virus adenovirus receptor (CAR) in viral myocarditis and dilated cardiomyopathy patients]. *Fa Yi Xue Za Zhi* 23: 247-9, 2007.
112. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kuhl U. Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit* 3: 127-35, 2003.
113. Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol* 34: 497-503, 2003.
114. Kuhl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 108: 945-50, 2003.
115. Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 112: 1965-70, 2005.
116. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 99: 1091-100, 1999.

117. Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* 12: 1255-65, 1998.
118. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 104: 1076-82, 2001.
119. Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K. Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenetic relevance. *Circulation* 87: IV49-IV65, 1993.
120. 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* 89: 1320-4, 1992.
121. Pinsky DJ, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J Clin Invest* 95: 677-85, 1995.
122. Woodley SL, McMillan M, Shelby J, Lynch DH, Roberts LK, Ensley RD, Barry WH. Myocyte injury and contraction abnormalities produced by cytotoxic T lymphocytes. *Circulation* 83: 1410-8, 1991.
123. Seko Y, Ishiyama S, Nishikawa T, Kasajima T, Hiroe M, Kagawa N, Osada K, Suzuki S, Yagita H, Okumura K, . Restricted usage of T cell receptor V alpha-V beta genes in infiltrating cells in the hearts of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 96: 1035-41, 1995.
124. Rose NR, Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 80: S92-S99, 1996.
125. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323: 236-41, 1990.
126. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 72: 561-6, 1994.
127. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G, Visioli O. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 92: 1479-86, 1995.
128. Hosenpud JD, Campbell SM, Mendelson DJ. Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant* 8: 460-4, 1989.
129. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 75: 295-300, 1996.

130. Caforio AL, Bonifacio E, Stewart JT, Neglia D, Parodi O, Bottazzo GF, McKenna WJ. Novel organ-specific circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 15: 1527-34, 1990.
131. Caforio AL, Goldman JH, Haven AJ, Baig KM, Libera LD, McKenna WJ. Circulating cardiac-specific autoantibodies as markers of autoimmunity in clinical and biopsy-proven myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *Eur Heart J* 18: 270-5, 1997.
132. Caforio AL, Goldman JH, Baig MK, Haven AJ, Dalla LL, Keeling PJ, McKenna WJ. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression. *Heart* 77: 62-7, 1997.
133. Caforio AL, Goldman JH, Haven AJ, Baig KM, McKenna WJ. Evidence for autoimmunity to myosin and other heart-specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy and their relatives. *Int J Cardiol* 54: 157-63, 1996.
134. Li Y, Heuser JS, Cunningham LC, Kosanke SD, Cunningham MW. Mimicry and antibody-mediated cell signaling in autoimmune myocarditis. *J Immunol* 177: 8234-40, 2006.
135. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291: 319-22, 2001.
136. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9: 1477-83, 2003.
137. Staudt Y, Trimpert C, Birkenmeier K, Krieg T, Bemann T, Beug D, Felix SB, Staudt A. Effects of antibodies obtained from patients with dilated cardiomyopathy on the function of isolated rat hearts. *Eur J Clin Invest* 36: 85-90, 2006.
138. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9: 1477-83, 2003.
139. Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, Schiaffino S. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 85: 1734-42, 1992.
140. Neumann DA, Burek CL, Baughman KL, Rose NR, Herskowitz A. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 16: 839-46, 1990.
141. Shmilovich H, Danon A, Binah O, Roth A, Chen G, Wexler D, Keren G, George J. Autoantibodies to cardiac troponin I in patients with idiopathic dilated and ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 117: 198-203, 2007.

142. Latif N, Baker CS, Dunn MJ, Rose ML, Brady P, Yacoub MH. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting. *J Am Coll Cardiol* 22: 1378-84, 1993.
143. Baba A, Yoshikawa T, Ogawa S. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 40: 1153-9, 2002.
144. Schulze K, Becker BF, Schauer R, Schultheiss HP. Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function. *Circulation* 81: 959-69, 1990.
145. Pohlner K, Portig I, Pankuweit S, Lottspeich F, Maisch B. Identification of mitochondrial antigens recognized by antibodies in sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. *Am J Cardiol* 80: 1040-5, 1997.
146. Pohlner K, Portig I, Pankuweit S, Lottspeich F, Maisch B. Identification of mitochondrial antigens recognized by antibodies in sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. *Am J Cardiol* 80: 1040-5, 1997.
147. 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* 99: 649-54, 1999.
148. Fu ML. Anti-M2 muscarinic receptor autoantibodies and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 54: 127-35, 1996.
149. Shmilovich H, Danon A, Binah O, Roth A, Chen G, Wexler D, Keren G, George J. Autoantibodies to cardiac troponin I in patients with idiopathic dilated and ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 117: 198-203, 2007.
150. Kuhl U, Melzner B, Schafer B, Schultheiss HP, Strauer BE. The Ca-channel as cardiac autoantigen. *Eur Heart J* 12 Suppl D: 99-104, 1991.
151. Portig I, Pankuweit S, Maisch B. Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2245-51, 1997.
152. 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* 89: 2760-7, 1994.
153. 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* 123: 967-70, 1992.
154. 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* 27: 397-406, 1995.
155. 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* 46: S634-S639, 1987.
 156. 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* 27: 397-406, 1995.
 157. Staudt Y, Mobini R, Fu M, Felix SB, Kuhn JP, Staudt A. Beta1-adrenoceptor antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 466: 1-6, 2003.
 158. Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 91: 1964-8, 1993.
 159. Fu ML, Hoebeke J, Matsui S, Matoba M, Magnusson Y, Hedner T, Herlitz H, Hjalmarson A. Autoantibodies against cardiac G-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension. *Clin Immunol Immunopathol* 72: 15-20, 1994.
 160. Zhao R, Wang W, Wu B, Hoebeke J, Hjalmarson A, Fu ML. Effects of anti-peptide antibodies against the second extracellular loop of human M2 muscarinic acetylcholine receptors on transmembrane potentials and currents in guinea pig ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem* 163-164: 185-93, 1996.
 161. Schultheiss HP, Kuhl U, Janda I, Melzner B, Ulrich G, Morad M. Antibody-mediated enhancement of calcium permeability in cardiac myocytes. *J Exp Med* 168: 2105-19, 1988.
 162. Schultheiss HP, Bolte HD. Immunological analysis of auto-antibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 17: 603-17, 1985.
 163. Okazaki T, Honjo T. Pathogenic roles of cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *Trends Mol Med* 11: 322-6, 2005.
 164. Khoynezhad A. Promising aspects and caveats of studies on anti-apoptotic therapies in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 9: 120-3, 2007.
 165. Staudt A, Eichler P, Trimpert C, Felix SB, Greinacher A. Fc(gamma) receptors IIa on cardiomyocytes and their potential functional relevance in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 49: 1684-92, 2007.
 166. Staudt A, Staudt Y, Dorr M, Bohm M, Knebel F, Hummel A, Wunderle L, Tiburcy M, Wernecke KD, Baumann G, Felix SB. Potential role of humoral immunity in cardiac dysfunction of patients suffering from dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 44: 829-36, 2004.

167. Staudt A, Bohm M, Knebel F, Grosse Y, Bischoff C, Hummel A, Dahm JB, Borges A, Jochmann N, Wernecke KD, Wallukat G, Baumann G, Felix SB. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 106: 2448-53, 2002.
168. Warraich RS, Dunn MJ, Yacoub MH. Subclass specificity of autoantibodies against myosin in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: pro-inflammatory antibodies in DCM patients. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 255-61, 1999.
169. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 29: 2388-442, 2008.
170. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med* 316: 1429-35, 1987.
171. Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 344: 1651-8, 2001.
172. Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest* 113: 1379-82, 2004.
173. 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* 36: 1280-7, 2000.
174. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709-17, 1999.
175. Zannad F, McMurray JJ, Drexler H, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pitt B. Rationale and design of the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Eur J Heart Fail* 12: 617-22, 2010.
176. Wrenger E, Muller R, Moesenthin M, Welte T, Frolich JC, Neumann KH. Interaction of spironolactone with ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers: analysis of 44 cases. *BMJ* 327: 147-9, 2003.
177. Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS, Kopp A, Austin PC, Laupacis A, Redelmeier DA. Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med* 351: 543-51, 2004.

178. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 107: 857-63, 2003.
179. Skudicky D, Bergemann A, Sliwa K, Candy G, Sareli P. Beneficial effects of pentoxifylline in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and carvedilol: results of a randomized study. *Circulation* 103: 1083-8, 2001.
180. Deswal A, Bozkurt B, Seta Y, Parilti-Eiswirth S, Hayes FA, Blosch C, Mann DL. Safety and efficacy of a soluble P75 tumor necrosis factor receptor (Enbrel, etanercept) in patients with advanced heart failure. *Circulation* 99: 3224-6, 1999.
181. Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L, Krum H, Liu P, Nieminen M, Tavazzi L, van Veldhuisen DJ, Waldenstrom A, Warren M, Westheim A, Zannad F, Fleming T. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation* 109: 1594-602, 2004.
182. Yoshikawa T, Baba A, Nagatomo Y. Autoimmune Mechanisms Underlying Dilated Cardiomyopathy. *Circ J* 2009.
183. Brunkhorst R, Koch K-M, Koll R. Klinische Immunadsorption. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, p. 13-16, 2000.
184. Kessler SW. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol* 115: 1617-24, 1975.
185. 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* 54: 191-5, 1996.
186. Dorffel WV, Felix SB, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, Kleber FX, Baumann G, Reinke P. Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95: 1994-7, 1997.
187. André A. Kaplan. Toward the Rational Prescription of Therapeutic Plasma Exchange: The Kinetics of Immunoglobulin Removal. *Seminars in Dialysis* 5: 227-9, 1992.
188. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 291: 484-6, 2001.
189. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 103: 2681-6, 2001.
190. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J*

- Med 326: 107-16, 1992.
191. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 35: 1590-8, 2000.
 192. 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* 101: 385-91, 2000.
 193. Staudt A, Hummel A, Ruppert J, Dorr M, Trimpert C, Birkenmeier K, Krieg T, Staudt Y, Felix SB. Immunoadsorption in dilated cardiomyopathy: 6-month results from a randomized study. *Am Heart J* 152: 712-6, 2006.
 194. 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* 97: 517-20, 2004.
 195. Matsui S, Larsson L, Hayase M, Katsuda S, Teraoka K, Kurihara T, Murano H, Nishikawa K, Fu M. Specific removal of beta1-adrenoceptor autoantibodies by immunoabsorption in rabbits with autoimmune cardiomyopathy improved cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol* 41: 78-85, 2006.
 196. Wallukat G, Muller J, Hetzer R. Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 347: 1806, 2002.
 197. Mobini R, Staudt A, Felix SB, Baumann G, Wallukat G, Deinum J, Svensson H, Hjalmarson A, Fu M. Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta1-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 20: 345-50, 2003.
 198. Gurland HJ, Lysaght MJ, Samtleben W. Immunomodulation: clinical aspects. *Artif Organs* 10: 122-7, 1986.
 199. Braun N, Erley C, Klein R, Kotter I, Saal J, Risler T. Immunoadsorption onto protein A induces remission in severe systemic lupus erythematosus. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1367-72, 2000.
 200. Braun N, Risler T. Immunoadsorption as a tool for the immunomodulation of the humoral and cellular immune system in autoimmune disease. *Ther Apher* 3: 240-5, 1999.
 201. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 103: 2681-6, 2001.
 202. Vangelista A, Frasca GM, Nanni-Costa A, Bonomini V. Effect of plasmapheresis on E-rosette receptors in SLE patients. *J Clin Apher* 3: 100-2, 1986.

203. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113: 1807-16, 2006.
204. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Lung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14: 803-69, 2012.
205. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94: 488-509, 2005.
206. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Lung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14: 803-69, 2012.
207. Douglas PS, Khandheria B, Stainback RF, Weissman NJ, Brindis RG, Patel MR, Khandheria B, Alpert JS, Fitzgerald D, Heidenreich P, Martin ET, Messer JV, Miller AB, Picard MH, Raggi P, Reed KD, Rumsfeld JS, Steimle AE, Tonkovic R, Vijayaraghavan K, Weissman NJ, Yeon SB, Brindis RG, Douglas PS, Hendel RC, Patel MR, Peterson E, Wolk MJ, Allen JM. ACCF/AHA/ACEP/ASNC/SCAI/SCCT/SCMR 2007 appropriateness criteria for

- transthoracic and transesophageal echocardiography: a report of the American College of Cardiology Foundation Quality Strategic Directions Committee Appropriateness Criteria Working Group, American Society of Echocardiography, American College of Emergency Physicians, American Society of Nuclear Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Cardiovascular Computed Tomography, and the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance endorsed by the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine. *J Am Coll Cardiol* 50: 187-204, 2007.
208. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol* 18: 619-24, 1987.
209. Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr JJ, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* 193: 101-7, 2004.
210. Feeley KM, Harris J, Suvarna SK. Necropsy diagnosis of myocarditis: a retrospective study using CD45RO immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 53: 147-9, 2000.
211. Felix SB, Staudt A, Landsberger M, Grosse Y, Stangl V, Spielhagen T, Wallukat G, Wernecke KD, Baumann G, Stangl K. Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol* 39: 646-52, 2002.
212. Staudt A, Dorr M, Staudt Y, Bohm M, Probst M, Empen K, Plotz S, Maschke HE, Hummel A, Baumann G, Felix SB. Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy: results from protein A immunoadsorption. *Am Heart J* 150: 729-36, 2005.
213. Powell T, Terrar DA, Twist VW. Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J Physiol* 302: 131-53, 1980.
214. Piper HMVAaSP. Berlin, Heidelberg: p. 36-60, 1992.
215. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94: 488-509, 2005.
216. Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz* 25: 200-9, 2000.
217. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94: 488-509, 2005.
218. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94: 488-509, 2005.
219. Buck T, Breithardt L, Faber W, Fehske F, Flachskampf FA. Manual zur Indikation und Durchführung der Echokardiographie, Leitlinie der DGK. *Clin Res*

- Cardiol Suppl , 3-51. 2009.
Ref Type: Magazine Article
220. Voelker W. [A structured report data set for documentation of echocardiographic studies--Update 2004]. *Z Kardiol* 93: 987-1004, 2004.
221. Hollmann W, Struder HK, Predel HG. Spiroergometrie. Kardiopulmonale Leistungsdiagnostik des Gesunden und Kranken. Stuttgart: Schattauer, 2006.
222. Kindermann W. Die maximale Sauerstoffaufnahme. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 55, 161-162. 1999.
Ref Type: Magazine Article
223. Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* 12: 1255-65, 1998.
224. Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K. Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenetic relevance. *Circulation* 87: IV49-IV65, 1993.
225. 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* 89: 1320-4, 1992.
226. Latif N, Baker CS, Dunn MJ, Rose ML, Brady P, Yacoub MH. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting. *J Am Coll Cardiol* 22: 1378-84, 1993.
227. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 64: 97-103, 1989.
228. Fu ML. Anti-M2 muscarinic receptor autoantibodies and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 54: 127-35, 1996.
229. Schultheiss HP, Kuhl U, Janda I, Melzner B, Ulrich G, Morad M. Antibody-mediated enhancement of calcium permeability in cardiac myocytes. *J Exp Med* 168: 2105-19, 1988.
230. Schulze K, Becker BF, Schultheiss HP. Antibodies to the ADP/ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo. *Circ Res* 64: 179-92, 1989.
231. Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, Schiaffino S. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 85: 1734-42, 1992.
232. Schulze K, Becker BF, Schauer R, Schultheiss HP. Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair car-

- diac function. *Circulation* 81: 959-69, 1990.
233. Fu ML, Schulze W, Wallukat G, Hjalmarson A, Hoebeke J. A synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the human M2 acetylcholine receptor induces pharmacological and morphological changes in cardiomyocytes by active immunization after 6 months in rabbits. *Clin Immunol Immunopathol* 78: 203-7, 1996.
234. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G. Hemodynamic effects of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 35: 1590-8, 2000.
235. Ren J, Walsh MF, Hamaty M, Sowers JR, Brown RA. Altered inotropic response to IGF-I in diabetic rat heart: influence of intracellular Ca²⁺ and NO. *Am J Physiol* 275: H823-H830, 1998.
236. Ravens U, Davia K, Davies CH, O'Gara P, Drake-Holland AJ, Hynd JW, Noble MI, Harding SE. Tachycardia-induced failure alters contractile properties of canine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 32: 613-21, 1996.
237. Ren J, Walsh MF, Hamaty M, Sowers JR, Brown RA. Altered inotropic response to IGF-I in diabetic rat heart: influence of intracellular Ca²⁺ and NO. *Am J Physiol* 275: H823-H830, 1998.
238. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-50, 1985.
239. Tsien RY, Rink TJ, Poenie M. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6: 145-57, 1985.
240. Okazaki T, Honjo T. Pathogenic roles of cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *Trends Mol Med* 11: 322-6, 2005.
241. Schulze K, Becker BF, Schultheiss HP. Antibodies to the ADP/ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo. *Circ Res* 64: 179-92, 1989.
242. Latif N, Baker CS, Dunn MJ, Rose ML, Brady P, Yacoub MH. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting. *J Am Coll Cardiol* 22: 1378-84, 1993.
243. Caforio AL, Keeling PJ, Zachara E, Mestroni L, Camerini F, Mann JM, Bottazzo GF, McKenna WJ. Evidence from family studies for autoimmunity in dilated cardiomyopathy. *Lancet* 344: 773-7, 1994.
244. Baba A. Autoantigen estimation and simple screening assay against cardio-depressant autoantibodies in patients with dilated cardiomyopathy. *Ther Apher Dial* 12: 109-16, 2008.

245. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med* 326: 107-16, 1992.
246. Staudt A, Bohm M, Knebel F, Grosse Y, Bischoff C, Hummel A, Dahm JB, Borges A, Jochmann N, Wernecke KD, Wallukat G, Baumann G, Felix SB. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 106: 2448-53, 2002.
247. Staudt A, Bohm M, Knebel F, Grosse Y, Bischoff C, Hummel A, Dahm JB, Borges A, Jochmann N, Wernecke KD, Wallukat G, Baumann G, Felix SB. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 106: 2448-53, 2002.
248. Staudt A, Dorr M, Staudt Y, Bohm M, Probst M, Empen K, Plotz S, Maschke HE, Hummel A, Baumann G, Felix SB. Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy: results from protein A immunoadsorption. *Am Heart J* 150: 729-36, 2005.
249. Bruggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R, Waldmann H, Neuberger MS. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 166: 1351-61, 1987.
250. Staudt A, Eichler P, Trimpert C, Felix SB, Greinacher A. Fc(gamma) receptors IIa on cardiomyocytes and their potential functional relevance in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 49: 1684-92, 2007.
251. 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* 27: 397-406, 1995.
252. 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* 99: 649-54, 1999.
253. Fu ML, Hoebeke J, Matsui S, Matoba M, Magnusson Y, Hedner T, Herlitz H, Hjalmarson A. Autoantibodies against cardiac G-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension. *Clin Immunol Immunopathol* 72: 15-20, 1994.
254. 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* 27: 397-406, 1995.
255. Staudt A, Mobini R, Fu M, Grosse Y, Stangl V, Stangl K, Thiele A, Baumann G, Felix SB. beta(1)-Adrenoceptor antibodies induce positive inotropic response in isolated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 423: 115-9, 2001.
256. Staudt Y, Mobini R, Fu M, Felix SB, Kuhn JP, Staudt A. Beta1-adrenoceptor

- antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 466: 1-6, 2003.
257. Matsui S, Fu ML, Katsuda S, Hayase M, Yamaguchi N, Teraoka K, Kurihara T, Takekoshi N, Murakami E, Hoebeke J, Hjalmarson A. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 29: 641-55, 1997.
258. 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* 27: 397-406, 1995.
259. 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* 99: 649-54, 1999.
260. Staudt A, Bohm M, Knebel F, Grosse Y, Bischoff C, Hummel A, Dahm JB, Borges A, Jochmann N, Wernecke KD, Wallukat G, Baumann G, Felix SB. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 106: 2448-53, 2002.
261. 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* 27: 397-406, 1995.
262. Wallukat G, Morwinski R, Magnusson Y, Hoebeke J, Wollenberger A. [Autoantibodies against the beta 1-adrenergic receptor in myocarditis and dilated cardiomyopathy: localization of two epitopes]. *Z Kardiol* 81 Suppl 4: 79-83, 1992.
263. Muller J, Wallukat G, Weng YG, Dandel M, Spiegelsberger S, Semrau S, Brandes K, Theodoridis V, Loebe M, Meyer R, Hetzer R. Weaning from mechanical cardiac support in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96: 542-9, 1997.
264. Fukuda Y, Miyoshi S, Tanimoto K, Oota K, Fujikura K, Iwata M, Baba A, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Mitamura H, Ogawa S. Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces early afterdepolarization and decreases in K-channel density in rabbits. *J Am Coll Cardiol* 43: 1090-100, 2004.
265. Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Nakamura I, Wainai Y, Takahashi T, Ogawa S. Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces beta-adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* 88: 578-86, 2001.
266. Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 91: 1964-8, 1993.

267. Fu ML, Hoebeke J, Matsui S, Matoba M, Magnusson Y, Hedner T, Herlitz H, Hjalmarson A. Autoantibodies against cardiac G-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension. *Clin Immunol Immunopathol* 72: 15-20, 1994.
268. Zhao R, Wang W, Wu B, Hoebeke J, Hjalmarson A, Fu ML. Effects of anti-peptide antibodies against the second extracellular loop of human M2 muscarinic acetylcholine receptors on transmembrane potentials and currents in guinea pig ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem* 163-164: 185-93, 1996.
269. Wang WZ, Zhao RR, Wu BW, Jin XH, Zhu L, Hjalmarson A, Fu ML. Effects of anti-peptide antibodies against human M2 muscarinic receptors on cardiac function in rats in vivo. *Blood Press Suppl* 3: 25-7, 1996.
270. Fu ML, Hoebeke J, Matsui S, Matoba M, Magnusson Y, Hedner T, Herlitz H, Hjalmarson A. Autoantibodies against cardiac G-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension. *Clin Immunol Immunopathol* 72: 15-20, 1994.
271. Liu HR, Zhao RR, Zhi JM, Wu BW, Fu ML. Screening of serum autoantibodies to cardiac beta1-adrenoceptors and M2-muscarinic acetylcholine receptors in 408 healthy subjects of varying ages. *Autoimmunity* 29: 43-51, 1999.
272. Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, Muller J. Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz* 25: 261-6, 2000.
273. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104: 557-67, 2001.
274. Murphy RT, Mogensen J, Shaw A, Kubo T, Hughes S, McKenna WJ. Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 363: 371-2, 2004.
275. Solaro RJ, Rarick HM. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res* 83: 471-80, 1998.
276. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9: 1477-83, 2003.
277. Okazaki T, Honjo T. Pathogenic roles of cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *Trends Mol Med* 11: 322-6, 2005.
278. Landsberger M, Staudt A, Choudhury S, Trimpert C, Herda LR, Klingel K, Kandolf R, Schultheiss HP, Kroemer HK, Volker U, Felix SB. Potential role of antibodies against cardiac Kv channel-interacting protein 2 in dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 156: 92-9, 2008.
279. Goser S, Andrassy M, Buss SJ, Leuschner F, Volz CH, Ottl R, Zittrich S, Blaudeck N, Hardt SE, Pfitzer G, Rose NR, Katus HA, Kaya Z. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation* 114: 1693-702, 2006.

280. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9: 1477-83, 2003.
281. Vinzenz Hombach. Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie: Technik, Klinik, Therapie. Stuttgart: Schattauer Verlag, 2001, p. 400-410, 2001.
282. Janczewski AM, Lakatta EG. Thapsigargin inhibits Ca²⁺ uptake, and Ca²⁺ depletes sarcoplasmic reticulum in intact cardiac myocytes. *Am J Physiol* 265: H517-H522, 1993.
283. Hess ML, Greenfield LJ. Calcium entry blockers: potential applications in shock. *Adv Shock Res* 10: 15-25, 1983.
284. Felix SB, Stangl V, Pietsch P, Bramlage P, Staudt A, Bartel S, Krause EG, Borschke JU, Wernecke KD, Isenberg G, Baumann G. Soluble substances released from postischemic reperfused rat hearts reduce calcium transient and contractility by blocking the L-type calcium channel. *J Am Coll Cardiol* 37: 668-75, 2001.
285. Yoshikawa T, Baba A, Nagatomo Y. Autoimmune Mechanisms Underlying Dilated Cardiomyopathy. *Circ J* 2009.
286. Schultheiss HP, Kuhl U, Janda I, Melzner B, Ulrich G, Morad M. Antibody-mediated enhancement of calcium permeability in cardiac myocytes. *J Exp Med* 168: 2105-19, 1988.
287. Staudt Y, Mobini R, Fu M, Felix SB, Kuhn JP, Staudt A. Beta1-adrenoceptor antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 466: 1-6, 2003.
288. Liang CS, Mao W, Liu J. Pro-apoptotic effects of anti-beta1-adrenergic receptor antibodies in cultured rat cardiomyocytes: actions on endoplasmic reticulum and the prosurvival PI3K-Akt pathway. *Autoimmunity* 41: 434-41, 2008.
289. Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz* 27: 683-90, 2002.
290. 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* 116: 399-410, 2007.
291. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, Honjo T. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9: 1477-83, 2003.
292. Caforio AL, Goldman JH, Baig MK, Haven AJ, Dalla LL, Keeling PJ, McKenna WJ. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression. *Heart* 77: 62-7, 1997.

293. Yoshikawa T, Baba A, Nagatomo Y. Autoimmune Mechanisms Underlying Dilated Cardiomyopathy. *Circ J* 2009.
294. Berta E, Confalonieri P, Simoncini O, Bernardi G, Busnach G, Mantegazza R, Cornelio F, Antozzi C. Removal of antiacetylcholine receptor antibodies by protein-A immunoadsorption in myasthenia gravis. *Int J Artif Organs* 17: 603-8, 1994.
295. 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* 54: 191-5, 1996.
296. Dorffel WV, Felix SB, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, Kleber FX, Baumann G, Reinke P. Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95: 1994-7, 1997.
297. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 35: 1590-8, 2000.
298. Felix SB, Staudt A, Landsberger M, Grosse Y, Stangl V, Spielhagen T, Wallukat G, Wernecke KD, Baumann G, Stangl K. Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol* 39: 646-52, 2002.
299. Dorffel WV, Felix SB, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, Kleber FX, Baumann G, Reinke P. Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95: 1994-7, 1997.
300. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 35: 1590-8, 2000.
301. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 35: 1590-8, 2000.
302. Staudt A, Hummel A, Ruppert J, Dorr M, Trimpert C, Birkenmeier K, Krieg T, Staudt Y, Felix SB. Immunoadsorption in dilated cardiomyopathy: 6-month results from a randomized study. *Am Heart J* 152: 712-6, 2006.
303. Staudt A, Hummel A, Ruppert J, Dorr M, Trimpert C, Birkenmeier K, Krieg T, Staudt Y, Felix SB. Immunoadsorption in dilated cardiomyopathy: 6-month results from a randomized study. *Am Heart J* 152: 712-6, 2006.
304. Doesch AO, Konstandin M, Celik S, Kristen A, Frankenstein L, Hardt S, Goeser S, Kaya Z, Katus HA, Dengler TJ. Effects of protein A immunoadsorption

- in patients with advanced chronic dilated cardiomyopathy. *J Clin Apher* 24: 141-9, 2009.
305. Staudt A, Staudt Y, Hummel A, Empen K, Dorr M, Trimpert C, Birkenmeier K, Kuhl U, Noutsias M, Russ D, Felix SB. Effects of immunoadsorption on the nt-BNP and nt-ANP plasma levels of patients suffering from dilated cardiomyopathy. *Ther Apher Dial* 10: 42-8, 2006.
306. Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, Wikeby L, Andreassen AK, Ihlen H, Simonsen S, Kjekshus J, Nitter-Hauge S, Ueland T, Lien E, Froland SS, Aukrust P. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation* 103: 220-5, 2001.
307. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 103: 2681-6, 2001.
308. 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* 312: 885-90, 1985.
309. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 343: 1388-98, 2000.
310. Kuhl U, Noutsias M, Schultheiss HP. Immunohistochemistry in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 16 Suppl O: 100-6, 1995.
311. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wodniecki J, Szczurek-Katanski K, Nozynski J, Zembala M, Rozek MM. Immunohistological diagnosis of myocarditis. Potential role of sarcolemmal induction of the MHC and ICAM-1 in the detection of autoimmune mediated myocyte injury. *Eur Heart J* 19: 1564-72, 1998.
312. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kuhl U. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 99: 2124-31, 1999.
313. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 103: 2681-6, 2001.
314. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 103: 2681-6, 2001.
315. Maisch B, Richter A, Sandmoller A, Portig I, Pankuweit S. Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI). *Herz* 30: 535-44, 2005.
316. Malkiel S, Kuan AP, Diamond B. Autoimmunity in heart disease: mechanisms and genetic susceptibility. *Mol Med Today* 2: 336-42, 1996.

317. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 104: 1076-82, 2001.
318. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 72: 561-6, 1994.
319. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G, Visioli O. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 92: 1479-86, 1995.
320. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 27: 1201-6, 1996.
321. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 93: 704-11, 1996.
322. Mann DL. Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart. *Heart Fail Rev* 6: 71-80, 2001.
323. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 92: 2303-12, 1993.
324. 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* 101: 385-91, 2000.
325. 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* 101: 385-91, 2000.
326. Dorffel WV, Wallukat G, Dorffel Y, Felix SB, Baumann G. Immunoabsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J Cardiol* 97: 529-34, 2004.
327. Knebel F, Bohm M, Staudt A, Borges AC, Tepper M, Jochmann N, Wernicke KD, Felix S, Baumann G. Reduction of morbidity by immunoabsorption therapy in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 97: 517-20, 2004.
328. Staudt A, Staudt Y, Dorr M, Bohm M, Knebel F, Hummel A, Wunderle L, Tiburcy M, Wernecke KD, Baumann G, Felix SB. Potential role of humoral immunity in cardiac dysfunction of patients suffering from dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 44: 829-36, 2004.
329. 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* 101: 385-91, 2000.
330. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Soluble interleukin-2 receptor levels in

- patients with dilated cardiomyopathy. Correlation with disease severity and cardiac autoantibodies. *Circulation* 91: 631-4, 1995.
331. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 103: 2681-6, 2001.
 332. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 291: 484-6, 2001.
 333. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 291: 484-6, 2001.
 334. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med* 326: 107-16, 1992.
 335. Basta M. Modulation of complement-mediated immune damage by intravenous immune globulin. *Clin Exp Immunol* 104 Suppl 1: 21-5, 1996.
 336. Basta M, Van GF, Luccioli S, Billings EM, Vortmeyer AO, Baranyi L, Szebeni J, Alving CR, Carroll MC, Berkower I, Stojilkovic SS, Metcalfe DD. F(ab)'2-mediated neutralization of C3a and C5a anaphylatoxins: a novel effector function of immunoglobulins. *Nat Med* 9: 431-8, 2003.
 337. Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, Wikeby L, Andreassen AK, Ihlen H, Simonsen S, Kjekshus J, Nitter-Hauge S, Ueland T, Lien E, Froland SS, Aukrust P. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation* 103: 220-5, 2001.
 338. Cooper LT, Belohlavek M, Korinek J, Yoshifuku S, Sengupta PP, Burgstaler EA, Winters JL. A pilot study to assess the use of protein a immunoadsorption for chronic dilated cardiomyopathy. *J Clin Apher* 22: 210-4, 2007.
 339. McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, Dec GW, Loh E, Torre-Amione G, Gass A, Janosko K, Tokarczyk T, Kessler P, Mann DL, Feldman AM. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 103: 2254-9, 2001.