

Aus der Inneren Klinik B
des Universitätsklinikums der
Ernst-Moritz-Arndt- Universität Greifswald
Direktor Prof. Dr. med. Stephan B. Felix

**Negativ inotrope Effekte kardiotoxischer Antikörper bei Patienten mit
Dilatativer Kardiomyopathie**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des medizinischen Doktorgrades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2005

vorgelegt von:
Alexandra Kalisch
geb. am: 1.10.1975
in: Helmstedt

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. St. Felix

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Baumann

Ort, Raum: Klinik für Innere Medizin B Greifswald, Seminarraum (3. OG)

Tag der Disputation: 10.04.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis

2. Abbildungsverzeichnis

3. Tabellenverzeichnis

4. Einleitung

- 4.1. Dilatative Kardiomyopathie
- 4.2. Pathogenese der DCM
- 4.3. Klinik der DCM
- 4.4. Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bei DCM
- 4.5. Prognose und Therapie der DCM
- 4.6. Immunadsorption bei Dilatativer Kardiomyopathie
- 4.7. Aufgabenstellung

5. Material und Methoden

- 5.1. Material
 - 5.1.1. Puffer, Chemikalien und Wirkstoffe
- 5.2. Charakterisierung von DCM-Patienten und Kontrollpatienten
- 5.3. Tiere
- 5.4. Methoden
 - 5.4.1. Gewinnung und Bearbeitung der Antikörper
 - 5.4.1.1. Isolierung der Antikörper
 - 5.4.1.2. Aufarbeitung der Antikörper
 - 5.4.1.3. Behandlung des Eluates mit Protein A
 - 5.4.2. Isolierung von adulten Rattenkardiomyozyten
 - 5.4.2.1. Vorbereitung
 - 5.4.2.2. Organentnahme und Präparation
 - 5.4.2.3. Perfusion des Herzens während der Isolation
 - 5.4.2.4. Enzymatische Isolation

- 5.4.2.5. Zellzählung
- 5.4.2.6. Zellanheftung und Färbung
- 5.4.3. Messung von Kalziumtransient und Zellverkürzung
 - 5.4.3.1. Das Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)
 - 5.4.3.2. Versuchsablauf
 - 5.4.3.3. Auswertung der aufgezeichneten Messung
 - 5.4.3.4. Vergleich der einzelnen Subgruppen bei den DCM-Patienten

6. Ergebnisse

- 6.1. Effekte des Eluates
- 6.2. Vergleich der einzelnen Subgruppen bei den DCM-Patienten
 - 6.2.1. Einfluß des Geschlechts der DCM-Patienten auf den kardiodepressiven Effekt
 - 6.2.2. Einfluß des Alters der DCM-Patienten auf den kardiodepressiven Effekt
 - 6.2.3. Einfluß der Krankheitsdauer auf den kardiodepressiven Effekt
 - 6.2.4. Einfluß der LVEF der DCM-Patienten auf den kardiodepressiven Effekt
 - 6.2.5. Einfluß des LVEF-Verlaufes während des letzten Jahres

7. Diskussion

- 7.1. Kardiotrope Faktoren im Eluat
- 7.2. Kardiotrope Antikörper bei DCM
- 7.3. Vergleich von Kardiodepressivität und klinischen Befunden

8. Zusammenfassung

9. Literaturverzeichnis

10. Lebenslauf

11. Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

-ACE	Angiotensin converting enzyme
-ADP	Adenosindiphosphat
-Ao.kl.Wurzel	Aortenklappen-Wurzel
-ATP	Adenosintriphosphat
-AT-II	Angiotensin II
-BSA	Bovines Serum Albumin
-cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
-Ca ²⁺	Kalzium
-cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
-CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
-d	Durchmesser
-Da	Dalton
-DMSO	Dimethylsulfoxid
-ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
-HEPES	Hydroxy-Ethyl-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
-HF	Herzfrequenz
-HI	Herzindex
-HZV	Herzzeitvolumen
-IA	Immunadsorption
-Ig	Immunglobulin
-IL	Interleukin
-IP ₃	Inositoltriphosphat
-ISFC	International Society and Federation of Cardiology
-K	muskuläre Wandspannung
-LVEDD	linksventrikulärer-enddiastolischer Diameter
-LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
-LVESD	linksventrikulärer-endsystolischer Diameter
-M	mol/l
-MWCO	molecular weigth cut off
-NYHA	New York Heart Assoziation
-P	Ventrikellinnendruck

-PCr	Phosphokreatinin
-r	Ventrikelradius
-rfu	relative fluorescence units
-RIA	Radio-Immuno-Sorbent-Assay
-RNA	Ribonukleinsäure
-RVOT	rechtsventrikulärer Ausflußtrakt
-SERCA	sarkoendoplasmatische Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase
-SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
-SV	Schlagvolumen
-TNF	Tumornekrosefaktor
-WHO	World Health Organisation
-VP	Versuchspuffer

2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Änderung des Herzindex und des Schlagvolumenindex während der Immunadsorption
- Abbildung 2: Konzentrationsabhängige Änderung des Kalziumtransienten und der Verkürzung
- Abbildung 3: Korrelation zwischen der Steigerung des Herzindex und dem kardiodepressiven Effekt auf Kardiomyozyten
- Abbildung 4: Modifizierte Langendorffapparatur nach Powell und Piper
- Abbildung 5: Rattensitus nach Eröffnung des Thorax
- Abbildung 6: Lage der Perfusionskanüle in der Aorta
- Abbildung 7: Das konfokale Prinzip
- Abbildung 8: Lichtmikroskopische Ansicht der isolierten Rattenkardiomyozyten
- Abbildung 9: Aufzeichnung der Fluo-3-Fluoreszenz der Zelle mittels CLSM
- Abbildung 10: Originalregistrierung des Eluateffektes, dargestellt ist der Kalziumtransient einer Zelle, gemessen in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu)
- Abbildung 11: Ablauf des Auswertungsprozesses eines Kontraktionszyklus einer Zelle mit dem Programm Object-Image 1.62
- Abbildung 12: Vergleich des Kalziumtransienten und der Kontraktilität von DCM-Patienten und Kontrollgruppe nach Eluatzugabe ($p < 0,001$)
- Abbildung 13: Vergleich des Auftretens eines kardiodepressiven Effektes des Eluates auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität bei DCM-Patienten und Kontrollen (prozentualer Anteil der Gesamtzahl) ($p < 0,001$)
- Abbildung 14: Vergleich des Kalziumtransienten ($p = 0,176$) und der Kontraktilität ($p = 0,588$) bei den DCM-Patienten und DCM-Patientinnen
- Abbildung 15: Prozentualer Anteil eines kardiodepressiven Effektes auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität bei DCM-Patienten und – Patientinnen

- Abbildung 16: Einfluß des Eluates auf den Kalziumtransienten sowie auf die Kontraktilität bei DCM-Patienten, die jünger als 54 Jahre bzw. 54 Jahre und älter sind ($p=0,576$ bzw. $p=0,465$)
- Abbildung 17: Verteilung der kardiodepressiven Effekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität in Abhängigkeit vom Alter der DCM-Patienten
- Abbildung 18: Vergleich des Kalziumtransienten ($p=0,803$) und der Kontraktilität ($p=0,629$) bei den DCM-Patienten mit einer Erkrankungsdauer unter drei Jahre sowie von drei Jahren und länger
- Abbildung 19: Prozentualer Anteil der kardiodepressiven Effekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer
- Abbildung 20: Einfluß des Eluates auf den Kalziumtransienten sowie auf die Kontraktilität der DCM-Patienten, die eine LVEF $\leq 22\%$ bzw. $> 22\%$ aufwiesen ($p=0,380$ bzw. $p=0,762$)
- Abbildung 21: Eluateffekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität bei DCM-Patienten mit einer LVEF $\leq 22\%$ bzw. $> 22\%$
- Abbildung 22: Verteilung des Kalziumtransienten und der Kontraktilität in Abhängigkeit vom Verlauf der LVEF innerhalb des letzten Jahres ($p=0,001$)
- Abbildung 23: Prozentualer Anteil der kardiodepressiven Effekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität in Abhängigkeit von dem Verlauf der LVEF innerhalb des letzten Jahres ($p=0,001$)

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten Puffer

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Wirkstoffe

Tabelle 3: Echokardiographische Parameter der DCM-Patienten

Tabelle 4: Vergleich der Charakteristika von DCM-Patienten und Kontrollgruppe

Tabelle 5: Relative Änderung des Kalziumtransienten und der Kontraktilität in % nach Superperfusion mit Eluat bei DCM-Patienten und Kontrollen ($p < 0,001$)

4. Einleitung

4.1. Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) gehört zu den kardiovaskulären Erkrankungen und steht im Blickpunkt der vorliegenden Arbeit. Es handelt sich um eine Erkrankung des Myokards, die sich in einer kardialen Dysfunktion als Folge einer progressiven Abnahme der kontraktile Funktion und einer Dilatation des linken oder beider Ventrikel manifestiert. Der Begriff der Kardiomyopathie war ehemals beschränkt auf eine ätiologisch nicht erklärbare Herzmuskelerkrankung (= idiopathische Kardiomyopathie) und wurde von Herzmuskelerkrankungen mit bekannter Ätiologie differenziert (WHO/ISFC-Report, 1980). Nach der neuen WHO/ISFC-Klassifikation (Richardson et al., 1996) umfaßt der Begriff der Kardiomyopathie auch spezifische Kardiomyopathien, die nach ätiologisch-pathogenetischen Gesichtspunkten definiert werden. Diese spezifischen Kardiomyopathien zeigen sich klinisch meist unter dem Bild der DCM. Die Gruppe der spezifischen Kardiomyopathien umfaßt neben den familiären bzw. genetisch determinierten Kardiomyopathien die ischämischen Kardiomyopathien, die valvulären Kardiomyopathien, die hypertensiven Kardiomyopathien, die alkohol- bzw. medikamentös-toxischen Kardiomyopathien, die im Verlauf einer endokrinen Erkrankung auftretenden Kardiomyopathien sowie die virusinduzierten und immunologisch bedingten Kardiomyopathien, welche sich unter dem Bild einer inflammatorischen Kardiomyopathie manifestieren (Richardson et al., 1996).

Die Inzidenz der DCM liegt in den westlichen Industrieländern bei 5-8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr. Die Prävalenz beträgt 36,5 Patienten pro 100.000 Einwohner, wobei bevorzugt Männer betroffen sind (Männer:Frauen 2-4:1) (Bagge et al., 1984; Codd et al., 1989). In ca. 70% der Fälle liegt das Manifestationsalter zwischen 20-50 Jahren (De Maria et al., 1993).

4.2. Pathogenese der DCM

Bei einigen Patienten entsteht die DCM auf dem Boden einer antikardialen Autoreaktivität. Dabei löst eine mikrobielle Infektion zunächst eine antimikrobielle Immunantwort aus, die humorale und zelluläre Effektormechanismen hervorruft. Hierbei kann es zum einen direkt durch die lytische Virusaktivität, zum anderen auch durch die antivirale Immunantwort zu Entzündung und Myozytolyse kommen. Molekulares

Mimikry kann dann im Verlauf der Infektion eine kardialen Autoreaktivität hervorrufen (Maisch et al., 1993; Schwimmbeck et al., 1993). Es spricht vieles dafür, daß diese antikardiale Autoreaktivität für die Entwicklung der chronischen Myokarditis und für den Übergang von der akuten Phase der Virusmyokarditis zur DCM verantwortlich sein könnte (Das et al., 1985). Der Übergang von der akuten Myokarditis in eine dem Bild der DCM gleichenden Herzinsuffizienz ist in Tierversuchen bewiesen worden (Matsumori et Kawai, 1982).

Der Nachweis gebundener Immunglobuline vom IgG-, IgM- und IgA-Typ sowie Komplementfixation am Sarkolemm, am interstitiellen Bindegewebe und am Gefäßendothel in Myokardbiopsien bei einem Teil der DCM-Patienten spricht für die Annahme einer sekundären Immunpathogenese (Maisch et al., 1993). Die meisten der in der Biopsie vorhandenen Antikörper sind auch als zirkulierende Antikörper nachweisbar (Maisch et al., 1993). Bei DCM-Patienten wurden bislang Störungen sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunität beschrieben, welche eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese sowie der Progression der Erkrankung spielen (Maisch et al., 1983). In diesem Zusammenhang konnte bereits eine Vielzahl von Antikörpern gegen unterschiedliche kardiale Strukturen beschrieben werden. So fand man Autoantikörper gegen:

- G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie den β_1 -adrenergen Rezeptor (Wallukat et Wollenberger, 1987; Limas et al., 1989) sowie den muskarinergen Rezeptor (Fu et al., 1993)
- den Kalziumkanal (Schultheiss et al., 1988 Kühl et al., 1991)
- den ADP/ATP-Carrier (Schulze et al., 1989, 1990)
- kontraktile Proteine wie Myosin (Caforio et al., 1992), Aktin (Latif et al., 1991), Tropomyosin (Latif et al., 1991)
- mitochondriale Proteine wie den Adenin Nukleotid Translokator (Schultheiss et Bolte, 1985), M₇ Antigen (Klein et al., 1984), E₂-Untereinheit des Ketosäuredehydrogenase-Komplexes (Ansari et al., 1994)
- Hitzeschockproteine (Latif et al., 1991)
- Epitope der extrazellulären Matrix wie Laminin (Wolff et al., 1989)

Die funktionelle Bedeutung dieser Antikörper ist noch nicht vollständig geklärt. Zum einen könnten die Antikörper als inflammatorische Reaktion auf den Zelluntergang gebildet werden und müßten dann als Epiphänomen gewertet werden. Zum anderen

besteht die Möglichkeit, daß die Antikörper mit der Induktion des Krankheitsprozesses bzw. der Induktion einer myokardialen Dysfunktion assoziiert sind (Limas et al., 1997).

Da in einer Studie gezeigt wurde, daß die Prävalenz von Autoantikörpern im Verlauf der DCM-Erkrankung abnimmt, liegt die Vermutung nahe, daß die Bildung von Autoantikörpern ein frühes Ereignis in der Entwicklung der Erkrankung ist (Caforio et al., 1997).

Matsui et al. (1997) immunisierten Kaninchen mit synthetischen antigenen Peptiden korrespondierend zu den Epitopen des β -Rezeptors oder des muskarinergen Rezeptors. Induziert durch die Autoantikörperbildung entwickelten die Tiere strukturellen Veränderungen der kardialen Strukturen, wie sie bei der DCM vorhanden sind. In Mäusen läßt sich ebenfalls durch Immunisierung mit gereinigtem, herzspezifischen SR- Ca^{2+} -ATPase-Antigen von Kaninchen eine Kardiomyopathie induzieren (Sharaf et al., 1994). Diese Untersuchungen unterstützen die These, daß Autoantikörper bei der Initiation der DCM eine Rolle spielen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Beobachtungen in-vitro, am Tiermodell sowie an Patienten mit DCM darauf hindeuten, daß den zellulären Immunreaktionen und auch der Bildung von Autoantikörpern möglicherweise eine pathophysiologische Bedeutung bei der Initiation und der Entwicklung der DCM zukommen könnte.

Allerdings ist es bereits seit langem bekannt, daß auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der DCM spielen (Mestroni et al., 1990). Familienanamnesen sowie systematische Untersuchungen von Familienmitgliedern der DCM-Patienten mittels klinischer, elektrokardiographischer und echokardiographischer Untersuchungen zeigten bei 20-35% der Fälle Hinweise auf eine familiäre Häufung (Michels et al., 1992). Neben klinischen und diagnostischen Untersuchungen konnte mittels Immunfluoreszenz, welche das Vorhandensein von kardialen Antikörpern bei 58% der DCM-Patienten und bei 20% von symptomfreien Familienangehörigen nachwies, eine familiäre Häufung bestätigt werden (Caforio et al., 1994).

4.3. Klinik der DCM

Die klinischen und hämodynamischen Befunde bei der DCM weisen in Abhängigkeit von dem Ausmaß der Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion eine große Variationsbreite auf. Bei einer nur gering reduzierten Verminderung der LVEF können die Patienten asymptomatisch sein und pathologische hämodynamische Befunde weitgehend fehlen. Diese Patienten weisen oft nur eine geringe linksventrikuläre

Dilatation auf, die Füllungsdrücke und das Herzminutenvolumen liegen im Normbereich. Im Gegensatz dazu können symptomatische Patienten klinisch eine belastungsabhängige Dyspnoe, körperliche Schwäche, Angina pectoris sowie einen erhöhten zentralen Venendruck mit Stauungsleber und Ödemen aufweisen. Die klinische Stadieneinteilung erfolgt dabei anhand der NYHA-Klassifikation. Zu den morphologischen und hämodynamischen Veränderungen zählen eine beträchtliche links- und rechtsventrikuläre Dilatation mit erhöhten enddiastolischen und endsystolischen Ventrikelvolumina, deutlich erhöhten Füllungsdrücken sowie eine relative Mitral- oder Trikuspidalklappeninsuffizienz. Folge dieser Veränderungen ist ein reduziertes Herzminutenvolumen (Johnson et Palacios, 1982). Rhythmusstörungen treten mit zunehmender Einschränkung der Ejektionsfraktion gehäuft auf und gehen mit der Gefahr des plötzlichen Herztodes einher (Iwata et al., 2001).

4.4. Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bei DCM

Das terminale Stadium der DCM entspricht einer chronischen Herzinsuffizienz. Herzinsuffizienz ist definiert als eine hämodynamische Situation, bei der das Herz nicht in der Lage ist, ein ausreichendes Blutangebot in die Peripherie zu pumpen (Mittmann et al., 1998; Pieske et al., 1998). Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind vielfältig. Nach der EPICAL-Studie (Zannad et al., 1999) ist die DCM nach der koronaren Herzerkrankung heutzutage die zweithäufigste Ursache. Verantwortlich für die eingeschränkte Pumpleistung des Herzens sind verschiedene Faktoren. So können Veränderungen in der Zusammensetzung und Funktion der kontraktilen Proteine, Störungen der Kalziumhomöostase, der Signaltransduktion oder des Energiestoffwechsels zu einer eingeschränkten Herzarbeit führen (Schmidt et Thews, 1995). Zum einen läßt sich das herabgesetzte Herzminutenvolumen durch eine verminderte Anzahl an funktionsfähigen Kardiomyozyten und einer reduzierten Kontraktilität der verbliebenen Zellen erklären (Anversa et al., 1990). Eine Abnahme des Myosingehaltes um 20% wurde am insuffizienten Herzen beschrieben und kann als mögliche Ursache für die Einschränkung der Kontraktilität in Betracht gezogen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der Aktin-Myosin-Querbrückeninteraktionen pro Zeiteinheit verringert ist (Hasenfuss et al., 1992). Zum anderen kann eine Störung der Kalziumhomöostase Ursache einer Funktionseinschränkung sein, da die Aktivität der Myofibrillen von der zytosolischen

Kalziumkonzentration abhängt. Untersuchungen konnten bereits signifikante Unterschiede in der Kalziumhomöostase aufweisen. Beuckelmann beschrieb eine herabgesetzte systolische und eine erhöhte diastolische Kalziumkonzentration, einen verlangsamten diastolischen Kalziumabfall sowie ein verlängertes Aktionspotential mit der Folge eines verlängerten Kalziumtransienten (Beuckelmann et al., 1992). Die Störungen der Kalziumhomöostase können mannigfaltige Ursachen haben. Zum einen kann der initiale Kalziumeinstrom verändert sein, beispielsweise durch eine verminderte Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Takahashi et al., 1992). Allerdings wurde in anderen Studien keine Änderung der Rezeptoren nachgewiesen (Beuckelmann et al., 1992). Zum anderen kann eine Störung der elektromechanischen Kopplung eine eingeschränkte Kontraktion bedingen. Die gestörte Kopplung zwischen dem aus dem Extrazellulärraum einströmenden „Trigger-Kalzium“ und der Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischem Retikulum wurde in experimentell erzeugter Herzinsuffizienz bei Ratten nachgewiesen (Gomez et al., 1997). Allerdings scheint die Expression des Ryanodinrezeptors selbst nicht verändert zu sein. Eine verminderte Rückaufnahme des freigesetzten Kalziums in das Sarkoplasmatische Retikulum wurde hingegen schon mehrfach beschrieben (Limas et al., 1987; Schwinger et al., 1995). Die molekulare Ursache dafür ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Konzentration des dafür verantwortlichen Proteins, die sarko(endo)plasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und dessen Regulators Phospholamban kann erniedrigt (Meyer et al., 1995) oder unverändert sein (Schwinger et al., 1995). Als Folge der verminderten Wiederaufnahme kommt es zu der bereits erwähnten erhöhten diastolischen Kalziumkonzentration. Aus der verminderten Kalziummenge im sarkoplasmatischem Retikulum resultiert die verminderte systolische Kalziumkonzentration, da nicht genügend Kalziumionen für den folgenden Kontraktionszyklus zur Verfügung stehen. Als Kompensationsmechanismus wird vermehrt Kalzium über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in den Extrazellulärraum transportiert (Flesch et al., 1996).

Auch Störungen des beta-adrenergen Signaltransduktionssystem können als Ursache des insuffizienten Myokards in Frage kommen. Es wurden zwar erhöhte Noradrenalinplasmaspiegel bei den DCM-Patienten beschrieben (Cohn et al., 1984), jedoch ist die Ansprechbarkeit auf die noradrenerge Stimulation vermindert. Ferner wurde eine Down-Regulation der Beta-Rezeptordichte auf den Myozyten beschrieben (Bristow et al., 1982). Bei Patienten mit DCM ist selektiv nur die Dichte des β_1 -Rezeptors vermindert, während die Zahl der β_2 -Rezeptor unverändert ist (Bristow et al.,

1986). Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg des inhibitorischen Guaninnukleotidbindenden Proteins (G_i) in der Zellmembran. Die dadurch herabgesetzte Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase bedingt eine Reduktion des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) in den Myozyten. Der verminderte intrazelluläre cAMP-Spiegel bewirkt eine herabgesetzte Phosphorylierung und somit reduzierte Aktivität von Funktionsproteinen, was sich in Störungen der elektromechanischen Kopplung äußert (Feldmann et al., 1987). Somit wird die Herzmuskelzelle zunehmend von der sympathischen Stimulation abgekoppelt.

Da der Energiehaushalt eine große Bedeutung für die myokardiale Funktion hat, können Veränderung der energiereichen Phosphatverbindungen zu einer kontraktile Dysfunktion führen. Es ist seit längerem bekannt, daß bei Tieren mit einer Kardiomyopathie unterschiedlicher Genese eine Reduzierung der Energiespeicher vorliegt (Marckiewicz et al., 1986). Auch für den Menschen wurde bereits eine Veränderung des Energiehaushaltes beschrieben. So ist das Verhältnis von Phosphokreatinin zu β -Adenosintriphosphat (PCr/ β -ATP) bei DCM-Patienten vermindert (Hardy et al., 1991).

Zu den morphologisch typischen Veränderungen der DCM gehört vor allem die das Krankheitsbild charakterisierende starke Dilatation des linken und teilweise auch rechten Ventrikels, welche durch eine Schädigung der Herzmuskelfasern und bzw. oder des bindegewebigen Gerüsts des Herzmuskels, des Mesenchyms, verursacht wird. Während beim gesunden Herzen eine erhöhte Ventrikelfüllung (Vorlast) zu einer verstärkten Kontraktion und somit zu einem gesteigerten Schlagvolumen führt, konnte in Studien gezeigt werden, daß diese als Frank-Starling-Mechanismus bezeichnete Beziehung bei Herzinsuffizienz nicht ausreichend funktioniert (Schwinger et al., 1994). Die Abhängigkeit der entwickelten Kraft von der Vordehnung der Muskelfasern hat unterschiedliche Ursachen. Der Hauptgrund ist vermutlich die von der Vordehnung abhängige Aktivierung der kontraktile Myofibrillen durch Kalziumionen (Fabiato et Fabiato, 1978; Kentish et al., 1986). In Versuchen konnte eine herabgesetzte Kalziumsensitivität der Myofibrillen am insuffizienten Herzen gezeigt werden, während am gesunden Herzen eine erhöhte Kalziumsensitivität nach Vordehnung der Myofibrillen zu beobachten war (Schwinger et al., 1994). In Folge der durch die Dilatation erhöhte Wandspannung erfordert die Faserverkürzung der Myofibrillen eine größere Kraftentwicklung. Nach dem Laplace-Gesetz (Schmidt et Thews, 1995) nimmt die Wandspannung (K =muskuläre Wandspannung, tangentielle Spannung, Kraft pro

Querschnitt der Wand) bei großem Ventrikelradius (r) und geringer Wanddicke (d) zu. Um einen bestimmten Innendruck im Ventrikel (P) zu erreichen, muß also bei vergrößertem Radius eine höhere Kraftentwicklung erzielt werden.

$K = P \frac{r}{2d}$	Laplace-Gesetz
----------------------	----------------

Die erhöhte Wandspannung ist vermutlich der Auslöser für die einsetzende kompensatorische Hypertrophie des Muskelzellen. Eine vollständige Kompensation der Dilatation durch die Hypertrophie wäre erreicht, wenn das Verhältnis von Myokarddicke zu Ventrikelradius im Bereich gesunder Ventrikel liegen würde. Da dieses Ziel vor allem bei stark dilatierten praktisch nie erreicht wird, geht die DCM meist mit einer eingeschränkten Herzleistung einher.

4.5. Prognose und Therapie der DCM

Da die Einjahresmortalität bei ca. 10%, die Zweijahresmortalität bei bis zu 35% und die Zehnjahresüberlebensrate nur bei 30% trotz medikamentöser Therapie liegt, ist die DCM eine der prognostisch ungünstigsten Erkrankungen überhaupt (Hofmann et al., 1988; Di Lenarda et al., 1994). Zur Diagnosestellung werden die Echokardiographie, welche den Nachweis einer Dilatation des linken und rechten Ventrikels sowie einer reduzierten linksventrikulären Pumpfunktion erlaubt, und die Herzkatheteruntersuchung, welche die exakte Beurteilung der hämodynamischen Parameter wie Schlagvolumen, Herzindex und enddiastolischer linksventrikulärer Druck ermöglicht, herangezogen. Ferner läßt sich mittels Koronarangiographie eine koronare Herzkrankheit ausschließen und durch eine Endomyokardbiopsie ist die Abgrenzung zur Myokarditis möglich (Figulla et al., 1992; Sigusch et al., 1998).

Die Therapie der DCM erfolgt zunächst rein symptomatisch. Eine entscheidende Bedeutung in der konservativen Therapie der Herzinsuffizienz bei der DCM kommt der körperlichen Schonung oder in schweren Fällen der eingeschränkten Bettruhe zu. Die symptomatische medikamentöse Therapie der DCM unterscheidet sich ansonsten nicht von der klassischen medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz, bestehend aus ACE-Inhibitoren bzw. AT-II-Rezeptorantagonisten, Betablockern und Diuretika. Mehrfache Studien haben nachgewiesen, daß Betablocker günstige Effekte auf Ejektionsfraktion und Leistungsfähigkeit des Patienten erzielen (Waagstein, 1995). Weitere Studien haben gezeigt, daß Betablocker eine Verbesserung der Mortalität bei

Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese bewirken können (Packer et al., 1996). Als letzte Therapiemöglichkeit der DCM und der sie begleitenden terminalen Herzinsuffizienz stehen der Einsatz eines Kunstherzens oder die Herztransplantation zur Verfügung. So stellt die DCM die häufigste Indikation für eine Herztransplantation dar (Manolio et al., 1992). Aufgrund der hohen Komplikations- und Mortalitätsrate im Rahmen von Herztransplantationen ist das primäre Ziel der medikamentösen Therapie die Stabilisierung des Patienten. Außerdem steht angesichts der begrenzten Anzahl von Spenderherzen die Herztransplantation nur einem geringen Teil der schwerst komprimierten Patienten zur Verfügung. Daher sollte das Ziel der klinischen und experimentellen Forschung sein, neue, alternative Therapiekonzepte zur Behandlung der DCM zu entwickeln.

Die kausale Therapie entsteht auf dem Boden des pathophysiologischen Konzeptes, welches den Übergang einer viral bedingten Myokarditis in eine autoreaktive Kardiomyopathie beschreibt. Dabei hängt die Behandlungsform vom Krankheitsstadium ab. In der Initialphase der Erkrankung, der akuten Virusmyokarditis, dürfte je nach nachgewiesenem Virus eine antivirale oder eine immunmodulatorische Therapie Erfolg versprechen. Bei Ausschluß von viralem Genom im Myokard oder im Stadium der chronischen autoimmunen Kardiomyopathie könnten mit einer immunsuppressiven Therapie positive Erfolge erzielt werden. Allerdings wurde in Studien gezeigt, daß eine immunsuppressive Therapie keine (Parrillo et al., 1989; Mason et al., 1995) bzw. nur eine geringe Verbesserung (Maisch et al., 1995) der Hämodynamik und der Prognose bei DCM-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkt. Die hochdosierte Gabe von Immunglobulinen bewirkt bei erwachsenen Patienten mit akuter Myokarditis und akuter DCM (Krankheitssymptome seit weniger als sechs Monaten) eine deutliche Verbesserung der LVEF sowie der klinischen Beschwerden (McNarama et al., 1997). Andererseits wurde kürzlich in einer randomisierten, kontrollierten Studie gezeigt, daß es keinen signifikanten Unterschied zwischen intravenöser Immunglobulin-Therapie und Placebogabe bezüglich der Verbesserung der Ejektionsfraktion gibt (McNamara et al., 2001). Eine weitere immunmodulatorische Therapieform ist die Immunadsorption, mit der sich bei Patienten mit schwersten Formen der DCM und nachgewiesenen Autoantikörpern gegen den β_1 -Rezeptor hämodynamische Verbesserungen erzielen lassen (Dörffel et al., 1997; Felix et al., 2000).

4.6. Immunadsorption bei DCM

Bei der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen sind Antikörper von großer Bedeutung. Seit Mitte der 70'er-Jahre werden bei einigen Autoimmunerkrankungen auch extrakorporale Therapieverfahren wie Plasmapherese und Immunadsorption eingesetzt, deren Ziel es ist, die pathogenetisch bedeutsamen Autoantikörper und Immunkomplexe direkt aus dem Blutkreislauf zu entfernen (Schneider, 1998). Bei der Plasmapherese wird vom Blut separiertes Plasma durch geeignete Ersatzlösungen substituiert. Es wurde gezeigt, daß in Abhängigkeit vom ausgetauschten Plasmavolumen die Anzahl der zirkulierende Autoantikörper und Immunkomplexe reduziert werden (Schneider, 1998). Bei der Immunadsorption werden Säulen benutzt, über welche das Plasma gefiltert wird. Dabei werden die Autoantikörper und Immunkomplexe an der Säule gebunden und zurückgehalten, die restlichen Plasmabestandteile können dem Patienten weitgehend zurück infundiert werden. Die Therapieerfolge dieser extrakorporalen Verfahren hängen in erster Linie davon ab, wie groß die Bedeutung der eliminierten Autoantikörper und Immunkomplexe für die Pathogenese und Progression der Erkrankung sind (Dörffel et al., 1997; Schneider, 1998).

Der Entzug von Antikörpern mittels Immunadsorption wurde schon erfolgreich bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z. B. dem Goodpasture-Syndrom (Bygren et al., 1985), dem systemischen Lupus erythematoses (Palmer et al., 1988) oder der Myasthenia gravis (Shibuya et al., 1994) eingesetzt. Bei der DCM wurde die Immunadsorption erstmals in einer Pilotstudie von Dörffel et al. angewendet (1997). In dieser Studie wurden neun Patienten mit DCM und schwerer Herzinsuffizienz an fünf aufeinanderfolgenden Tagen immunadsorbiert. Die Patienten wiesen eine LVEF < 25% auf und standen unter einer stabilen Medikation mit ACE-Hemmern, Digitalis, Diuretika und Betablockern. Innerhalb von 6 Tagen zeigte sich nach 5 Immunadsorptionsitzungen eine signifikante Verbesserung der hämodynamischen Parameter sowie der Herzinsuffizienzsymptomatik. Des Weiteren konnte eine deutliche Reduktion der zum Monitoring verwendeten β_1 -Adrenorezeptor-Autoantikörper sowie eine Abnahme des IgG-, IgM- und IgA-Gehaltes im Serum der Patienten nachgewiesen werden. Die sich daran anschließende randomisierte Studie von Felix et al. untersuchten die längerfristigen hämodynamischen Veränderungen der Immunadsorption (2000). Bei dieser randomisierten Studie wurden 18 DCM-Patienten (NYHA III-IV, LVEF <30%, HI <2,5), die sich während der Studie unter stabiler Medikation befanden, in zwei Gruppen

geteilt. Eine Gruppe wurde mit Immunadsorptionen und IgG-Substitution behandelt (IA/IgG-Gruppe), die Kontrollgruppe erhielt nur die konventionale medikamentöse Therapie. Die Patienten der IA/IgG-Gruppe wurden initial an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit je einer IA-Sitzung pro Tag behandelt. Nach der dritten Sitzung wurden 0,5g/kg polyklonales IgG substituiert. In 1-Monatsabständen wurden in den folgenden drei Monaten die IA-Zyklen mit je einer IA-Sitzung pro Tag an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Die hämodynamischen Messungen wurden mittels einer Swan-Ganz-Thermodilutionskatheter-Untersuchung durchgeführt. Bereits nach dem initialen Immunadsorptionszyklus und der IgG-Substitution kam es zu einer signifikanten Verbesserung der hämodynamischen Parameter. Der Herzindex stieg von $2,1 \pm 0,1$ auf $2,8 \pm 0,1$ l/min/m² ($p < 0,01$) und der Schlagvolumenindex von $27,8 \pm 2,3$ auf $36,2 \pm 2,5$ ml/m² ($p < 0,01$) an (Abbildung 1). Der systemvaskuläre Gefäßwiderstand fiel von 1428 ± 74 auf 997 ± 55 dyne*s*cm⁻⁵ ($p < 0,01$) ab. Nach drei Monaten blieben die hämodynamischen Werte stabil bzw. verbesserten sich im letzten Zyklus nochmals moderat. Parallel zu den objektivierbaren hämodynamischen Verbesserung kam es auch zu subjektiven Verbesserungen der klinischen Symptome. Des Weiteren zeigten klinische Untersuchungen eine Verbesserung des Krankheitsstadium nach NYHA. Echokardiographisch ließ sich eine Zunahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion nachweisen. Eine Reduktion der Serum-IgG-Konzentration auf 20% sowie des β_1 -Autoantikörpertiters auf 8% des Ausgangswertes wurden ebenfalls beschrieben. Im Vergleich zur Immunadsorptionsgruppe veränderte sich die Hämodynamik der Kontrollgruppe innerhalb der drei Monate nicht. Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, erlaubt die Immunadsorption eine Stabilisierung bzw. Verbesserung der hämodynamischen Parameter bei DCM-Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz. Daher kann die Immunadsorption als zusätzliches therapeutisches Verfahren bei DCM-Erkrankungen in Betracht gezogen werden.

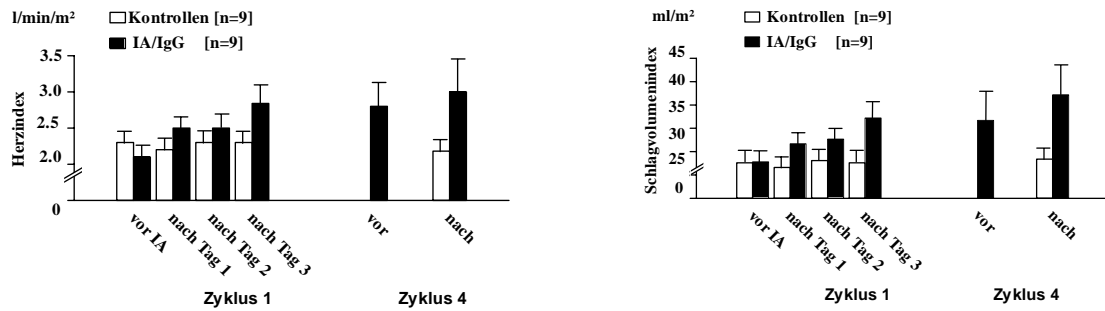


Abbildung 1: Änderung des Herzindex und des Schlagvolumenindex während der Immunadsorption (Felix et al., 2000)

Felix et al. untersuchten weiterhin, welche Effekte die mittels Immunadsorption entfernten Antikörper auf isolierte Rattenkardiomyozyten haben. Es wurden elf Patienten mit DCM sowie das Blut von neun herzgesunden Kontrollprobanden immunadsorbiert. Das auf diese Weise gewonnene Eluat wurde an isolierten Rattenkardiomyozyten mittels Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Das Eluat der DCM-Patienten zeigte im Gegensatz zum Eluat der Kontrollgruppe eine dosisabhängige Reduktion des gemessenen Kalziumtransientens und der Kontraktilität (Abbildung 2) (Felix et al., 2002).

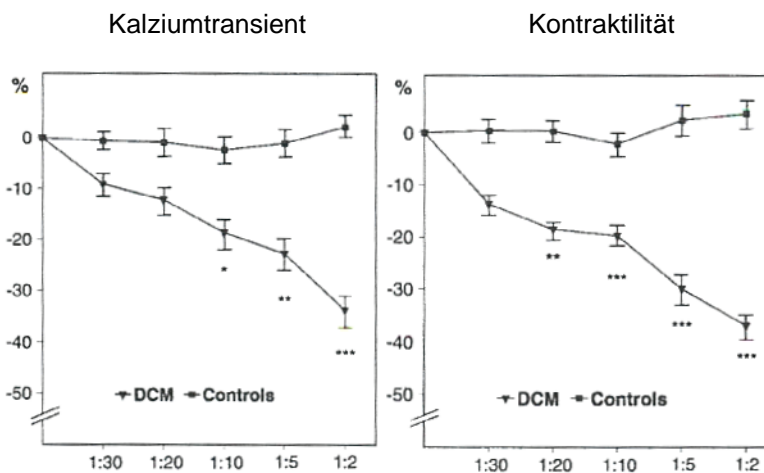


Abbildung 2: Konzentrationsabhängige Änderung des Kalziumtransienten und der Verkürzung (Felix et al., 2002)

Diese kardiodepressive Wirkung konnte an isolierten humanen Myozyten bestätigt werden. Eine Behandlung mit Protein A konnte diesen Effekt aufheben, wobei nach Elution der Antikörper vom Protein A der kardiodepressive Effekt erneut feststellbar war.

Weiterhin wurde mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen an isolierten Kardiomyozyten das Vorhandensein zirkulierender kardiotoxischer Antikörper bei DCM-Patienten nachgewiesen. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß es sich bei den entzogenen kardiodepressiven Faktoren um die bei der Immunadsorption entfernte Antikörper handelt.

Des Weiteren konnte in dieser Studie ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Veränderungen von Kalziumtransient und Kontraktilität der Rattenkardiomyozyten und den hämodynamischen Parametern der DCM-Patienten nachgewiesen werden. Das Eluat von Patienten, die von einer Immunadsorption besonders profitierten, zeigte bei der Testung an isolierten Rattenkardiomyozyten eine größere Abnahme von Kalziumtransient und Kontraktilität als das Eluat von Patienten, die sich hämodynamisch weniger verbesserten (Abbildung 3). Diese Ergebnisse konnten an einer größeren Patientenpopulation (n=45) durch Staudt et al. (2004) bestätigt werden.

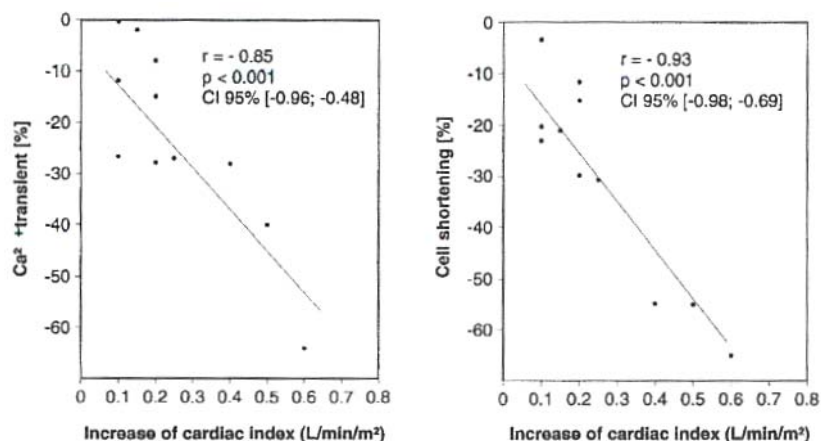


Abbildung 3: Korrelation zwischen der Steigerung des Herzindex und dem kardiodepressiven Effekt auf Kardiomyozyten (Felix et al., 2002)

Der pathophysiologische Mechanismus für die Antikörperwirkung ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, wobei nach den Ergebnissen einer Studie von Staudt et al. (2002) der Antikörper-Subklasse IgG-3 eine besondere Bedeutung zukommt. Staudt et al. (2001) konnten ebenfalls zeigen, daß es drei Monate nach Immunadsorption und nachfolgender IgG-Substitution zu einer Abnahme inflammatorischer Zellen, insbesondere von Lymphozyten (CD3+, CD4+ und CD8+), im Herzmuskelgewebe von DCM-Patienten kommt. In der rein medikamentös behandelten Kontrollgruppe konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit älteren

Untersuchungen von Kühl et al. (1994 und 1995), die Inflammation als einen pathophysiologischen Mechanismus bei dilatativer Kardiomyopathie nachweisen konnten.

4.7. Aufgabenstellung

Durch in-vitro-Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, daß die bei der DCM beschriebenen und durch die Immunadsorption entfernten Antikörper die Funktion der Myozyten beeinträchtigen. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, in welchem Prozentsatz kardiodepressive Antikörper bei DCM-Patienten vorhanden sind. Dabei soll die Prävalenz der Antikörper in Abhängigkeit vom Alter der Patienten, der Krankheitsdauer, dem Verlauf der Erkrankung sowie der linksventrikulären Ejektionsfraktion im Vergleich zu einer herzgesunden Kontrollgruppe dargestellt werden. Aus diesen Überlegungen heraus wurden Antikörper aus dem Serum von DCM-Patienten und Kontrollprobanden gewonnen und deren Wirkung an isolierten, feldstimulierten Rattenkardiomyozyten untersucht. Die verwendete Methodik umfaßte die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie, da diese eine simultane Detektion von zytosolischer Kalziumkonzentration und Zellverkürzung erlaubt. Zu diesem Zweck wurden die isolierten Rattenkardiomyozyten mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff (Fluo-3AM) beladen und die Änderung der kontraktile Parameter unter Antikörpereinfluß untersucht.

5. MATERIAL UND METHODEN

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper aus dem Plasma von Patienten sowie von Kontrollpersonen extrahiert und an isolierten Rattenkardiomyozyten mittels der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) getestet. Die CLSM erlaubt die simultane Detektion von Kontraktionsverhalten und Kalziumtransienten an adulten Myozyten unter verschiedenen Bedingungen. Zu diesem Zweck müssen die isolierten Zellen durch eine Trägersubstanz auf dem Boden einer Versuchskammer angeheftet und mit einem Kalziumfarbstoff beladen werden. Im folgenden Kapitel wird auf die dazu benötigten Materialien sowie die einzelnen Arbeitsschritte näher eingegangen.

5.1. Material

5.1.1. Puffer, Chemikalien und Wirkstoffe

Die Tabelle 1 enthält die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen und die Hersteller, von denen die Substanzen bezogen wurden (Merck, Darmstadt, Germany und Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). Die Puffer wurden steril filtriert und im Kühlschrank bei 4° Celsius gelagert.

Substanzen (mM)	Perfusionspuffer	Versuchspuffer (VP)	Hersteller
NaCl	110	117	Merck
KCl	2,6	2,8	Merck
MgCl ₂		0,6	Sigma
MgSO ₄	1,2		Merck
KH ₂ PO ₄	1,2	1,2	Merck
CaCl ₂		1,2	Merck
HEPES	25	10	Merck
Glukose	11	20	Merck
eingestellter pH-Wert	7,4 mit NaOH	7,3 mit NaOH	Merck

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Die Tabelle 2 enthält eine Übersicht der verwendeten Chemikalien und Wirkstoffe sowie deren Hersteller

Substanzen	Hersteller
BSA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
DMSO	Merck, Darmstadt, Germany
Fluo-3-AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
Glycin-HCl 0,2 molar	Baxter, München, Germany
Kollagenase Typ CLS II	Worthington, Freehold, NJ, USA
Laminin	Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA
Pluronic	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
Sepharose (Immunadsorber Ig Therasorb)	Baxter, München, Germany
Thiopental (Trapanal®)	Byk Gulden, Konstanz, Germany

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Wirkstoffe

5.2. Charakterisierung von DCM-Patienten und Kontrollpatienten

In der vorliegenden Arbeit wurden 100 DCM-Patienten, die eine linksventrikuläre Funktionsstörung (LVEF <50%) aufwiesen und in den Jahren 1999 bis 2004 in der Charité Berlin bzw. der Klinik für Innere Medizin B in Greifswald behandelt wurden, eingeschlossen. Die mittlere Dauer der Erkrankung bei den DCM-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme betrug $3,6 \pm 2,7$ Jahre, der Altersdurchschnitt der Patienten lag bei $51,9 \pm 11,1$ Jahren. Alle Patienten standen unter einer maximalen medikamentösen Therapie mit ACE-Hemmern, Diuretika, Betablockern, Nitraten und Aldosteronantagonisten.

Der echokardiographisch gemessene linksventrikuläre endsystolische Durchmesser betrug im Mittel $67,8 \pm 8,7$ mm, der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser $53,6 \pm 10,7$ mm und der Durchmesser des linken Vorhof $44,9 \pm 7,5$ mm, Die gemittelte linksventrikuläre Ejektionsfraktion lag bei $24,1 \pm 9,8\%$. Tabelle 3 zeigt zusammenfassend die mittels Echokardiographie gewonnen Daten.

Parameter	Patientendaten
Linker VH	44,9 ± 7,5 mm
LVEDD	67,8 ± 8,7 mm
LVESD	53,6 ± 10,7 mm
LVEF	24,1 ± 9,8%
Septumdicke	9,5 ± 1,5 mm
Hinterwand	9,4 ± 1,3 mm
Ao.kl.Wurzel	23,1 ± 3,5 mm
RVOT	32,5 ± 5,3 mm

Tabelle 3: Echokardiographische Parameter bei DCM-Patienten

Als Kontrollgruppe wurde das Plasma von 92 herzgesunden Patienten untersucht. Der Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe lag bei 54,5 ± 15,8 Jahren.

Tabelle 4 stellt die ermittelten Charakteristika von DCM-Patienten und Kontrollgruppe gegenüber.

Charakteristika	DCM-Patienten	Kontrollen
Gesamtanzahl	100	92
Geschlecht m/w	82/18	67/25
Alter (Jahre)	51,9 ± 11,1	54,5 ± 15,8
Erkrankungsdauer (Jahre)	3,6 ± 2,7	
IgG-Konzentration im Eluat (mg/dl)	1265,7	1449,65

Tabelle 4: Vergleich der Charakteristika von DCM-Patienten und Kontrollgruppe

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der Alters- und Geschlechterverteilung (p=0,084 bzw. p=0,175)

5.3. Tiere

Für die Isolation der Rattenkardiomyozyten werden weibliche Albino-Wistar-Ratten im Alter von 49-56 Tagen verwendet, die ein Gewicht von 180-200 g aufweisen. Die Tiere stammen aus der eigenen Zucht des Tierstalls der Charité Berlin.

5.4. Methoden

5.4.1. Gewinnung und Bearbeitung der Antikörper

5.4.1.1. Isolierung der Antikörper

Um die Antikörper aus dem Plasma der DCM-Patienten und Kontrollpersonen zu extrahieren, wurde ein Verfahren in Anlehnung an die in der Klinik durchgeführte Immunadsorption entwickelt (Felix et al., 2002). Das Prinzip der Immunadsorption beruht auf der Bindung von humanen Immunglobulinen durch an Sepharose-CL-4B gebundene polyklonale Antikörper, welche aus sensibilisierten Schafen gewonnen wurden. Die polyklonalen Antikörper richten sich gegen schwere und leichte Immunglobulinketten und sind in der Lage Immunglobuline aller Subklassen (IgA, IgG 1-4, IgM), sowie Immunglobulinfragmente und Immunkomplexe zu binden.

Zur Versuchsvorbereitung wurde die Sepharose aus den Immunadsorptionssäulen (Immunadsorber Ig Therasorb; Firma Baxter, München, Germany) in drei Schritten mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und der Überstand mit 300 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Es wurden dann jeweils 4 ml der gewaschenen Sepharose zusammen mit 12 ml Patientenplasma in ein Falconröhrchen gegeben, welches dann für 90 min bei 37° Celsius unter Bewegung inkubiert wurde. In dieser Zeit banden die Fc-gebundenen Schafsantikörper die im Plasma vorhandenen Immunglobuline. Anschließend wurde die Suspension 1 Minute bei 300 Umdrehungen zentrifugiert und der Plasmaüberstand abpipettiert. Der Sepharoserückstand wurde mit 5 ml Kochsalzlösung gewaschen, um nicht gebundene Antikörper sowie andere Plasmabestandteile zu entfernen und schließlich mit 10 ml Glycin-HCl (pH 2,8) versetzt. Die Suspension wurde dann für weitere 60 min bei 37° Celsius unter Bewegung inkubiert. Dabei wurde die Bindung zwischen den Schafsantikörpern und dem humanen Immunglobulinen gelöst. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und mit 1 ml Trispuffer (pH 7,5) versetzt. Die auf diese Weise gewonnene Antikörpersuspension wurde folgend als Eluat bezeichnet. Das Eluat stand nun zur Weiterverarbeitung zur Verfügung.

5.4.1.2. Aufarbeitung der Antikörper

Das Patienteneluat wurde in zwei Schritten gegen Versuchspuffer dialysiert. Dazu wurden 10 ml Eluat in einen Dialyseschlauch (Spectra/Por CE(Cellulose Ester)-Membran; Firma Spectrum Laboratories Inc., Laguna Hills, CA, USA) mit einem Molekulargewichtsfiter (MWCO) von 100.000 Da gefüllt. Die Dialyse erfolgte zunächst für 8 Stunden gegen ein Volumen von 1:100 (Eluat:VP) auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur, dann für weitere 16 Stunden gegen ein Volumen von 1:1000. Anschließend wurde das Eluat zur Komplementinaktivierung für 30 min im Wasserbad bei 56° Celsius erwärmt. Abschließend wurde die Immunglobulinkonzentration im Eluat turbidimetrisch (Hitachi 717, Böhringer Mannheim, Germany) bestimmt und das Eluat mit Versuchspuffer auf eine IgG-Konzentration von 300 mg/dl verdünnt.

5.4.2. Isolierung von adulten Rattenkardiomyozyten

Die Isolation der ventrikulären Kardiomyozyten von weiblichen adulten Wistar-Ratten erfolgte mittels einer modifizierten Langendorff-Apparatur, die in ähnlichem Aufbau bereits von Powell (1980) und Piper (1992) beschrieben wurde (siehe Abbildung 4). Diese Apparatur diente der Perfusion des Herzens über die Aorta und gewährleistete die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Ein parallel geschalteter Heiz-Pump-Kreislauf ermöglichte eine konstante Umgebungstemperatur von 37° Celsius.

Die Perfusions-/Enzymlösung wurde im oberen Reservoir begast und gelangte über eine erwärmte Säule zum Herzen. Die Säule erzeugte durch die Höhendifferenz einen Druck von 90 cm Wassersäule und beugte mittels integrierter Blasenfalle der Gefahr von Luftembolien während der Perfusion vor. Ein Schraubventil ermöglichte eine Regulierung des Perfusionsflusses. Im verschließbaren Auffangbecher unterhalb des Herzens, welcher als eine Art „Klimakammer“ wirkt, wurde der Perfusionspuffer gesammelt und von dort über eine Rollerpumpe in das obere Reservoir rezirkuliert.

5.4.2.1. Vorbereitung

Vor Beginn der Isolation wurde das gesamte Langendorff-System zunächst mit zirka einem Liter destillierten Wasser, dann mit 50-70 ml Perfusionspuffer gespült und anschließend mit 75 ml Perfusionspuffer gefüllt. Die Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begann 30 Minuten vor Versuchsbeginn. Gleichzeitig wurde auch der Heiz-Pump-Kreislauf eingeschaltet um die Anlage auf 37° Celsius zu erwärmen. Unmittelbar

vor Beginn der Isolation wurde die benötigte Kollagenase (16 mg Kollagenase Typ II) zusammen mit säurefreiem BSA (174 mg) in 20 ml Perfusionspuffer mit 22,5 µl CaCl₂-Stammlösung aufgelöst.

5.4.2.2. Organentnahme und Präparation

Für die Versuche wurde das Herz von 49-56 Tage alten, 180-200 g schweren, weiblichen Albino-Wistar-Ratten aus der Zucht des Tierstalls der Charité isoliert. Die Ratten wurden mit einer intraperitonealen Injektion von etwa 5-6 ml Thiopental (0,5 g in 20 ml) anästhesiert. Der Bewußtseinszustand wurde durch Schmerzreize überprüft. Bei Reflexlosigkeit wurde der Thorax mit einem medianen Schnitt entlang des Sternums eröffnet. Das Herz wurde mitsamt des Mediastinums exzidiert und in eine vorbereitete Petrischale mit 4° Celsius kalter physiologischer Kochsalzlösung überführt. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine schnelle Absenkung der Stoffwechselaktivität und des Sauerstoffverbrauchs.

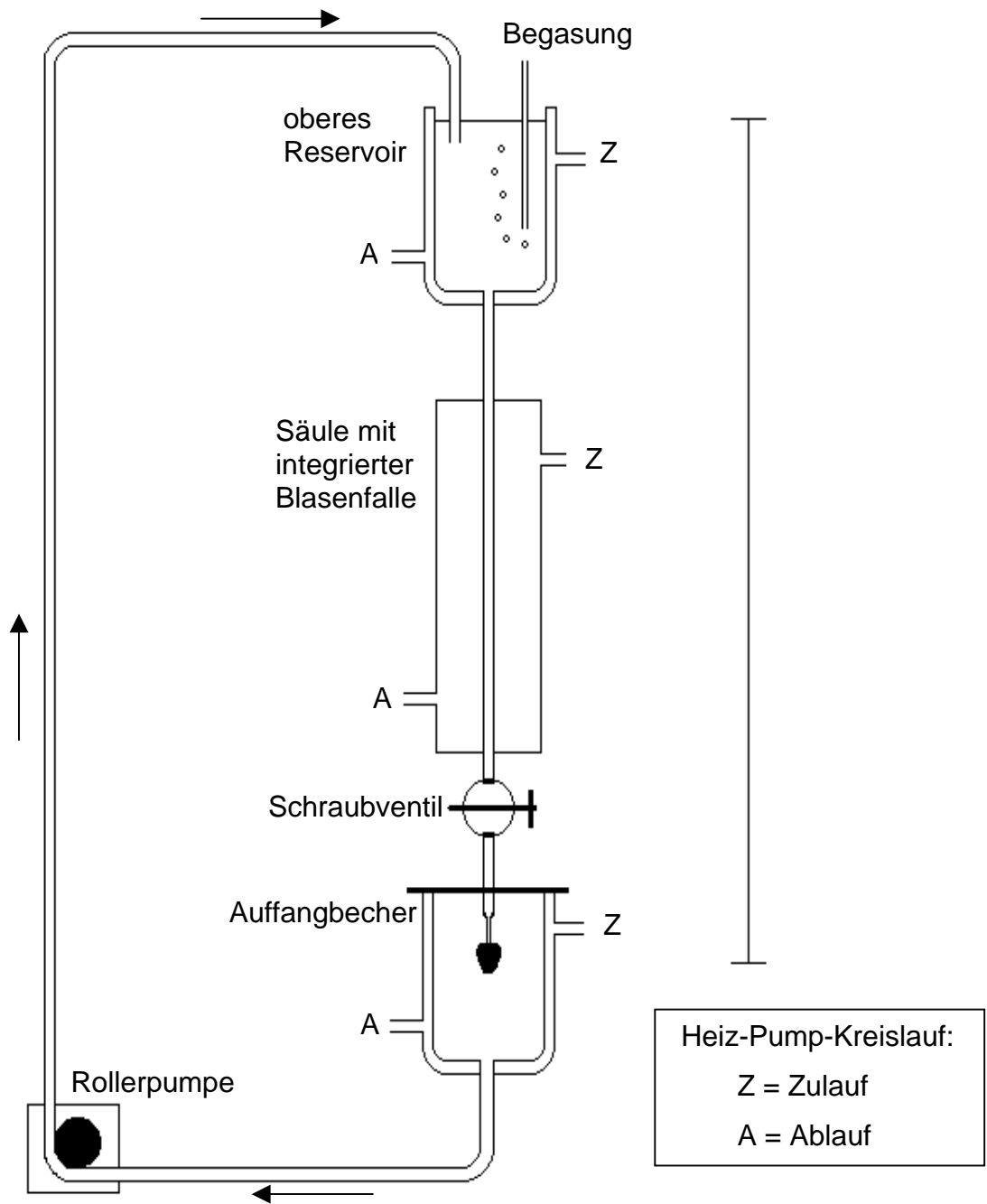


Abbildung 4 : Modifizierte Langendorffapparatur nach Powell und Piper

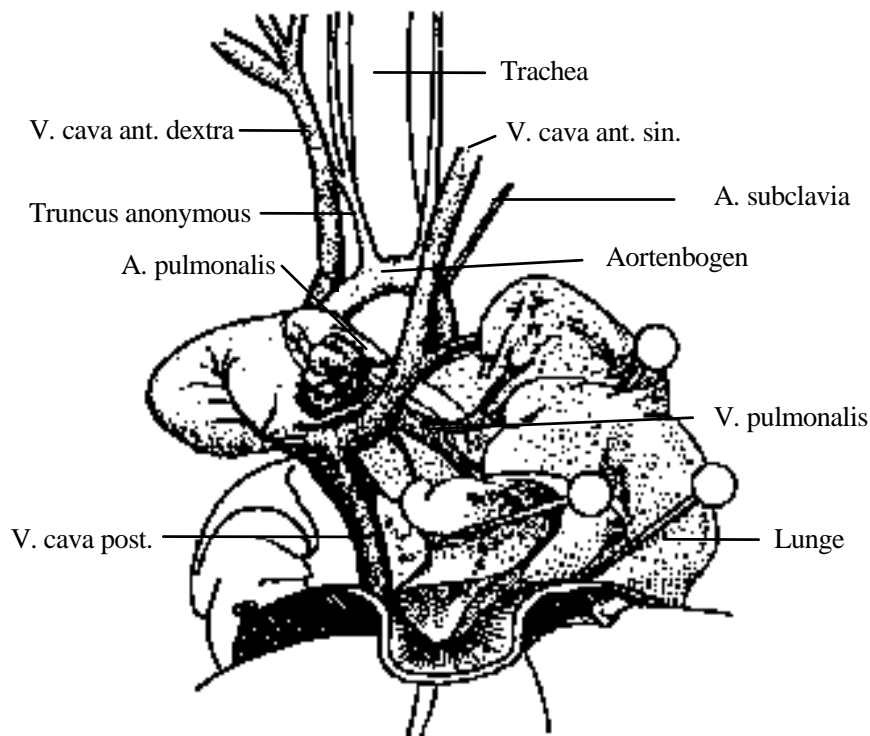


Abbildung 5 : Rattensitus nach Eröffnung des Thorax

Zunächst kontrahierte das Herz zwar noch kräftig und trieb das Blut aus den Gefäßen und Ventrikeln, nach wenigen Sekunden jedoch wurde die mechanische Aktivität eingestellt und das Herz konnte in eine zweite, identisch vorbereitete Petrischale überführt werden. Als erstes wurden die beiden Lungen und eventuell mit herausgetrennte Anteile von Luft- und Speiseröhre entfernt. Unterhalb des glasig aussehenden Thymus verlief der Gefäßstrang mit zu- und abführenden Herzgefäßen. Die Aorta ließ sich freipräparieren, indem man durch lateralen Zug mit zwei Pinzetten die beiden Thymuslappen entfernte und den Verlauf der Aorta von proximal aus verfolgte und soweit freilegte, daß der Aortenbogen und die von ihm abgehenden Gefäße gut sichtbar waren.

5.4.2.3. Perfusion des Herzens während der Isolation

Zunächst wurde die Perfusion der modifizierten Langendorff-Apparatur mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde gestartet, da die Kanülierung der Aorta unter Fluß von Nährstofflösung erfolgen sollte, um die Gefahr von Luftembolien zu minimieren. Das Lumen der Aorta wurde nun mit zwei Pinzetten geöffnet und die Aorta über die Kanüle gezogen. Dabei war die Lage der Kanüle (Abbildung 6) von

entscheidender Bedeutung. Sie sollte zwischen dem Abgang der Koronarien und dem ersten Abgang der Aorta (Truncus anonymous) platziert sein. Wurde die Kanüle zu weit vorgeschoben, bestand die Gefahr, daß die Koronarien verlegt wurden oder die Aortenklappe penetriert

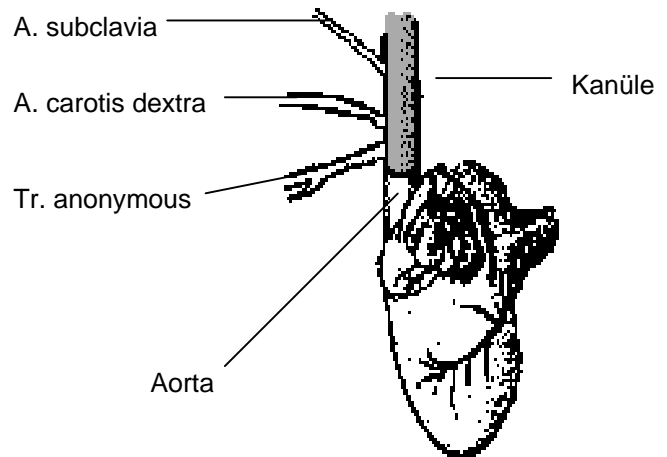


Abbildung 6: Lage der Perfusionskanüle in der Aorta

wurde. Lag die Kanüle oberhalb des ersten Abgangs, ging Nährstofflösung auf diesem Weg verloren und das Herz wurde nicht ausreichend perfundiert. Nachdem die Kanüle ordnungsgemäß platziert war, wurde das Herz mit einem Bindfaden ausreichend fixiert und für 3 Minuten mit reinem Isolationspuffer perfundiert (1 Tropfen pro Sekunde). Dabei wurden zum einem eventuell noch vorhandene Blutbestandteile entfernt, zum anderen wurde dadurch eine Senkung des extrazellulären Kalziumgehaltes erreicht.

5.4.2.4. Enzymatische Isolation

Um einzelne Myozyten aus dem Gewebeverband zu isolieren, wurde nach den drei Minuten die zuvor schon vorbereitete Enzymlösung in das obere Reservoir gegeben, das System mit Isolationspuffer auf ein Endvolumen von 75 ml aufgefüllt und auf Rezirkulation umgeschaltet. Während der 27 Minuten langen Rezirkulationsphase war darauf zu achten, daß das Herz eine homogene Färbung aufwies, als Zeichen einer gleichmäßigen Perfusion.

Am Ende der Rezirkulation wurde das Herz mit 10 ml der Perfusionslösung in eine Petrischale überführt. Die Vorhöfe wurden zunächst mit einer feinen Schere auf Klappenebene vom Herzen getrennt und die Ventrikel wurden mit Hilfe von zwei Skalpellern in zirka 1 mm³ große Stücke geschnitten. Die entstandene Zellsuspension wurde in den erwärmten Auffangbecher gegeben und zusammen mit der restlichen Perfusionslösung für 15 Minuten mit Carbogen begast. Dadurch wurde zum einen die konstante Sauerstoffversorgung weiterhin gewährleistet, zum anderen wurde die Zellsuspension dadurch "aufgewirbelt" und so die enzymatische Isolation mechanisch unterstützt. Um die Zellsuspension von größeren Gewebestücken zu befreien, wurde

die Lösung nach der enzymatischen Isolation durch ein 2 µm Nylonsieb in zwei Zentrifugenröhrchen filtriert.

Vor der Weiterverarbeitung mußten die Myozyten von Zellen anderer Herkunft, beispielsweise Fibroblasten, getrennt werden und in ein kalziumhaltiges Medium überführt werden. Dazu wurde die Zellsuspension in drei Schritten bei jeweils 300 Umdrehungen für eine Minute zentrifugiert. Die relativ großen Myozyten setzten sich unten ab, der Überstand konnte abgegossen werden und das übriggebliebene Pellet wurde in Isolationspuffer mit steigendem Kalziumgehalt resuspendiert. (1. Schritt: Isolationspuffer mit 200 µmol Ca²⁺-Gehalt; 2. Schritt: Isolationspuffer mit 500 µmol Ca²⁺-Gehalt; 3. Schritt: Versuchspuffer mit 1,2 mmol Ca²⁺-Gehalt)

5.4.2.5. Zellzählung

Zur Beurteilung der Ausbeute wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt (5 unterschiedliche Felder). Dabei wurden morphologische Kriterien angewendet. Als intakt galten Zellen, die die für Kardiomyozyten typische längliche Form sowie Querstreifung aufwiesen und sich deutlich von den abgerundeten toten Zellen differenzierten. Ermittelt wurde die Gesamtzellzahl, die Anzahl der intakten Zellen sowie das Verhältnis beider zueinander. Durchschnittlich lag die Gesamtzahl der Zellen pro Isolation bei 1,5 Millionen, der Anteil der intakten Kardiomyozyten lag bei 20-35%.

Die Isolationsmethode gewährleistete den Erhalt einer so reinen Herzmuskelzellfraktion, daß störende Effekte durch andere Zellen bei der Untersuchung ausgeschlossen werden konnten.

5.4.2.6. Zellanheftung und Färbung

Um die Zellen unter dem CLSM auf Kontraktionsverhalten und Änderungen im Kalziumtransienten untersuchen zu können, mußten sie am Boden einer Versuchskammer fixiert und mit einem Kalziumfarbstoff beladen werden.

Als Versuchskammer dienten 4-Well-Objektträger mit Borosilikatböden der Firma Nalgene Nunc International Corp., Naperville, IL, USA. Jedes Well besaß eine Grundfläche von 1,8 cm² und ein Kammervolumen von 1,5 ml. Im ersten Schritt wurden die Wells mit 10 µg/cm² Laminin (Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA) beschichtet und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im zweiten Schritt

wurden pro Well zirka 5000 Zellen, aufgenommen in 600 µl Versuchspuffer, zugegeben. Nach einer "Anheftungszeit" von einer Stunde wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt und durch Färbelösung ersetzt, welche aus Versuchspuffer mit 0,1% DMSO, 0,025% Pluronic und 5 µM Fluo-3-AM (Acetonmethylester; Sigma, Deisenhofen, Germany) hergestellt wurde. Die Kammern wurden nun für 45 Minuten auf einem Schwenktisch (30/min) im Dunkeln ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Fluo-3-AM handelte es sich um einen lichtempfindlichen, fluoreszierenden Kalziumindikatorfarbstoff, der sich für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der intrazellulären Kalziumkonzentration etabliert hatte (Kao et al.,1989). Die veresterte, lipophile Struktur des Fluo-3-AM ermöglichte dem Farbstoff die Diffusion durch die Zellmembran in die Zelle. Dort wurde er von intrazellulären Esterasen in zwei polare Produkte gespalten und dadurch am Wiederaustritt gehindert.

Nach Ablauf der Färbezeit wurde die überschüssige Farbstofflösung entfernt und die Wells wurden mit jeweils 600 ml Versuchspuffer aufgefüllt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur standen die Zellen für die Versuche zur Verfügung.

5.4.3. Messung von Kalzium-Transient und Zellverkürzung

5.4.3.1. Das Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)

Das CLSM erlaubte gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie eine dreidimensionale Schichtung von Zellen und ermöglichte die scharfe Darstellung einer einzelnen Zellebene, da außerhalb des Fokus liegende Strukturen bei der Abbildung ausgeblendet wurden. Das Prinzip des CLSM ist in Abbildung 7 dargestellt. Das Objekt in Brennebene des Objektivs wurde von einer Punktlichtquelle beleuchtet, wobei durch einen Eingangssperfilter die korrekte Wellenlänge für die Beleuchtung des Fluoreszenzfarbstoffes ausgewählt werden konnte (Anregung). Der Lichtstrahl traf zunächst auf einen dichromatischen Teilerspiegel, welcher nur Licht bis zu einer bestimmten Wellenlänge passieren ließ und Wellenlängen oberhalb dieser Grenze reflektierte. Das fluoreszenzmarkierte Präparat emittierte nun längerwelliges Licht (Emission), welches durch das Objektiv und den für diese Wellenlänge reflektierenden dichromatischen Teilerspiegel auf einen Punktlichtdetektor gelenkt wurde. Eine vorgeschaltete Lochblende ermöglichte, daß nur das von der Brennebene reflektierte Licht auf den Detektor fokussiert wurde. Licht außerhalb der eingestellten Fokusebene wurde somit ausgeblendet. Zur Darstellung des Objektes wurde dieses Punkt für Punkt

abgetastet und die Emissions-Intensität jedes Punktes mit einem Photomultiplier gemessen und elektronisch zu einem Bild zusammengesetzt.

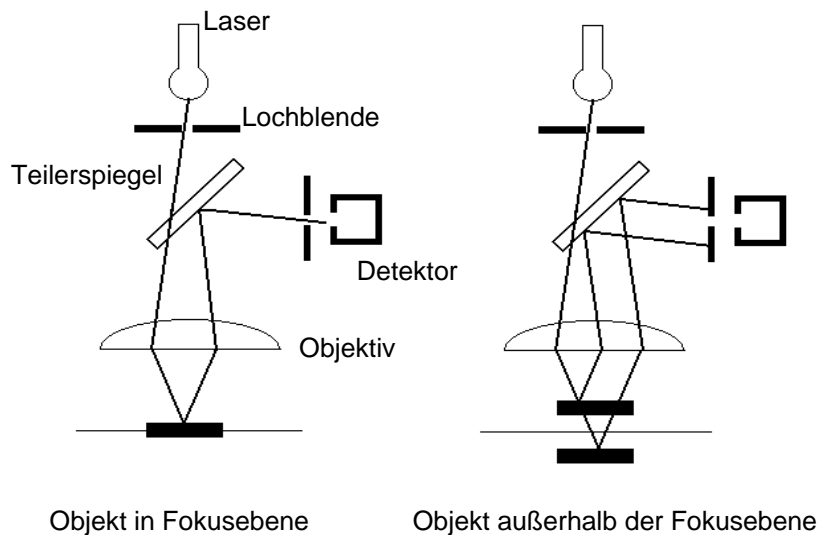


Abbildung 7: Das konfokale Prinzip

In der vorliegenden Arbeit kam ein Odyssey XL Konfokales Laserscan Mikroskop (Noran Instruments, Middleton, WI, USA) zur Anwendung. Die Zellen wurden mit einem Nikon Diaphot TDM Mikroskop (Nikon, Tokyo, Japan) und einem 40x Immersionsölobjektiv (plan apo X40, NA 1.0) betrachtet. Die Messung der kalziumabhängigen Fluoreszenz erfolgte mit einem Argonlaser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 6 mW. Die Fluoreszenzemission wurde bei Wellenlängen > 515 nm detektiert. Der Pixeldurchmesser betrug $0,26 \mu\text{m}$. Um eine hohe zeitliche Auflösung des aufgenommenen Kontraktionszyklus der Zelle zu erreichen, wurde das Vollbild der Zelle (640×480 Pixel) in vier Banden geteilt, die eine Größe von 626×114 aufwiesen und die Zelle versetzt im 8 ms Abstand aufzeichneten. Dies ermöglichte die Aufnahme einer Bilderserie mit 120 Bildern pro Sekunde. Das Programm Object-Image, eine erweiterte Version des Programms NIH-Image (Vischer et al., 1994), nahm so vier Kontraktionen während vier Sekunden auf. Die Messdaten wurden auf einer Indy-Workstation (Silicon Graphics, Mt. View, CA, USA) gespeichert und anschließend mit einem eigens für die Messungen angefertigten Makro des Programms Object-Image ausgewertet.

5.4.3.2. Versuchsablauf

Die vorbereitete Versuchskammer wurde mit einem zuführenden und einem abführenden Schlauch versehen, die gegenläufig in eine Rollerpumpe eingespannt waren. Dieser Aufbau gewährleistete, daß die Zellen während des Versuches kontinuierlich und wirbelungsarm bei einer Flußrate von 2 ml/min mit Versuchspuffer umspült wurden und ermöglichte die Zugabe des zu untersuchenden Materials. Des Weiteren wurden zwei Elektroden in die Versuchskammer gebracht, die durch elektrische Stimulation (biphasischer Impuls, Frequenz 1 Hz, Impulsdauer 5 ms, Spannung 4-8 mV) konstante, gleichförmige Kontraktionen der Zellen auslösten. Die Messung des Kalziumtransienten und der Verkürzung wurde an je einer Zelle pro Kammer durchgeführt. Der Effekt des Eluates auf den Kalziumtransienten wurde als relative Änderung der Fluo-3-Fluoreszenz (relative fluorescence units, rfu) registriert. Nachdem der Objektträger in den Strahlengang des Mikroskops positioniert und fixiert wurde, wurden die Zellen zunächst mit Hilfe der konventionellen Lichtmikroskopie betrachtet und beurteilt. Der frei drehbare Objektträgertisch des Mikroskops ermöglichte, daß die Zellen mit der Längsrichtung horizontal im Messfeld zu positionieren waren. Bei der Auswahl der geeigneten Zellen sollte beachtet werden, daß diese zum einen eine möglichst rechteckige Form mit geraden Zellrändern und zum anderen eine deutliche, für die Herzmuskelzellen typische Querstreifung aufwiesen. Ferner sollte die Zellmembran weder Blasen noch Granulationen aufweisen. Die durchschnittliche Länge sollte 70-120 µm betragen (Spielhagen et al., 2001). Diese Kriterien wurden mittels Lichtmikroskopie beurteilt. Abbildung 9 zeigt die lichtmikroskopische Ansicht der isolierten Rattenkardiomyozyten. Darüber hinaus sollte die Zelle keine spontanen Kontraktionen zeigen. Unter Stimulation jedoch sollte die Zelle gleichförmig und gut sichtbar kontrahieren und über 120 Sekunden keine Veränderungen des Kalziumtransienten und der Kontraktilität aufweisen. Wurden die genannten Kriterien erfüllt, so war davon auszugehen, daß die Zelle über weitere 10 Minuten konstant stimulierbar sein müßte. Mittels der beschriebenen Isolationsmethode konnten genügend geeignete Zellen für die Versuche bereit gestellt werden.

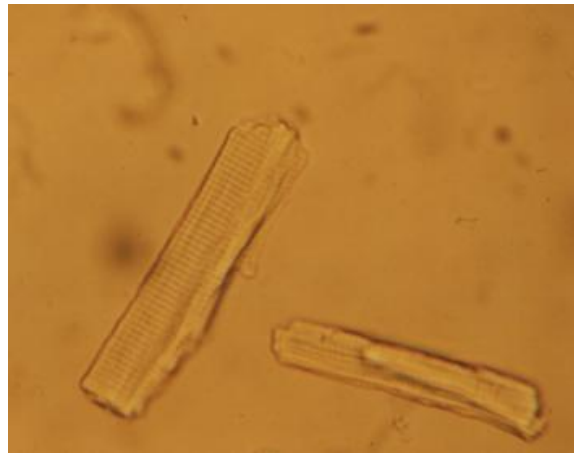


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Ansicht der isolierten Rattenkardiomyozyten in der Vergrößerung 1:800

Die ausgewählte Zelle wurde dann in den Strahlengang des Lasers gebracht und das Mikroskop wurde von Licht- auf Lasermikroskopie umgeschaltet. Der Kalziumtransient (Differenz zwischen dem systolischen und dem diastolischen Kalziumwert) und die Zellverkürzung der zu untersuchenden Zelle wurden basal sowie nach Superperfusion des Eluates mittels Messung der Fluo-3-Fluoreszenz-Intensität bestimmt. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Basisdaten der Zelle über 4 sec (480 Bilder, 4 Kontraktionen) aufgezeichnet. Nach 60 Sekunden wurde die Stabilität der Zelle erneut überprüft und bei anhaltender Stabilität 1,5 ml des zu untersuchenden Eluates zugeführt. Nach weiteren 60 Sekunden sowie nach 300 Sekunden wurde erneut über 4 sec der Kalziumtransient und die Verkürzung registriert. Das Eluat der Patienten sowie der Kontrollgruppe wurde bei einer Immunglobulin G Konzentration von 300 mg/dl untersucht.

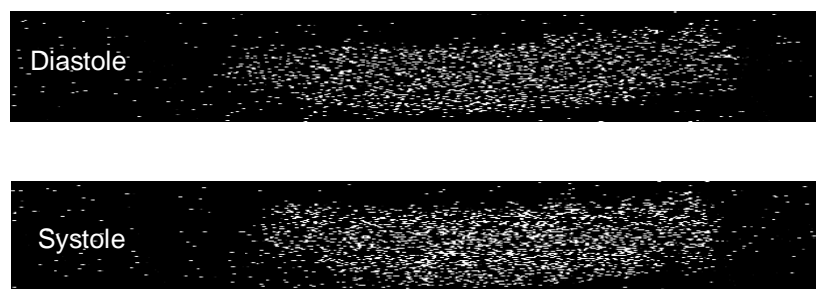


Abbildung 9: Aufzeichnung der Fluo-3-Fluoreszenz der Zelle mittels CLSM

Abbildung 9 zeigt die Fluoreszenz-Intensität der Zelle in der Diastole und in der Systole, wie sie mittels Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) aufgezeichnet wurde. In der Systole war neben der Zellverkürzung eine erhöhte Fluoreszenz-Intensität zu erkennen. Die Veränderungen dieser beiden Parameter durch Superperfusion der Rattenkardiomyozyten mit dem Eluat wurden prozentual zu den entsprechenden Basalwerten berechnet. Eine Originalregistrierung des Kalziumtransienten einer Einzelzelle ist in Abbildung 10 dargestellt.

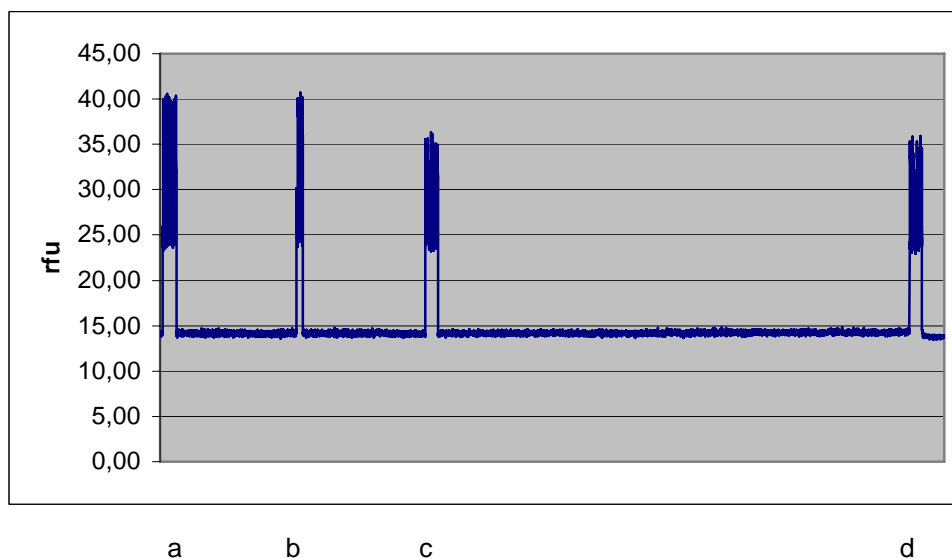


Abbildung 10: Originalregistrierung des Eluateffektes; dargestellt ist der Kalziumtransient einer Zelle, gemessen in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu)

- a) Messung der Basalwerte
- b) Überprüfung der Zellstabilität nach 60 Sekunden
- c) Messung des Effektes des Eluates nach 120 Sekunden
- d) Kontrollmessung des Eluateffektes nach 360 Sekunden

Zwischen den einzelnen Messungen wurde der Laser zum Schutz der Zelle entkoppelt. Bei dieser Registrierung handelte es sich um das Eluat eines DCM-Patienten, der Kalziumtransient sank hierbei um 18%.

5.4.3.3. Auswertung der aufgezeichneten Messung

Die Auswertung der abgespeicherten Messungen wurden an einem Apple Macintosh® G3 (Apple Computer, Cupertino, CA, USA) mit dem Programm Object-Image 1.62

ausgewertet. Dazu lud das Programm zunächst die Bilder mit den aufgezeichneten Kontraktionszyklen. Die Pixel eines Einzelbildes wurden folgend in y-Richtung linearisiert. Die linearisierten Bilder eines vom Benutzer definierten Zyklus (meist 120 Bilder) wurden dann zu einem Profilbild zusammen gesetzt. Eventuelle Ausreißer wurden vom Programm eliminiert, so daß man ein geglättetes Bild des Kontraktionszyklus erhielt. Vorhandene Unschärfen wurden aus dem Profilbild extrahiert. Aus dieser Bearbeitung resultierte eine scharfe Darstellung des Kontraktionsablaufes der Zelle. Die Intensitätswerte der Fluoreszenz jedes Bildes wurden in vertikaler Richtung summiert. Dabei entstand ein Profilbild, das die Veränderungen der Kalziumverteilung darstellte. Darüber hinaus bestimmte das Programm die Zellgrenzen und erstellte eine Linie, welche die Zellverkürzung repräsentierte. Die Kardialpunkte der Kontraktion (Maximum, Minimum, 50% der Verkürzung bzw. Relaxation) wurden bestimmt, die Werte der verschiedenen Zyklen berechnet und als Mittelwert angegeben. Daraus berechnete das Programm verschiedene Parameter, wobei für unsere Auswertung vor allem der diastolische und systolische Kalziumwert, der Kalziumtransient (alles in rfu) sowie die absolute Zellverkürzung (im μm) von Bedeutung waren. In Abbildung 11 ist der Auswertungsprozeß einer Zellkontraktion dargestellt.

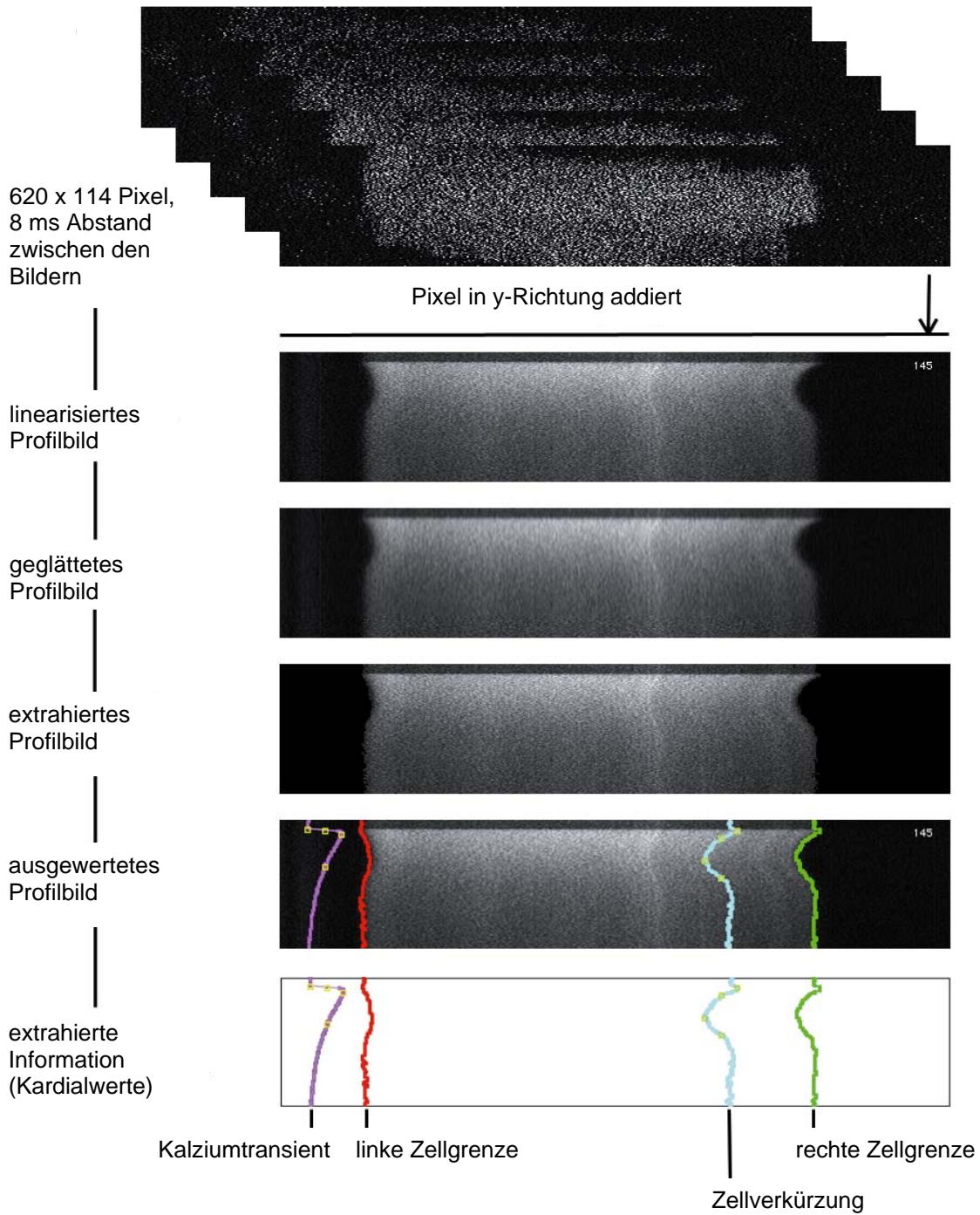


Abbildung 11: Ablauf des Auswertungsprozesses eines Kontraktionszyklus einer Zelle mit dem Programm Object-Image 1.62 (Bramlage et al., 2001)

5.5. Statistische Auswertung

Alle Daten sind, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Versuche mit isolierten Antikörpern wurden mindestens drei Mal unabhängig voneinander, d.h. aus 3 verschiedenen Proben wiederholt. Im Rahmen der Subgruppenanalyse erfolgte die Einteilung der DCM-Patienten anhand des Medianwertes. Für die Auswertung wurde die Statistik-Software SPSS verwendet. Die Signifikanztestung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, alle Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

6. ERGEBNISSE

6.1. Effekte des Eluates

Die Isolation der Rattenkardiomyozyten erbrachte im Mittel eine Zellausbeute von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen pro Herz. Der Anteil der für die Messung geeigneten Zellen lag im Durchschnitt bei 20-35%. Die Rattenkardiomyozyten erreichten basal eine Kontraktionsamplitude von $7,8 \pm 2,1\%$. Der basale zytosolische Kalziumgehalt, gemessen als Fluo-3-Fluoreszenzwert (rfu), stieg unter Ruhebedingungen im Mittel von diastolisch $40,7 \pm 10,1$ auf systolisch $81,6 \pm 28,6$ an. Als Kalziumtransient wird nachfolgend die relative Änderung zwischen dem systolischen und diastolischen rfu-Wert bezeichnet.

Unter Eluateinwirkung nahm der Kalziumtransient im Verlauf der Messung in der DCM-Gruppe um $11,1 \pm 15,3\%$, in der Kontrollgruppe um $1,2 \pm 5,4\%$ ab (Tabelle 5, Abbildung 12). Der Vergleich beider Gruppen zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Die Abnahme des Kalziumtransienten war auf eine Änderung des systolischen Kalziumgehaltes zurückzuführen, da der diastolische Kalziumgehalt sowohl bei den DCM-Patienten, als auch in der Kontrollgruppe nur geringfügig anstieg (Zunahme um $1,3 \pm 2,4\%$ bei den DCM-Patienten, um $1,5 \pm 1,8\%$ in der Kontrollgruppe; $p = 0,912$). Die Kontraktilität nahm bei den DCM-Patienten um $21,0 \pm 17,5\%$, bei den Kontrollen um $4,2 \pm 8,5\%$ ab ($p < 0,001$).

	DCM-Patienten	Kontrollen
Anzahl	100	92
Kalziumtransient	$88,9 \pm 15,3$	$98,8 \pm 5,4$
Kontraktilität	$79,0 \pm 17,5$	$95,8 \pm 8,5$

Tabelle 5: Relative Änderung des Kalziumtransienten und der Kontraktilität in % nach Superperfusion mit Eluat bei DCM-Patienten und Kontrollen ($p < 0,001$)

Ein kardiodepressiver Effekt lag vor, wenn sowohl der Kalziumtransient als auch die Kontraktilität nach Superperfusion mit dem Eluat um mindestens 10% abnahm (Staudt et al., 2004).

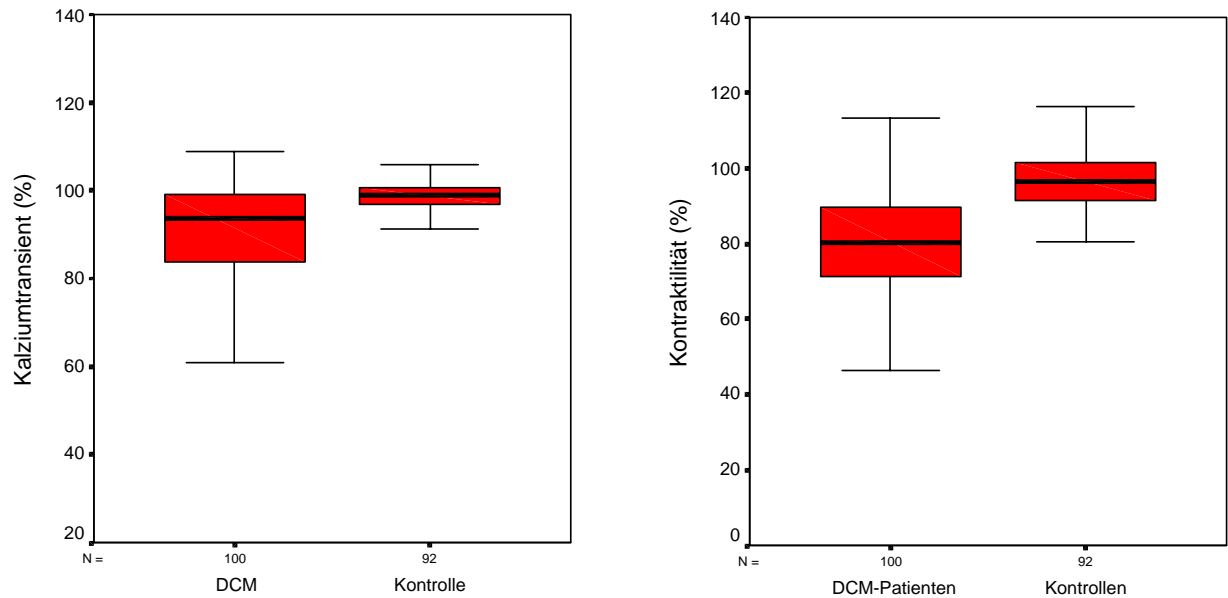


Abbildung 12: Vergleich des Kalziumtransienten und der Kontraktilität von DCM-Patienten und Kontrollgruppe nach Eluatzugabe ($p < 0,001$)

Der Effekt des Eluates stellte sich innerhalb einer Minute nach Superperfusion ein und erreichte anschließend ein stabiles Niveau. 44 DCM-Patienten wiesen eine kardiodepressive Reduktion des Kalziumtransienten sowie der Kontraktilität auf.

In der Kontrollgruppe zeigte sich im Gegensatz dazu bei nur vier Patienten ein kardiodepressiver Einfluß auf Kalziumtransienten und Kontraktilität.

Bei den DCM-Patienten zeigte sich somit in 44% der Fälle ein kardiodepressiver Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität. In der Kontrollgruppe ließ sich im Vergleich dazu lediglich in 4% der Fälle ein kardiodepressiver Effekt nachweisen.

Die prozentuale Verteilung des kardiodepressiven Effektes auf Kalziumtransient und Kontraktilität beider Gruppen ist in der Abbildung 13 graphisch dargestellt.



Abbildung 13: Vergleich des Auftretens eines kardiodepressiven Effektes des Eluates auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität bei DCM-Patienten und Kontrollen (prozentualer Anteil der Gesamtzahl) ($p < 0,001$)

Zwischen den DCM-Patienten und Kontrollen besteht ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Eluatwirkung auf Kalziumtransient und Kontraktilität.

6.2. Vergleich der einzelnen Subgruppen bei den DCM-Patienten

6.2.1. Einfluß des Geschlechts der DCM-Patienten auf den kardiodepressiven Effekt

Die Gesamtzahl der DCM-Patienten wurde entsprechend ihres Geschlechts in zwei Gruppen unterteilt. Dabei sollte die Wirkung des Eluates auf den Kalziumtransienten sowie auf die Kontraktilität beider Gruppen gegenüber gestellt werden. Bei den 82 männlichen Patienten nahm der Kalziumtransient unter Eluat-Einfluß um $10,8 \pm 15,5\%$, die Kontraktilität um $20,6 \pm 17,0\%$ ab. Insgesamt wiesen 33 männliche Patienten einen kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität auf. Im Gegensatz dazu nahm der Kalziumtransient bei den 18 untersuchten Frauen um $12,4 \pm 15,5\%$ ab, die Kontraktilität um $22,8 \pm 19,3\%$. Insgesamt wurde ein kardiodepressiver Effekt auf Kalziumtransient und Kontraktilität bei 11 DCM-Patientinnen gemessen. In den Abbildungen 14 und 15 werden die Ergebnisse graphisch veranschaulicht.

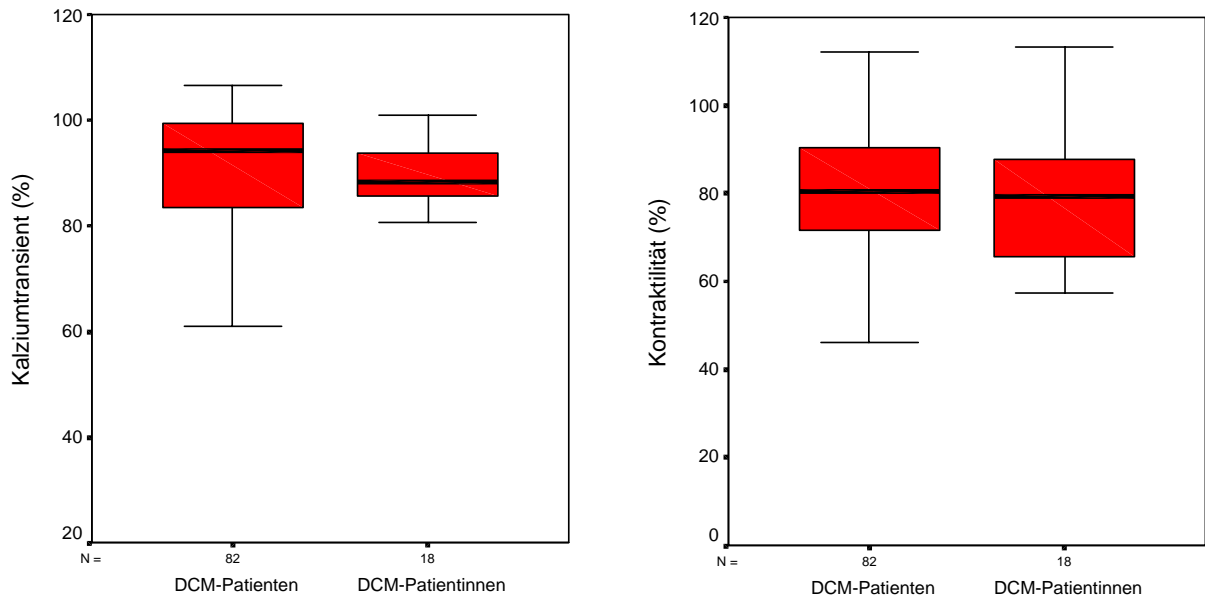


Abbildung 14: Vergleich des Kalziumtransienten ($p=0,176$) und der Kontraktilität ($p=0,588$) bei den DCM-Patienten und DCM-Patientinnen

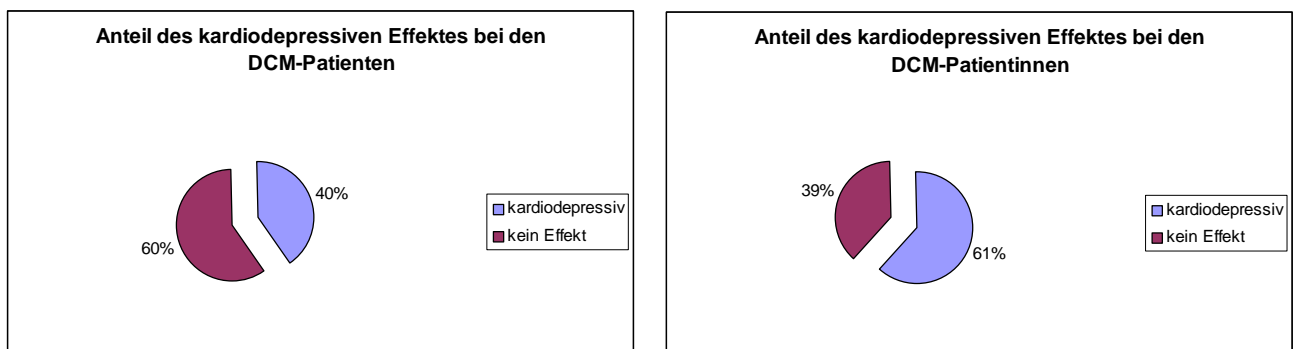


Abbildung 15: Prozentualer Anteil eines kardiodepressiven Effektes auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität bei DCM-Patienten und – Patientinnen

Der Vergleich beider Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied für die Wirkung des Eluates auf den Kalziumtransienten sowie die Kontraktilität.

6.2.2. Einfluß des Alters der DCM-Patienten auf den kardiodepressiven Effekt

Das Alter der DCM-Patienten variierte zwischen 19 und 77 Jahren, der Median lag bei 54 Jahren. Er diente zur Einteilung der DCM-Patienten in zwei Altersgruppen, um den Einfluß des Alters auf die Veränderung des Kalziumtransienten sowie die Kontraktilität näher zu untersuchen. Bei den DCM-Patienten, die jünger als 54 Jahre sind, nahm der Kalziumtransient im Mittel um $13,0 \pm 17,7\%$, die Kontraktilität um $21,6 \pm 20,3\%$ ab. 25 Patienten dieser Gruppe wiesen einen kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität. Im Gegensatz dazu nahm der Kalziumtransient bei den DCM-Patienten, die 54 Jahre oder älter sind, um $9,2 \pm 12,3\%$ ab, die Kontraktilität sank um $20,5 \pm 14,2\%$. In dieser Gruppe zeigten 19 Patienten einen kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität (Abbildung 16 und 17).

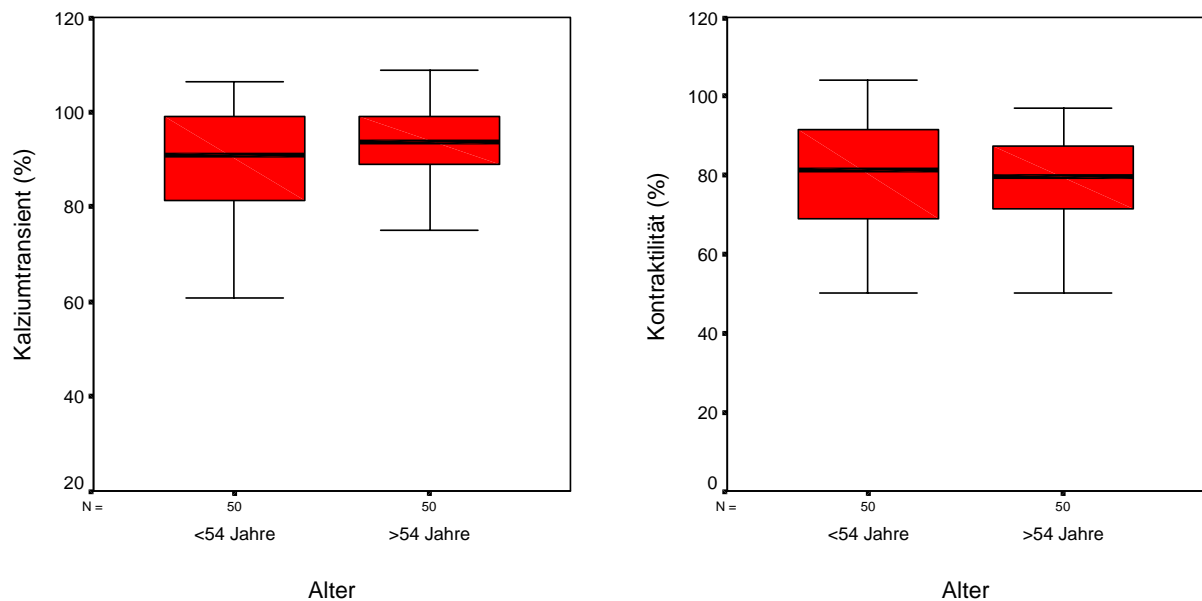


Abbildung 16: Einfluß des Eluates auf den Kalziumtransienten ($p=0,576$) sowie auf die Kontraktilität ($p=0,465$) bei DCM-Patienten, die jünger als 54 Jahre bzw. 54 Jahre und älter sind

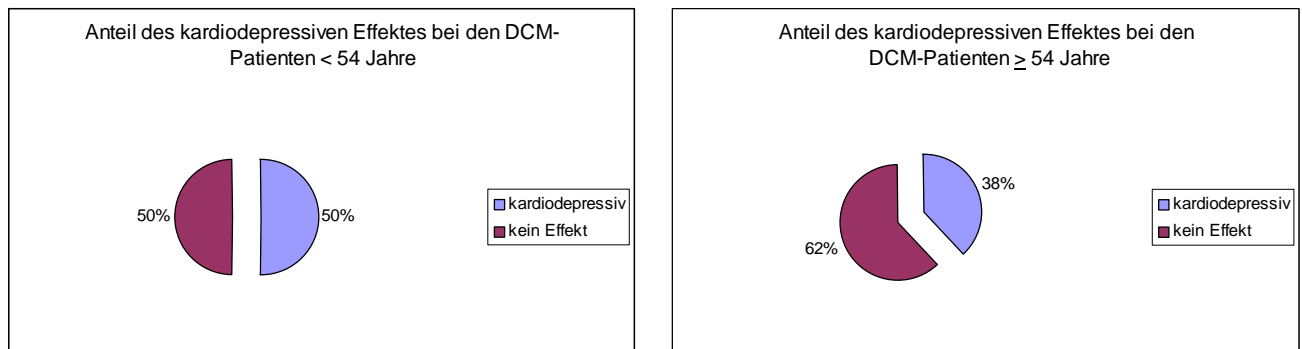


Abbildung 17: Verteilung der kardidepressiven Effekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität in Abhängigkeit vom Alter der DCM-Patienten

Bei der Verteilung der kardidepressiven Effekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Altersgruppen ermittelt werden.

6.2.3. Einfluß der Krankheitsdauer auf den kardidepressiven Effekt

Die Krankheitsdauer der DCM-Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung lag zwischen null und 13 Jahren. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer lag bei $3,6 \pm 2,7$ Jahren, der Median betrug drei Jahre und diente als Richtwert zur Einteilung der DCM-Patienten in zwei Gruppen. Bei DCM-Patienten mit einer Erkrankungsdauer von weniger als drei Jahren nahm der Kalziumtransient um $12,9 \pm 18,6\%$, die Kontraktilität um $22,1 \pm 21,8\%$ ab. Im Vergleich dazu nahm bei DCM-Patienten mit einer Erkrankungsdauer von drei oder mehr Jahren der Kalziumtransient um $9,7 \pm 11,6\%$, die Kontraktilität um $20,0 \pm 12,3\%$ ab. Abbildung 18 stellt den Eluat-Einfluß auf Kalziumtransient und Kontraktilität in beiden Gruppen gegenüber.

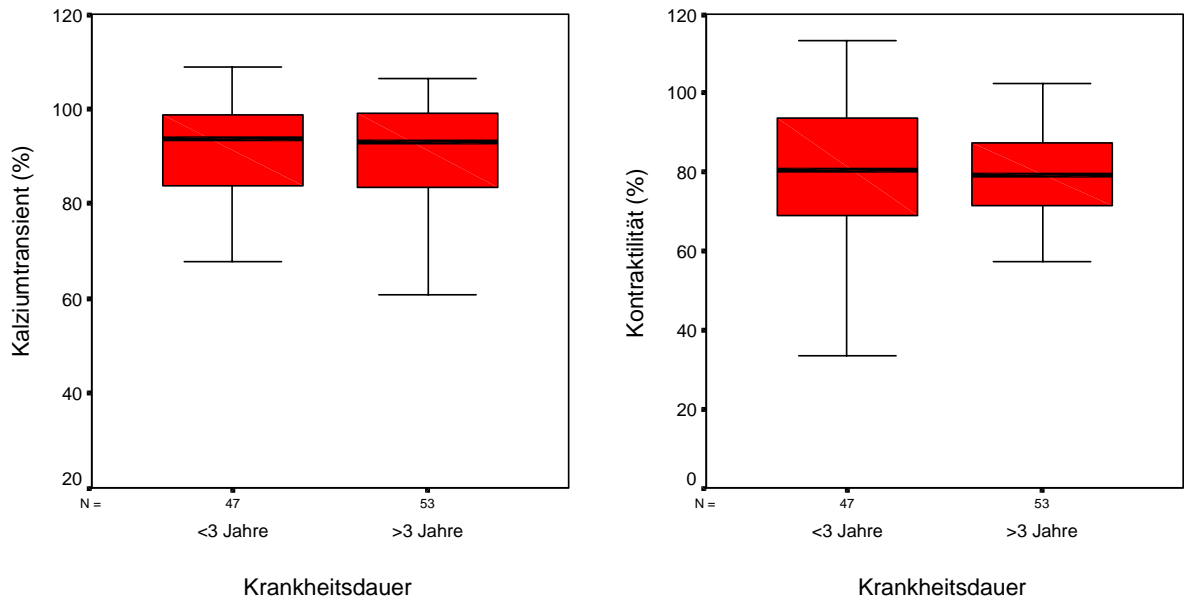


Abbildung 18: Vergleich des Kalziumtransienten ($p=0,803$) und der Kontraktilität ($p=0,629$) bei DCM-Patienten mit einer Erkrankungsdauer unter drei Jahre sowie von drei Jahren und länger

Von den 47 DCM-Patienten mit einer Erkrankungsdauer unter drei Jahren zeigten 23 Patienten einen kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität. 53 DCM-Patienten waren bereits drei Jahre oder länger erkrankt. Bei 21 von ihnen wurde ein kardiodepressiver Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität beobachtet. Abbildung 19 stellt die prozentuale Verteilung des kardiodepressiven Effektes beider Gruppen gegenüber.

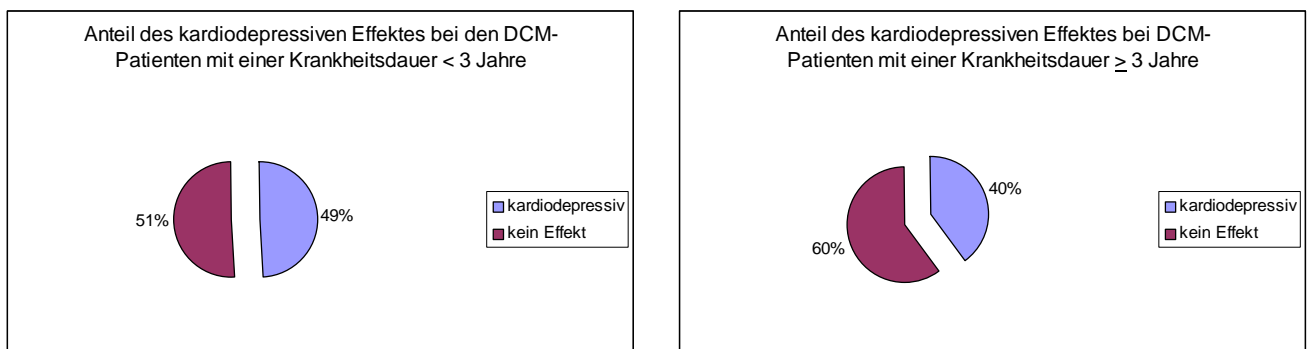


Abbildung 19: Prozentualer Anteil der kardiodepressiven Effekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer

Der Vergleich beider DCM-Patientengruppen hinsichtlich der Krankheitsdauer ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied für das Auftreten eines kardiodepressiven Effektes bei der Testung des Eluates an Rattenkardiomyozyten.

6.2.4. Einfluß der LVEF der DCM-Patienten auf den kardiodepressiven Effekt

Als weiterer Parameter zur klinischen Charakterisierung der Patienten wurde die echokardiographisch ermittelte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) verwendet. Der Median diente erneut zur Einteilung in zwei Patientengruppen aus jeweils 50 DCM-Patienten, die LVEF betrug $\leq 22\%$ bzw. $> 22\%$. In der ersten Gruppe (LVEF $\leq 22\%$) nahm der Kalziumtransient unter Eluat-Einfluß um $9,9 \pm 13,3\%$, die Kontraktilität um $19,6 \pm 16,2\%$ ab. Dem gegenüber steht eine Abnahme des Kalziumtransienten um $13,8 \pm 17,0\%$ sowie der Kontraktilität um $23,6 \pm 18,5\%$ in der zweiten Patientengruppe (LVEF $> 22\%$). Abbildung 20 stellt den Kalziumtransienten und die Kontraktilität unter Eluat-Einfluß in beiden Gruppen gegenüber.

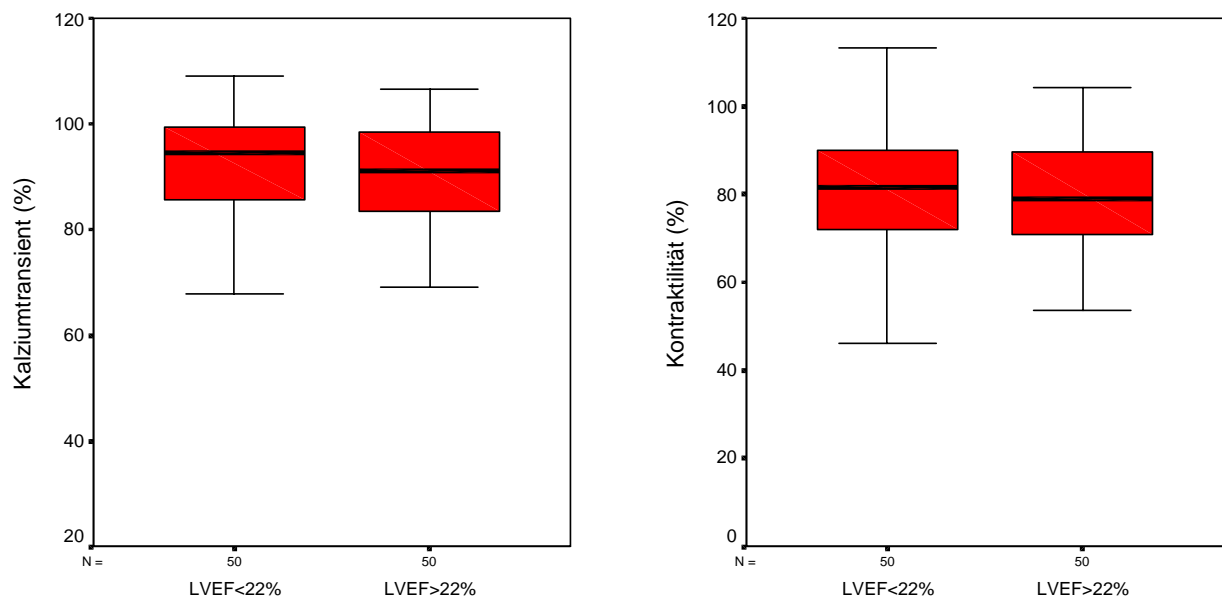


Abbildung 20: Einfluß des Eluates auf den Kalziumtransienten ($p=0,380$) sowie auf die Kontraktilität ($p=0,762$) der DCM-Patienten, die eine LVEF $\leq 22\%$ bzw. $> 22\%$ aufwiesen

In der Patientengruppe mit einer LVEF $\leq 22\%$ zeigte das Eluat von 19 Patienten einen kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität. In der anderen Gruppe mit einer LVEF $> 22\%$ ließ sich in 25 Fällen ein kardiodepressiver Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität beobachten. In Abbildung 21 ist prozentuale Verteilung der kardiodepressiven Effekte des Eluates auf Kalziumtransienten und Kontraktilität in Abhängigkeit von der LVEF dargestellt.

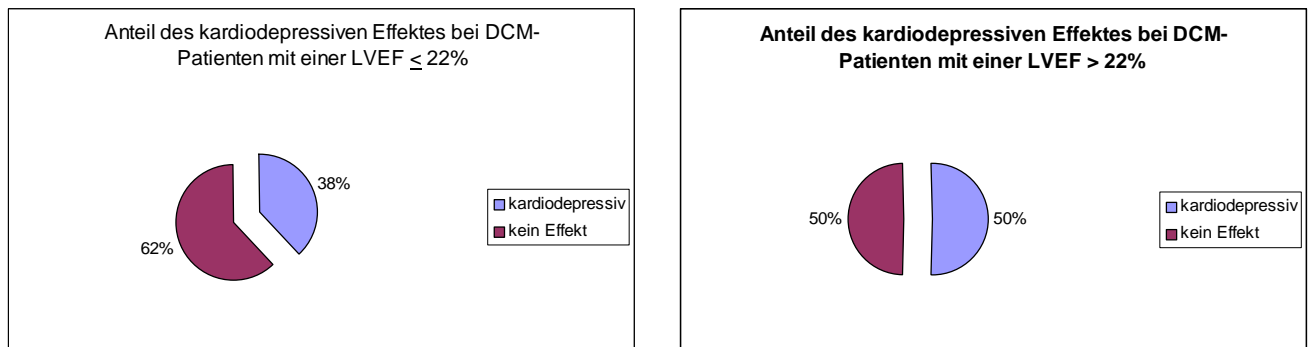


Abbildung 21: Eluateffekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität bei DCM-Patienten mit einer LVEF $\leq 22\%$ bzw. $> 22\%$

Die Untersuchungen zeigten, daß kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden DCM-Subgruppen besteht. Die Höhe der aktuellen LVEF scheint somit nicht mit dem Vorkommen eines kardiodepressiven Antikörpers in Zusammenhang zu stehen.

6.2.5. Einfluß des LVEF-Verlaufes während des letzten Jahres

Bei 83 der insgesamt 100 untersuchten DCM-Patienten war es anhand von vorherigen echokardiographischen Untersuchungsergebnissen möglich, den Verlauf der LVEF innerhalb des letzten Jahres zu ermitteln. Dabei wurden die DCM-Patienten in zwei Subgruppen unterteilt, wobei der einen Gruppe die Patienten zugeteilt wurden, deren LVEF-Wert im Vergleich zur Voruntersuchung konstant geblieben bzw. sich verbessert hatte (positiver LVEF-Verlauf), während sich die andere Gruppe aus Patienten zusammensetzte, deren LVEF sich verschlechtert hat (negativer LVEF-Verlauf). Durch Gegenüberstellung beider Subgruppen sollte untersucht werden, ob der zeitliche Verlauf der LVEF einen Einfluß auf die Wirkung des Eluates hat.

Bei den 42 DCM-Patienten mit positivem LVEF-Verlauf nahm der Kalziumtransient im Mittel um $8,0 \pm 13,5\%$ und die Kontraktilität um $16,4 \pm 15,0\%$ ab. Im Gegensatz dazu verringerte sich der Kalziumtransient bei den 41 DCM-Patienten mit negativem LVEF-Verlauf um $15,7 \pm 15,3\%$ und die Kontraktilität um $26,5 \pm 16,8\%$. Abbildung 22 stellt die unter Eluat-Einfluß gemessenen Werte des Kalziumtransienten und der Kontraktilität beider Gruppe gegenüber.

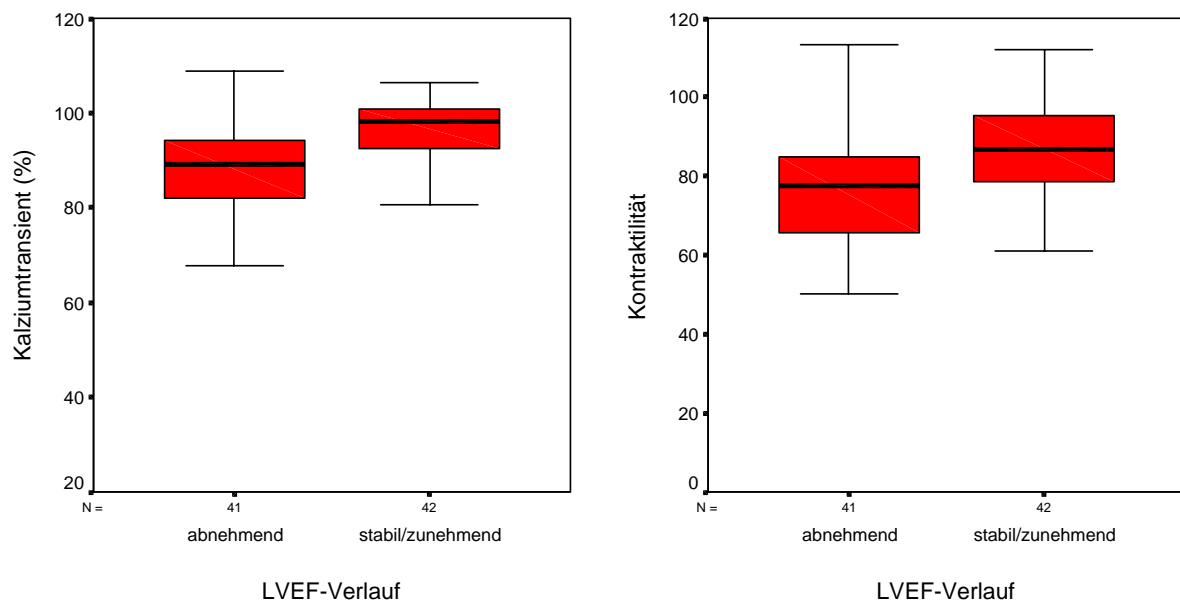


Abbildung 22: Verteilung des Kalziumtransienten und der Kontraktilität in Abhängigkeit vom Verlauf der LVEF innerhalb des letzten Jahres ($p < 0,001$)

Das Eluat der 42 Patienten mit einem positiven LVEF-Verlauf bewirkte bei 10 Patienten einen kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität. Im Vergleich dazu ließ sich bei den 41 Patienten mit einem negativen LVEF-Verlauf in 23 Fällen ein kardiodepressiver Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität beobachten. Die Abbildung 23 stellt die prozentuale Verteilung der kardiodepressiven Effekte gegenüber.

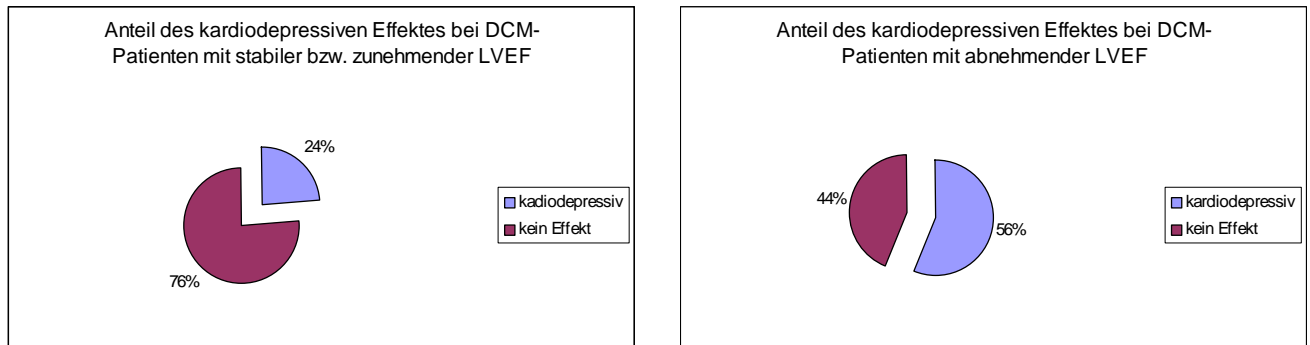


Abbildung 23: Prozentualer Anteil der kardiodepressiven Effekte auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität in Abhängigkeit von dem Verlauf der LVEF innerhalb des letzten Jahres ($p < 0,001$)

Beim Vergleich der beiden Subgruppen konnte ein statisch signifikanter Unterschied für den Einfluß des Eluates sowohl auf den Kalziumtransienten als auch auf die Kontraktilität festgestellt werden.

7. DISKUSSION

Bei der DCM kommen kardiodepressiv wirkende Antikörper vor, die durch eine Immunadsorption aus dem Patientenplasma entfernt werden können. Diese Antikörper bewirken bei der Testung an isolierten Rattenkardiomyozyten eine Abnahme der Zellverkürzung und des Kalziumtransienten (Felix et al., 2002).

Das Ziel dieser Arbeit ist zum einen, den prozentualen Anteil funktionell aktiver Antikörper bei Patienten mit DCM zu ermitteln, zum anderen der Versuch klinische Merkmale zu identifizieren, die mit dem Auftreten kardiodepressiver Antikörper assoziiert sind. Da die Immunadsorption ein aufwendiges Therapieverfahren ist, wären prädiktive klinische Parameter wünschenswert, die eine Aussagen darüber ermöglichen, ob ein Patient von der Immunadsorption profitiert oder nicht.

7.1. Kardiotrope Faktoren im Eluat

Die Immunadsorption stellt ein neues Therapieverfahren bei der DCM dar, das durch den Entzug von Antikörpern aus dem Patientenplasma zur hämodynamischen und klinischen Verbesserung der Herzinsuffizienzsymptomatik führt (Dörffel et al., 1997; Felix et al., 2000; Staudt et al., 2004). In Anlehnung an die in-vivo durchgeführte Immunadsorption wurde eine Methode entwickelt, mit der im Labor Antikörper aus dem Patientenplasma extrahiert werden können. Das mittels dieser Methode gewonnene Eluat wurde für experimentelle Untersuchungen an isolierten Rattenkardiomyozyten eingesetzt. Schwerpunkt dieser Versuche war es, den Einfluß des Eluates auf den zellulären Kalziumstoffwechsel, sprich auf den systolischen und diastolischen Kalziumgehalt, sowie auf die Kontraktilität zu untersuchen. Die Messung dieser Parameter erfolgte mittels Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM). Anhand dieser Versuche konnte erstmals in einer großen Patientenpopulation (n=100) gezeigt werden, daß das Eluat der untersuchten DCM-Patienten einen schnell einsetzenden, kardiodepressiven Effekt sowohl auf den Kalziumtransienten als auch auf die Zellverkürzung (n=44) hatte. Die Wirkung auf den Kalziumtransienten wurde durch Reduktion des systolischen Kalziumgehalt verursacht, der diastolische Kalziumwert blieb unbeeinflusst. Es zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zu den Eluaten einer Kontrollgruppe (n=92) ohne DCM.

Die in dieser Arbeit verwendete Methodik wurde bereits mehrfach in ähnlicher Form zur Isolation von Antikörpern aus dem Plasma von DCM-Patienten verwendet (Dörffel et al., 1997, Felix et al., 2000 und 2002, Staudt et al., 2001, 2002 und 2004). Staudt et al. (2004) untersuchten in einer Studie das mittels Immunadsorption gewonnene Eluat von 45 DCM-Patienten an isolierten Rattenkardiomyozyten. Dabei wiesen sie in 64% einen kardiodepressiven Effekt auf Kalziumtransient und Kontraktilität nach. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nur in 44% ein kardiodepressiver Einfluß auf beide kontraktile Parameter. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der beiden Befunde kann in Unterschieden der untersuchten Patientenpopulation liegen. So untersuchten Staudt et al. Patienten mit deutlich fortgeschrittenerem Krankheitsverlauf und einer LVEF von < 30%, während in dieser Arbeit auch asymptomatische DCM-Patienten mit LVEF bis 50% eingeschlossen wurden.

In der Literatur sind bei der DCM vielfältige Antikörper gegen kardiale Strukturen beschrieben worden. Diese beeinflussen neben dem Kalziumstoffwechsel der Myozyten (β_1 -Rezeptor, muskarinergere Rezeptor, L-Typ-Kalziumkanal) auch direkt die kontraktile Proteine (Wallukat et al., 1987; Limas et al., 1989; Fu et al., 1993; Schultheiss et al., 1988; Caforio et al., 1992; Latif et al., 1991).

Die Immunadsorption bedeutet an sich schon eine spezifische Eliminierung von Antikörpern aus dem Patientenplasma. Ein Vergleich der Immunglobulinspiegel im Patientenplasma vor und nach der Immunadsorption zeigt, daß der Plasmaspiegel durch diese Behandlung auf etwa 20% des Ausgangsniveaus fällt (Felix et al., 2002). In-vivo Untersuchungen zur Ig-Therasorb-Säule zeigen eine Abnahme der IgG-Konzentration auf ungefähr 3%, der IgA- und IgM-Konzentration auf etwa 30% des Ausgangswertes (Müller-Derlich et al., 1993). Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß sich im Eluat nach der Behandlung mit Sepharose (Ig-Therasorb) auch noch weitere Nichtimmunoglobulin-Faktoren befinden, zumal mittels turbidimetrischer Proteinbestimmung neben IgG, IgA und IgM auch Albumin und weitere Gesamtproteine nachgewiesen wurden.

Zur näheren Charakterisierung der kardiodepressiv wirkenden Faktoren des in dieser Arbeit verwendeten Eluates wurde eine Dialyse gegen Versuchspuffer zunächst mit einer Dialysemembran >100 KD durchgeführt. Dadurch konnte zum einen davon ausgegangen werden, daß die kardiodepressiven Faktoren ein Molekulargewicht größer 100 KD haben. Zum anderen konnte dadurch sichergestellt werden, daß eventuell bei der Immunadsorption mitentfernte herzwirksame Pharmaka wie z. B. Amiodaron nicht

für die Beeinträchtigung der Kardiomyozyten verantwortlich sind, da diese ein Molekulargewicht in der Größenordnung von etwa 0,1 bis 1 KD besitzen. Darüber hinaus wurde durch die Dialyse ausgeschlossen, daß die kardiodepressiven Effekte durch Elektrolytverschiebungen zustande kommen, da das Eluat gegen den Versuchspuffer dialysiert wurde, in dem auch die Kardiomyozyten aufgenommen wurden.

In einem zweiten Schritt wurde das Eluat für 30 Minuten auf 56° Celsius erwärmt. Auf diese Weise wurden die Komplementfaktoren inaktiviert und so sichergestellt, daß der kardiodepressive Effekt nicht Folge einer Zellschädigung durch Aktivierung von Komplementfaktoren ist.

Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, daß Zytokine ebenfalls eine kardiodepressive Wirkung besitzen. Untersuchungen an spontan schlagenden Kardiomyozyten zeigten, daß die Perfusion dieser Zellen mit Zytokinen (IL-1, IL-2, IL-3, TNF) zu Arrhythmien und einer Abnahme der Kontraktilität führten (Weisensee et al., 1993). Yokoyama et al. (1993) konnten ebenfalls nachweisen, daß TNF alpha an isolierten Kardiomyozyten und am intakten Herzen einen negativ inotropen Effekt bewirkte, welcher durch eine Abnahme des systolischen Kalziumwertes bedingt war. Dieser Effekt zeigte eine Dosis- und Zeitabhängigkeit. Im Plasma von DCM-Patienten konnte im Vergleich zu Kontrollprobanden eine erhöhte Zytokinkonzentration gemessen werden (Matsumori et al., 1994). Felix et al. (2000) untersuchten aufgrund dieser Ergebnisse die Konzentrationen von verschiedenen Zytokinen im mittels Immunadsorption gewonnenem Eluat der DCM-Patienten. Dabei zeigte sich jedoch, daß diese unter der Nachweisgrenze lagen. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß bei der Immunadsorption keine oder nur in sehr geringem Ausmaß Zytokine entfernt werden. Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß Zytokine nicht für den in dieser Arbeit gemessenen kardiodepressiven Effekt verantwortlich sind.

Felix gelang eine weitere Charakterisierung der Faktoren mit Hilfe von Protein A (Felix et al., 2002). Protein A bindet relativ spezifisch Immunglobuline der IgG-Klasse aber auch schwach IgM und IgA (Lindmark et al., 1983). Für diesen Versuch wurde das bei der Immunadsorption gewonnene Eluat mit einer 0,5 KD Dialysemembran dialysiert wurde und mit einer Protein A-Säule erneut immunadsorbiert. Zum einen wurde der Protein A-Überstand an den Kardiomyozyten getestet, zum anderen der von Protein A gebundene und wieder eluierte Anteil des Eluates. Dabei zeigte sich, daß sich die kardiodepressiv wirkenden Faktoren nur im vom Protein A gebundenen Anteil des

Eluates befinden, nicht aber im Überstand. Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei den kardiodepressiven Faktoren um zirkulierende Antikörper handelt. Ferner konnte auf diese Weise auch die Frage geklärt werden, ob nicht auch Faktoren <100 KD, die bei der bisherigen Betrachtung des Eluates außer Acht gelassen wurden, für den Einfluß auf die isolierten Kardiomyozyten verantwortlich gemacht werden können. Da sich diese Faktoren nach der Behandlung im Protein A-Überstand befanden, welcher ja die Zellen nicht beeinflußt hat, liegt der Schluß nahe, daß auch Faktoren <100 KD nicht den beschriebenen kardiodepressiven Effekt bewirken. Da bei dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren der Eluatgewinnung das Patientenplasma auf ähnliche Art und Weise und mit den selben Materialien bearbeitet wird wie bei der Immunadsorption in der Klinik, lassen sich die oben erwähnten Kenntnisse auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragen.

Zusammenfassend läßt sich nach diesen Untersuchungen annehmen, daß die beschriebenen kardiodepressiven Faktoren ein Molekulargewicht von >100 KD haben müssen, sich durch Sepharose bzw. Protein A binden lassen und demnach wahrscheinlich Immunglobuline sind. Diese Immunglobuline wirken nach den Ergebnissen dieser Arbeit wahrscheinlich über mehrere unterschiedliche Angriffspunkte kardiodepressiv auf adulte Kardiomyozyten der Ratte. Im folgenden Abschnitt soll auf bisher beschriebene Wirkmechanismen von Antikörpern bei DCM näher eingegangen werden.

7.2. Kardiotrope Antikörper bei Dilatativer Kardiomyopathie

Die DCM ist eine Erkrankung des Herzmuskels, die durch eine eingeschränkte Kontraktilität und eine Dilatation des linken und eventuell auch rechten Ventrikels gekennzeichnet ist (Richardson et al., 1996). Als Ursache der Erkrankung werden verschiedene pathogenetische Faktoren diskutiert (Richardson et al., 1996). Da bereits eine Vielzahl von zirkulierenden Antikörpern, die sich gegen kardiale Proteine richten, im Serum von DCM-Patienten beschrieben wurden, liegt der Verdacht nahe, daß bei der Pathogenese der DCM autoimmune Reaktionen eine wesentliche Rolle spielen könnten. Allerdings ist bislang die genaue pathophysiologische Rolle dieser kardiotropen Antikörper noch nicht geklärt. Zum einen können sie als inflammatorische Reaktion auf den Zelluntergang gebildet werden und müßten somit als Epiphänomen betrachtet werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß die Antikörper eine aktive

Rolle bei der Initiation oder Progression der Erkrankung spielen. Diese Annahme wird durch Untersuchungen bestätigt, welche die Entwicklung einer DCM nach Induktion kardiotroper Antikörper zeigten. Matsui et al. (1997) injizierten synthetische Peptide, die mit der Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Schleife des β_1 -Adrenoceptors bzw. des m_2 -muskarinergen Rezeptors korrespondieren, in Kaninchen. Im Serum der immunisierten Kaninchen konnten im Verlauf der Studie erhöhte Antikörpertiter bestimmt werden. Parallel dazu konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Dilatation der Ventrikel nachgewiesen werden. Funktionelle Untersuchungen belegten bereits die Wirkung kardiotroper Antikörper auf Kardiomyozyten. So zeigten β_1 -Autoantikörper einen positiv chronotropen Effekt auf neonatale Rattenkardiomyozytenkulturen, welcher durch Zugabe von Betablockern antagonisierbar war (Wallukat et Wollenberger, 1987). Diese β -Autoantikörper sind gegen Epitope der ersten und zweiten extrazellulären Schleife des β_1 -Adrenoceptors gerichtet (Wallukat et al., 1995) und bewirken den β -adrenergen agonistischen Effekt über die β -Adrenoceptor-Adenylatzyklase-Protein A-Kaskade (Wallukat et al., 1996). Die Literaturangaben über die Prävalenz dieser Autoantikörper variieren je nach Bestimmungsmethode von 31 bis 95% bei DCM-Patienten und von 0 bis 16% bei gesunden Kontrollprobanden. Limas et al. (1989) konnten mittels RIA bei 40% der DCM-Patienten den β -Antikörper nachweisen, Magnusson et al. (1990) ermittelten eine Prävalenz des β -Antikörpers bei 31%. Wallukat et al. (1991) wiesen den β -Antikörper bei 95% der DCM-Patienten durch die funktionelle Testung an neonatalen Rattenmyozytenkulturen nach. Neben aktivierenden Effekten auf den β -adrenergen Rezeptor wurde auch ein hemmender Einfluß beschrieben (Limas et al., 1990). Eine weitere Studie untersuchte, ob diese bislang nur an synthetischen Rezeptorpeptiden beschriebenen Effekte auch an nativen humanen β -adrenergen Rezeptoren auftreten. 51% der untersuchten Patienten wiesen β -Antikörper auf, die gegen synthetische Rezeptoren gerichtet sind, jedoch nur 26% erkannten native Rezeptorproteine, die in der Zellmembran lokalisiert waren und bewirkten so einen Anstieg der cAMP-Konzentration (Jahns et al., 1999). Des Weiteren wurde in dieser Studie ein Zusammenhang zwischen der Prävalenz des β -Antikörpers und der klinischen Symptomatik nachgewiesen. Patienten, die diesen Antikörper besaßen, hatten eine schlechtere linksventrikuläre Ejektionsfraktion sowie einen geringeren Herzindex als diejenigen, bei denen kein β -Antikörper nachweisbar war. In einer weiteren Versuchsreihe immunisierten Jahns et al. (2004) Ratten gegen extrazelluläre Bestandteile des kardialen β_1 -adrenergen Rezeptors. Zunächst bildeten die Ratten

Antikörper gegen diesen Rezeptor, im weiteren Verlauf entwickelten die Tiere eine linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion mit dem Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie. Als weiterer Hinweis, daß β_1 -adrenerge Antikörper in der Vermittlung dieses Effektes ursächlich beteiligt waren, diente die Beobachtung, daß es nach Isolierung der Antikörper aus erkrankten Tieren und nachfolgender Injektion in gesunde Tiere erneut zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie kam (Jahns et al., 2004).

Bei Patienten mit DCM konnte durch Entfernung von Immunglobulinen mittels Immunadsorption eine deutliche Besserung der klinischen Parameter dokumentiert werden (Felix et al. 2000, Staudt et al. 2004). Die gewonnenen Eluate zeigten einen deutlichen und mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbaren kardiodepressiven Effekt auf adulte Kardiomyozyten der Ratte. Somit könnten β_1 -Autoantikörper im Eluat eine Rolle bei dem Auftreten der kardiodepressiven Effekte spielen. Um den möglichen Einfluß bei unseren Versuchen näher zu untersuchen, wurde in Vorversuchen das mittels Immunadsorption gewonnene Eluat von neun Patienten, die einen kardiodepressiven Effekt aufwiesen, unter Anwesenheit von Metoprolol getestet. Es zeigte sich jedoch keine zusätzliche Modulation des kardiodepressiven Effektes durch Metoprolol (Felix et al., 2000). Daher erscheint die Beteiligung von β_1 -Autoantikörper an den akuten kardiodepressiven Effekten des Eluates wenig wahrscheinlich.

Ein weiterer Autoantikörper, der die Funktion von Kardiomyozyten beeinflusst, ist der von Fu et al. (1993) bei der DCM beschriebene muskarinerge Antikörper. 38% der von ihm untersuchten DCM-Patienten wiesen im Serum Autoantikörper auf, die gegen die zweite extrazelluläre Schleife des humanen muskarinergen Acetylcholinrezeptor gerichtet waren. Bei Versuchen an der Membran eines Rattenventrikels bewirkte der Antikörper eine Abnahme der maximalen Bindungsstellen sowie eine Zunahme der Radioligandenbindung. Dieser Effekt ließ sich blocken, in dem die Membran zuvor mit Atropin inkubiert wurde, wohingegen eine Präinkubation mit Carbachol keinen Einfluß auf den Wirkmechanismus des Antikörpers hatte. Ferner zeigte die Studie, daß ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von muskarinergen und von β -Antikörpern bei DCM-Patienten besteht. Untersuchungen an kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten ergaben, daß der m_2 -Antikörper analog zu dem muskarinergen Rezeptoragonisten Carbachol einen negativ chronotropen Effekt aufwies. Allerdings unterschieden sich die Wirkungen des Antikörpers und des Carbachols dahingehend, daß der Antikörper im Vergleich zum Agonisten Carbachol zu

keiner Desensibilisierung führte. Die negativ chronotrope Wirkung des m_2 -Antikörper war nicht auswaschbar, ließ sich aber durch Atropin wieder aufheben (Wallukat et al., 1999). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, daß der m_2 -Antikörper nach Bindung an den myokardialen muskarinergen Rezeptor über eine Erhöhung des cGMP eine Abnahme der Kontraktilität bewirkte (Paaerez-Leiros et al., 1990) sowie zu einer Reduktion des systolischen Ventrikeldruckes führte (Wang et al., 1996). In Vorversuchen zu dieser Arbeit zeigte Spielhagen (2001) bei 10 Patienten, deren Eluate einen deutlich kardiodepressiven Effekt aufwiesen, daß sich die Wirkung durch Zugabe von Atropin teilweise antagonisieren ließ. Dies läßt vermuten, daß beim kardiodepressiven Effekt des Eluates der DCM-Patienten die Beteiligung muskarinerner Rezeptoren eine Rolle spielt.

Ein weiterer Autoantikörper, der die Kardiomyozyten funktionell beeinträchtigt, ist gegen das ADP/ATP-Translokatorprotein an der inneren Mitochondrienmembran gerichtet und wurde von Schultheiss et al. 1988 erstmals beschrieben. Sie konnten zeigen, daß dieser Autoantikörper mit dem myokardialen L-Typ Kalziumkanal in der Zellmembran kreuzreagiert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, daß der Anti-ADP/ATP-Carrier Antikörper an der Zelloberfläche von isolierten Kardiomyozyten bindet (Kühl et al., 1991). Die funktionelle Testung dieser Antikörper an isolierten stimulierten Kardiomyozyten ergab, daß unmittelbar nach Zugabe des Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500 ein Anstieg der Kontraktionsgeschwindigkeit sowie ein vermehrtes Auftreten von Arrhythmien zu beobachten war. Nach einigen Minuten kam es zur Blasenbildung und Granulation der Zellen, die Kontraktionsgeschwindigkeit sank kontinuierlich ab und die Zellen gingen zugrunde. Dieser akute zytotoxische Effekt ereignete sich innerhalb von 15 bis 30 Minuten nach Zugabe der Antikörper. In weiteren Untersuchungen konnte ein erhöhter Kalziuminflux über den L-Typ Kalziumkanal nachgewiesen werden, dies wurde als Beeinflussung des Öffnungsmechanismus durch die Autoantikörper gedeutet. Die für diese Versuche eingesetzten Immunglobuline wurden mittels Protein A-Sepharose aus dem Patientenplasma eliminiert, ein Verfahren, das mit der Immunadsorption vergleichbar ist. Allerdings konnte bei unseren Versuchen eine Abnahme des Kalziuminflux gemessen werden. Rein theoretisch kann ein den Kalziumkanal blockender Faktor unsere Ergebnisse demnach besser erklären als der oben erwähnte „Kalziumkanalöffner“ von Kühl et al. (1991), da es selbst bei den Eluates mit isoliert kardiodepressivem Effekt auf die Kontraktilität zu keiner Zunahme des

Kalziumtransienten kam. Es ist daher davon auszugehen, daß der von uns beschriebene Effekt nicht durch den ADP/ATP-Autoantikörper bedingt ist.

Die Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SR-Ca²⁺-ATPase) spielt eine bedeutende Rolle in der Kalziumhomöostase des Kardiomyozyten. Dieses Enzym ist dafür verantwortlich, daß nach Ende der Kontraktion das freigesetzte Kalzium wieder in die Speichervesikel des sarkoplasmatischen Retikulums aufgenommen wird. In der Annahme, daß eine Störung des Kalziumhaushaltes als pathobiochemischer Faktor bei der Kardiomyopathie von Bedeutung ist, untersuchten Sharaf et al. (1994), ob es einen Zusammenhang zwischen der Hemmung des sarkoplasmatischen Kalziumtransportes und der Entstehung dieser Erkrankung gibt. Die Versuche zeigten, daß bei Mäusen nach Immunisierung mit dem kardialen SR-Ca²⁺-ATPase-Antigen vom Kaninchen sowie durch peritoneale Injektion von Hybridzellen, welche monoklonale Antikörper gegen die SR-Ca²⁺-ATPase produzieren, die Entwicklung einer Kardiomyopathie nachzuweisen war. Nach Sharaf et al. (1994) steht die SR-Ca²⁺-ATPase über das T-Tubulus-System indirekt in Kontakt mit dem Extrazellulärraum, so daß Einflüsse extrazellulärer Antikörper auf die intrazelluläre Regulation des Kalziumhaushaltes nicht auszuschließen sind. Eine Inhibition der SR-Ca²⁺-ATPase führt zu einer verlängerten Kontraktion, eine Stimulation bedingt durch eine gesteigerte Aufnahme des Kalzium in die Speichervesikel zwar eine schnellere Relaxation, die eigentliche Kontraktionsstärke jedoch wird nicht beeinflusst. Daher können beide Wirkmechanismen die von uns gesehenen Effekte des Eluates auf das intrazelluläre Kalzium bzw. den Kalziumtransienten nicht hinreichend erklären.

Ein weiterer Alterationsmechanismus, der die Funktion des Myokard beeinträchtigt, ist die zytotoxische Serumaktivität. Einige der kreuzreagierenden, gegen das Sarkolemm gerichteten Antikörper bei der Myokarditis weisen eine Zytotoxizität auf (Drude et al., 1991). Diese Antikörper bewirken eine Abnahme der Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten. Da allerdings diese Wirkung nur in Gegenwart von Komplement einsetzt, können derartige Antikörper aufgrund der Komplementinaktivierung durch das Erwärmen des Eluates nicht für den von uns beschriebenen Effekt verantwortlich sein.

Schließlich ist auch eine intrazelluläre Wirkung von Antikörpern nicht völlig auszuschließen. Da aber anzunehmen ist, daß die Endozytose von Antikörpern und das Erreichen ihrer intrazellulären Zielstruktur einige Zeit beansprucht, ist dieser Interventionsmechanismus aufgrund des sehr schnellen Wirkungseintritts des Eluates in der vorliegenden Arbeit eher unwahrscheinlich. Auf der anderen Seite zeigte sich bei

den Ergebnissen dieser Arbeit eine stärkere Beeinflussung der Kontraktilität gegenüber dem Kalziumtransienten, so daß ein Wirkmechanismus auf der Ebene der kontraktilen Proteine dennoch in Betracht gezogen werden muß.

Im Prinzip muß davon ausgegangen werden, daß das Patientenkollektiv der DCM eine sehr unterschiedliche Zusammensetzung von verschiedenen Antikörpern aufweist, die möglicherweise in ihrem Zusammenspiel für die beschriebenen kardiodepressiven Effekte verantwortlich sind.

Eine nähere Klassifizierung der beteiligten Autoantikörpern gelang Staudt et al. (2002). In einer Studie wurden neun DCM-Patienten, bei denen eine Immunadsorption mit Protein A durchgeführt wurde, mit neun weiteren Patienten verglichen, bei denen die Therapie mittels anti-IgG erfolgte. Die Behandlung erfolgte in beiden Gruppen vier mal in einen Abstand von je einem Monat mit anschließender Gabe von IgG. Protein A bindet bevorzugt an das Fc-Fragment von humanem IgG-1, -2 und -4, hat aber eine niedrige Affinität zu IgG-3. Im Gegensatz dazu hat das anti-IgG eine hohe Affinität zu allen IgG-Subklassen. In beiden Gruppen zeigte sich zwar eine Reduktion des Gesamt-IgGs um über 80%, eine Abnahme des IgG-3 sowie des β_1 -Rezeptor-Autoantikörpers war jedoch nur in der anti-IgG Gruppe nachweisbar. Während der ersten Immunadsorption wurde das Eluat, welches die eliminierten Antikörper enthält, gesammelt, weiter verarbeitet und im Vergleich zum Eluat von gesunden Patienten an isolierten Rattenkardiomyozyten getestet. Das Eluat der anti-IgG Gruppe bewirkte eine Abnahme des Kalziumtransienten sowie eine Abnahme der Zellverkürzung. In einem weiteren Schritt wurde das Eluat der anti-IgG Gruppe mit einer spezifischen anti-IgG-3-Säule immunadsorbiert. Die Wirkung des dadurch gewonnenen Eluates wurde ebenfalls an Rattenkardiomyozyten untersucht. Dabei zeigte sich, daß das Eluat der anti-IgG-3 Gruppe nach dem Entfernen des IgG-3 mittels spezifischer Immunadsorptionssäulen nicht mehr kardiodepressiv auf die Rattenkardiomyozyten wirkte. Ein kardiodepressiver Effekt ließ sich jedoch für das IgG-3 haltige Eluat der spezifischen anti-IgG-3-Säule nachweisen. Diese Untersuchungen führen zu dem Schluß, daß die Antikörper der IgG-3 Subklasse von großer Bedeutung in der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion bei DCM-Patienten sind.

Die Ergebnisse klinischer und experimenteller Untersuchungen sprechen für einen Zusammenhang zwischen Myokarditis und DCM. Daher ist anzunehmen, daß inflammatorische Zellen in die Pathogenese der DCM involviert sind und eine bedeutende Rolle in der Progression der kardialen Dysfunktion spielen. Um zu klären,

ob die Immunadsorption mit anschließender Immunglobulingabe Einfluß auf die inflammatorischen Prozesse am Myokard hat, untersuchten Staudt et al. (2001) 25 Patienten näher. 12 Patienten wurden ergänzend zur medikamentösen Therapie mit Immunadsorption und anschließender IgG-Gabe über 3 Monate behandelt. Vor und nach der Immunadsorption wurden Biopsien aus dem rechten Ventrikel entnommen, ebenso im Abstand von 3 Monaten bei den 13 Kontrollpatienten. Die Immunadsorption mit anschließender IgG-Gabe reduzierte die Anzahl der CD3, CD4 und CD8 positiven Lymphozyten sowie LCA (leukocyte common antigen) positiven Zellen im Myokard. Darüber hinaus wurden HLA II Antigene, welche von großer Bedeutung für die Regulation der Immunreaktion sind, vermindert exprimiert. In der Kontrollgruppe blieb sowohl die Anzahl der immunopositiven Zellen als auch die Expression von HLA II Antigenen unverändert. Diese Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß die Immunadsorption mit ergänzender Immunglobulingabe die inflammatorischen Reaktionen im Myokard der DCM-Patienten mindern.

7.3. Vergleich von Kardiodepressivität und klinischen Befunden

Wie in den vorausgegangenen Abschnitten dargelegt wurde, scheinen Autoantikörper insbesondere der Subgruppe IgG-3 eine bedeutende Rolle in der Entwicklung bzw. der fortschreitenden funktionellen Beeinträchtigung der Herzfunktion bei DCM zu spielen. Da in mehreren Studien eine deutliche klinische und hämodynamische Besserung bei DCM-Patienten nach Immunadsorption beschrieben wurde (Felix et al., 2000 und 2002, Staudt et al., 2004), liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei den nachweisbaren Autoantikörpern nicht um ein Epiphänomen im Rahmen einer Entzündungsreaktion handelt, sondern um eine pathophysiologische Ursache der eingeschränkten myokardialen Funktion. Der von Felix bzw. Staudt et al. gemessene kardiodepressive Effekt des mittels Immunadsorption gewonnenen Eluates ist mit der Wirkung des Eluates der DCM-Patienten in dieser Arbeit vergleichbar.

Da die Immunadsorption ein aufwendiges und kostenintensives Therapieverfahren ist, war eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit prädiktive klinische Merkmale zu identifizieren, die mit dem Auftreten kardiodepressiver Antikörper assoziiert sind, um so eine Aussagen darüber zu ermöglichen, ob ein Patient von der Immunadsorption profitiert oder nicht. Um diese Frage zu klären wurde eine Subgruppenanalyse der DCM-Patienten durchgeführt.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Geschlechtsgruppen konnte bei 40% der männlichen DCM-Patienten ein kardiodepressiver Effekt auf den Kalziumtransienten sowie auf die Zellverkürzung nachgewiesen werden. Der Anteil auf Kalziumtransient und Kontraktilität kardiodepressiv wirkender Eluate bei den weiblichen DCM-Patientinnen lag bei 61%. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und dem kardiodepressiven Effekte des Eluates auf die Rattenkardiomyozyten. Allerdings waren unter den 100 untersuchten DCM-Patienten nur 18 Frauen, bedingt durch die Tatsache, daß diese Erkrankung eine höhere Inzidenz beim männlichen Geschlecht aufweist (Bagge et al., 1984; Codd et al., 1989). Um für das Gesamtkollektiv der DCM-Patienten repräsentative Aussagen über das Auftreten des kardiodepressiven Effektes bei beiden Geschlechtern treffen zu können, sollten die Versuche an einer größere Patientenanzahl erneut evaluiert werden, zumal geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bekannt sind (Wenger, 2002).

Die von uns untersuchten DCM-Patienten waren zwischen 19 und 77 Jahre alt, der Altersdurchschnitt lag bei $51,9 \pm 11,1$ Jahren. Die Unterteilung der Patienten in zwei zu vergleichende Subgruppen erfolgte mittels dem Medianwert, welcher 54 Jahre betrug. Dabei zeigte sich, daß das Alter der DCM-Patienten keinen statistisch signifikanten Einfluß auf das Auftreten eines kardiodepressiven Effektes in der untersuchten Population hatte.

Da in einer Studie gezeigt wurde, daß die Prävalenz von Autoantikörpern im Verlauf der DCM-Erkrankung abnimmt, läßt sich vermuten, daß die Bildung von Autoantikörpern ein frühes Ereignis in der Entwicklung der Erkrankung ist (Caforio et al., 1997). Daher liegt der Schluß nahe, daß die Erkrankungsdauer eine wesentliche Bedeutung für das Auftreten des kardiodepressiven Effektes haben muß. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden die DCM-Patienten, die eine mittlere Erkrankungsdauer von $3,6 \pm 2,7$ Jahren haben, anhand des Medianwertes von drei Jahren in zwei Gruppen unterteilt. Der Vergleich dieser beiden Subgruppen zeigte jedoch, daß kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem kardiodepressiven Effekt und der Erkrankungsdauer besteht.

Jahns et al. zeigten 1999, daß spezifische Antikörper gegen den β_1 -Rezeptor häufiger bei DCM-Patienten mit eingeschränkter linksventrikulären Ejektionsfraktion vorkommen. Aufgrund dieser Aspekte läßt sich nun vermuten, daß eine Korrelation zwischen der LVEF des DCM-Patienten und dem kardiodepressiven Effekt des Eluates besteht. Um

dieser Vermutung nachzugehen, wurden die DCM-Patienten anhand des Meridianwertes der LVEF von 22% in zwei Gruppen unterteilt und diese miteinander verglichen. Unsere Versuche zeigten jedoch, daß die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zum Zeitpunkt der Untersuchung keinen Einfluß auf die Wirkung des Eluates hatte, da der kardiodepressive Effekt in ähnlichen prozentualen Anteilen bei Patienten mit einer Austreibungsfraktion von $<22\%$ nachzuweisen ist wie bei Patienten mit einer Austreibungsfraktion von $\geq 22\%$. Betrachtet man hingegen den Verlauf der linksventrikulären Ejektionsfraktion innerhalb des letzten Erkrankungsjahres, so war bei DCM-Patienten, deren Austreibungsfraktion sich im Vergleich zum Vorbefund verbessert hat bzw. unverändert geblieben ist, ein kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität in 24% nachweisen. Das Eluat der DCM-Patienten, bei denen sich die Austreibungsfraktion progredient verschlechtert hat, zeigte jedoch in 56% einen kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten sowie die Kontraktilität. Dieser statistisch signifikante Unterschied läßt den Schluß zu, daß ein Zusammenhang zwischen dem Verlauf der linksventrikulären Ejektionsfraktion und dem Auftreten von Autoantikörpern besteht. DCM-Patienten, bei denen sich die Austreibungsfraktion innerhalb des letzten Jahres verringert hat, haben parallel zu dieser progredienten Verschlechterung eine erhöhte Anzahl an Autoantikörper im Plasma. Diese Autoantikörper wiederum lassen sich im Eluat nachweisen und bewirken einen kardiodepressiven Effekt an isolierten Rattenkardiomyozyten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit erstmals einen Zusammenhang zwischen der hämodynamischen Verschlechterung bei Patienten mit DCM und der Prävalenz von kardiodepressiven Autoantikörpern. Der genaue Alterationsmechanismus muß jedoch noch in weiteren Studien geklärt werden. Sollte sich in größeren klinischen Studien die Vermutung bestätigen, daß ein Zusammenhang zwischen Eluatwirkung und klinischer Verbesserung bei Patienten nach Immunadsorption besteht, könnte sich das in dieser Arbeit verwendete Verfahren als Voruntersuchung etablieren, um zu untersuchen, ob ein Patient von der sehr kostenaufwendigen Immunadsorption profitiert oder nicht.

8. Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie ist eine Erkrankung des Myokards, die sich in einer kardialen Dysfunktion als Folge einer progressiven Abnahme der kontraktilen Funktion und einer Dilatation des linken oder beider Ventrikel manifestiert. Diese Erkrankung kann verschiedene Ursachen haben und ist vermutlich die Erscheinung eines multifaktoriellen Prozesses. Da bereits eine Vielzahl von Antikörpern gegen unterschiedliche kardiale Strukturen beschrieben wurden, spricht vieles für eine autoimmune Pathogenese. Der Entzug von Antikörpern aus dem Patientenplasma mittels Immunadsorption führt nachweislich zur Verbesserung der Hämodynamik bei den DCM-Patienten. Untersuchungen mittels Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie zeigten, daß die bei der Immunadsorption entfernten Antikörper einen kardiodepressiven Effekt auf isolierte Rattenkardiomyozyten haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals an einer größeren Patientenpopulation (n=100) untersucht, in welchem Prozentsatz diese kardiodepressiven Antikörper bei den DCM-Patienten vorkommen. Ferner wurde die Prävalenz der Antikörper in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht der Patienten, der Krankheitsdauer, dem Verlauf der Erkrankung sowie der linksventrikulären Ejektionsfraktion untersucht.

Aus diesen Überlegungen heraus wurden Antikörper aus dem Plasma von 100 DCM-Patienten sowie von 92 herzgesunden Kontrollpatienten extrahiert und deren Wirkung an isolierten Rattenkardiomyozyten untersucht. Die Kardiomyozyten wurden hierzu feldstimuliert und der intrazelluläre Kalziumtransient sowie die systolische Zellverkürzung mittels Beladung eines Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes und Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie gemessen, wobei die Änderung dieser Parameter bei Superperfusion mit den Antikörpern untersucht wurden.

Ein kardiodepressiver Effekt des Eluates auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität ließ sich bei 44% der DCM-Patienten nachweisen. In der Kontrollgruppe war dieser Effekt nur bei 4% meßbar. Es konnte gezeigt werden, daß weder das Alter oder das Geschlecht der DCM-Patienten noch die Erkrankungsdauer oder die aktuelle LVEF einen Einfluß auf die Prävalenz der kardiodepressiven Antikörper haben. Der Verlauf der Erkrankung, gemessen in der Änderung der LVEF innerhalb des letzten Jahres, war jedoch mit dem Auftreten der kardiodepressiven Antikörper assoziiert. Diejenigen DCM-Patienten, deren LVEF sich innerhalb des letzten Jahres

verschlechtert hat, wiesen zu 56% einen kardiodepressiven Effekt auf den Kalziumtransienten und die Kontraktilität auf. Dem gegenüber stehen die Patienten, deren LVEF unverändert geblieben ist bzw. sich verbessert hat. Bei diesen Patienten konnte der Effekt nur bei 24% beschrieben werden.

Diese Arbeit konnte somit erstmals in einer größeren Population von DCM-Patienten eine hohe Prävalenz kardiodepressiver Antikörper nachweisen. Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, daß ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines kardiodepressiven Effektes in unserem Versuchsansatz und einer Verschlechterung der linksventrikulären Auswurfsfraktion der DCM-Patienten besteht. Die kardiodepressiven Antikörper scheinen somit nicht nur in der Entstehung sondern auch in der Progression der Erkrankung eine wichtige Rolle zu spielen, in dem sie über unterschiedliche Mechanismen zur Funktionseinschränkung des Herzens führen.

Der genaue Zusammenhang zwischen diesen beiden Komponenten sowie die genaue Zielstruktur der kardiodepressiven Antikörper konnte von uns nicht vollständig aufgeklärt werden und sollte daher Ziel weiterer Untersuchungen sein.

9. Literaturverzeichnis

1. Anonymous: Report of the WHO/ISCF Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Br Heart J*, 1980; 44: 672-673.
2. Ansari, A. A., Neckelmann N., Villinger F., Leung P., Danner, D. J., Brar, S. S., Zhao, S., Gravanis, M. B., Mayne, A., Gershwin, M. E. and Herskowitz, A.: Epitope Mapping of the Branched Chain Alpha-Ketoacid Dehydrogenase Dihydrolipoyl Transacylase (BCKD-E2) Protein that Reacts with Sera from Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J Immunol*, 1994; 153 (10): 4754-4465.
3. Anversa, P., Palackal, T., Sonnenblick, E. H., Olivetti, G., Meggs, L. G. and Capasso, J. M.: Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res*, 1990; 67 (4):871-885.
4. Bagger, J. P., Baandrup, U., Rasmussen, K., Miller, M., Vestlund, T.: Cardiomyopathy in Western Denmark. *Br Heart J*, 1984; 52 (3):327-31.
5. Beuckelmann, D. J., Nabauer, M. and Erdmann, E.: Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*, 1992; 85 (3): 1046-1055.
6. Bramlage, P., Stangl, V., Jarrin, A., Podlowski, S., Pankow, N., Baumann, G., Stangl, K., Joss, G. and Felix, S. B.: Computer-aided measurement of Cell Shortening and Calcium Transient in Adult Cardiac Myocytes. *Biotechnol. Prog.*, 2001; 17 (5): 929-934.
7. Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C. and Stinson, E. B.: Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*, 1982; 307 (4):205-211.

8. Bristow, M. R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., Jamieson, S., et. al.: Beta 1- and 2- adrenergic receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*, 1986; 59 (3): 297-303.
9. Bygren, P., Freiburghaus, C. Lindholm, T., Simonsen, O., Thysell, H. and Wieslander, J.: Goodpasture's syndrome treated with staphylococcal protein A immunadsorption. *Lancet*, 1985; 2 (8467): 1295-1296 [letter].
10. Caforio, A. L. P., Goldman, J. H., Baig, M., Haven, A. j., Libera, L. D., Keeling, P. J. and McKenna, W. J.: Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression. *Heart*, 1997; 77 (1): 62-67.
11. Caforio, A. L. P., Grazzini, M. Mann, J. M., Keeling, P. J., Bottazzo, G. F., McKenna, W. J. and Schiaffino, S.: Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major antigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 1992; 85 (5): 1734-1742.
12. Caforio, A. L. P., Keeling, P. J., Zachara, E., Mestroni, L., Camerini, F., Mann, J. M., Bottazzo, G. F. and McKenna, W. J.: Evidence from family studies for autoimmunity in dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 1994; 344 (8925): 773-777.
13. Codd, M. B., Sugrue, D. D., Gersh, B. J. and Melton, L. J.: Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*, 1989; 80 (3): 564-572.
14. Cohn, J. N., Levine, T. B., Olivari, M. T., Garberg, V., Lura, D., Francis G. S., Simon, A. B. and Rector, T.: Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*, 1984; 311 (13). 819-823.
15. Das, S. K., Cassidy, J. T. and Huber, S. A.: Immunity in dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels Suppl*, 1985; 1: 205-08.

16. De Maria, R., Gavazzi, A., Recalcati, F., Baroldi, D., De Vita, C. and Camerini, F.: Comparison of clinical findings in idiopathic dilated cardiomyopathy in women versus men. The Italian Multicenter Cardiomyopathy Study Group (SPIC). *Am J Cardiol*, 1993; 72 (7): 580-585.
17. Di Lenarda, A., Secoli, G., Perkan, A., Gregori, D., Lardieri, G., Pinamonti, B., Sinagra, G., Zecchin, M. and Camerini, F.: Changing mortality in dilated cardiomyopathy. The Heart Muscle Disease Study Group. *Br Heart J*, 1994; 72 (6 Suppl): S46-51.
18. Dörffel, W. V., Felix, S.B., Wallukat, G., Brehme, S., Bestvater, K., Hofmann, T., Kleber, F. X., Baumann, G. and Reinke, P.: Short-term hemodynamic effects of immunadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 1997; 95 (8): 1994-1997.
19. Drude, L., Wiemers, F. and Maisch, B.: Impaired myocyte function in vitro incubated with sera from patients with myocarditis. *Eur Heart J*, 1991; 12 Suppl D: 36-38.
20. Fabiato, A. and Fabiato, F.: Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells. *J Gen Physiol*, 1978; 72 (5): 667-699.
21. Feldmann, M. D., Copelas, L., Gwathmey, J. K., Phillips, P., Warren, S. E., Schoen, F. J., Grossman, W. and Morgan, J. P.: Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation*, 1987; 75 (2): 331-339.
22. Felix, S. B., Staudt, A., Dörffel, W. V., Stangl, V., Merkel, K., Pohl, M., Döcke, W. D., Morgera, S., Neumayer, H. H., Wernecke, K. D., Wallukat, G., Stangl, K. and Baumann, G.: Hemodynamic effects of immunadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: Three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 35 (6): 1590-1598.
23. Felix, S. B., Staudt, A., Stangl, V., Bramlage, P., Spielhagen, T., Dörffel, W. V., Schattke, S., Priem, F., Jarrin, A., Wallukat, G., Wernecke, K. D., Baumann, G. and

- Stangl, K.: Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol*, 2002; 39 (4): 646-652.
24. Figulla, H. R., Kellermann, A.B., Stille Siegener, M. Heim, A. and Kreuzer, H.: Significance of coronary angiography, left heart catheterization, and endomyocardial biopsy for the diagnosis of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*, 1992; 124 (5): 1251-1257.
 25. Flesch, M., Schwinger, R. H. G., Schiffer, F., Frank, K., Südkamp, M., Kuhn-Regnier, F., Arnold, G. and Böhm, M.: Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium. *Circulation*, 1996; 94 (5): 992-1002.
 26. Fu, L. X., Magnusson, Y., Bergh, C. H., Liljegvist, J. A., Waagstein, F., Hjalmarson, A. and Hoebke, J.: Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 1993; 91 (5): 1964-1968.
 27. Gomez, A. M., Valdivia, H. H., Cheng, H., Lederer, M. R., Santana, L. F., Cannell, M. B., McCune, S. A., Altschuld, R. A. and Lederer, W. J.: Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*, 1997; 276 (5313): 800-806.
 28. Hardy, C. J., Weiss, R. G., Bottomley, P. A. and Gerstenblith, G.: Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*, 1991; 122 (3 Pt 1): 795-801.
 29. Hasenfuss, G., Mulieri, A., Leavitt, B. J., Allen, P. D., Haerberle, J. R. and Alpert, N. R.: Alteration of contractile function and excitation-contraction coupling in dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, 1992; 70 (6): 1225-1232.
 30. Hofmann, T., Meinertz, T., Kasper, W., Geibel, A., Zehender, M., Hohnloser, S., Stienen, U., Treese, N. and Just, H.: Mode of death in idiopathic dilated

- cardiomyopathy: a multivariate analysis of prognostic determinants. *Am Heart J*, 1988; 116 (6 Pt 1): 1455-1463.
31. Iwata, M., Yoshikawa, T., Baba, A., Anzai, T., Mitamura, H., Ogawa, S.: Autoantibodies Against the Second Extracellular Loop of Beta-Adrenergic Receptors Predict Centricular Tachycardia and Sudden Death in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2001; 37: 418-424
 32. Jahns, R., Boivin, V., Hein, L., Triebel, S., Angermann, L. E., Ertl, G. and Lohse, M. J.: Direct evidence for a beta 1- adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 2004; 113 (10): 113 (10):1419-1429.
 33. Jahns, R., Boivin, V., Siegmund, C., Boege, F., Lohse, M. J. and Inselmann, G.: Activating beta-1-adrenoceptor antibodies are not associated with cardiomyopathies secondary to valvular or hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol*, 1999; 34 (5): 1545-1551.
 34. Jahns, R., Boivin, V., Siegmund, C., Inselmann, G., Lohse, M. J. and Boege, F.: Autoantibodies activating human β_1 -adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation*, 1999; 99 (5): 649-654.
 35. Johnson, R. A. and Palacios, I.: Dilated cardiomyopathies of the adult (first of two parts). *N Engl J Med*, 1982; 307 (18): 1051-1058.
 36. Kao, J. P. Y., Harootunian, A. T. and Tsien, R. Y.: Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem*, 1989; 264 (14): 8179-8184.
 37. Kentish, J. C., ter Keurs, H. E., Ricciardi L., Bucx, J. J. and Noble, M. L.: Comparison between sarcomere length-force relation of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentration on these relations. *Circ Res*, 1986; 58 (6): 755-768.

38. Klein, R., Maisch, B., Kochsiek, K. and Berg, P. A.: Demonstration of organ specific antibodies against heart mitochondria (anti-M7) in sera from patients with some forms of heart disease. *Clin Exp Immunol*, 1984; 58 (2): 283-292.
39. Kühl, U., Melzner, B., Schäfer, B., Schultheiss, H.-P. and Strauer, B. E.: The Ca-channel as cardiac autoantigen. *Eur Heart J*, 1991; 12 Suppl D: 99-104.
40. Kühl, U., Noutsias, M., Schultheiss, H.-P.: Immunohistochemistry in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 1995; 16 Suppl O: 100-106.
41. Kühl, U., Seeberg, B., Schultheiss, H.-P., et Straver, B. E.: Immunohistological characterization of infiltrating lymphocytes in biopsies of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 1994; 15 Suppl C: 62-67.
42. Latif, N., Baker, C. S., Dunn, M. J., Rose, M. L., Brady, P. and Yacoub, M. H.: Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting. *J Am Coll Cardiol*, 1993; 22 (5): 1378-1384.
43. Limas, C. J.: Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. a pathogenetic role? *Circulation*, 1997; 95 (8): 1979-1980.
44. Limas, C. J., Goldenberg, I. F. and Limas, C.: Autoantibodies against β -adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, 1989; 64 (1): 97-103.
45. Limas, C. J., Goldenberg, I. F. and Limas, C.: Influence of anti-beta-receptor antibodies on cardiac adenylate cyclase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*, 1990; 119 (6): 1322-1328.
46. Limas, C. J., Olivari, M. T., Goldenberg, I. F., Levine, T. B., Benditt, D. G. and Simon, A.: Calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in human dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 1987; 21 (8): 601-605.

47. Lindmark, R., Thoren-Tolling, K. and Sjoquist, J.: Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J Immunol Methods*, 1983; 62 (1): 1-13.
48. Magnusson, Y., Marullo, S., Hoyer, S., Waagstein, F., Andersson, B., Vahlne, A., Guillet, J.-G., Strosberg, A. D., Hjalmarson, A. and Hoebke, J.: Mapping of a functional autoimmune epitope on the β_1 -adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 1990; 86 (5): 1658-1663.
49. Maisch, B., Bauer, E., Cirsi, M. and 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*, 1993; 87 (5 Suppl): IV 49-65.
50. Maisch, B., Deeg, P., Liebau, G. and Kochsiek, K.: Diagnostic relevance of humoral and cytotoxic reactions in primary and secondary dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 1983; 52 (8): 1072-1078.
51. Maisch, B., Herzum, M., Hufnagel, G., Bethge, C. and Schönian, U.: Immunosuppressive treatment for myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 1995; 16: Suppl O, 153-161.
52. Maisch, B., Hufmagel, G., Schönian, U. and Hengstenberg, C.: The european study of epidemiology and treatment of cardiac inflammatory disease (ESETCID). *Eur Heart J*, 1995; 16: Suppl O, 173-175.
53. Manolio T. A., Baughman, K.L., Rodeheffer, R., Pearson, T. A., Bristow, J. D., Michels, V. V., Abelmann, W.H. and Harlan, W. R.: Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung and Blood Institute workshop [see comments]). *Am J Cardiol*, 1992; 69 (17): 1458-1466.
54. Markiewicz, W., Wu, S., Sievers, R., Parmley, W. W., Higgins, C. B., James, T. L., Jasmin, G. and Wikman-Coffelt, J.: Influence of heart rate on metabolic and

- haemodynamic parameters in the Syrian hamster cardiomyopathy. *Am Heart*, 1987; 114 (2): 362-368.
55. Mason, J. W., O'Connell, J. B., Herskowitz, A., Rose, N. R., McManus, B., Billingham, E. and Moon, T. E.: A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis: The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med*, 1995; 333: 269-275.
 56. Matsui, S., Fu, M. L. X., Hayase, M., Katsuda, S., Yamaguchi, N., Teraoka, K., Kurihara, T., Takekoshi, N.m Murakami, E., Hoebke, J. and Hjalmarson, A.: Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol*, 1997; 29 (2): 641-655.
 57. Matsumori A. et Kawai, C.: An animal model of congestive (dilated) cardiomyopathy: dilatation and hypertrophy of the heart in chronic stage in DBA/2 mice with myocarditis caused by encephalomyocarditis virus. *Circulation*, 1982; 66 (2): 641-655.
 58. Matsumori, A., Yamada, T., Suzuki, H., Matoba, Y. and Sasayama, S.: Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J*, 1994; 72 (6): 561-566.
 59. McNamara, D. M., Rosenblum, W. D., Janosko, K. M., Trost, M. K., Villaneuva, F. S., Demetris, A. J., Murali, S. and Feldmann, A. M.: Intravenous immune globulin in the therapy of myocarditis and acute cardiomyopathy. *Circulation*, 1997; 95 (11): 2476-2478.
 60. Mestroni, L., Miani, D., Di Lenarda, A., Silvestri, F., Bussani, R., Filippi, G. and Camerini, F.: Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 1990; 65 (22): 1449-53.
 61. Meyer, M., Schillinger, W., Pieske, B., Holubarsch, C., Heilmann, C., Posival, H., Kuwajima, G., Mikoshiba, K., Just, H. and Hasenfuss, G.: Alterations of

- sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 1995; 92 (4): 778-784.
62. Michels, V. V., Moll, P. P., Miller, F. A., Tajik, A. J., Chu, J. S., Driscoll, D. J., Burnett, J. C., Rodeheffer, R. J., Chesebro, J. H. and Tazelaar, H. D.: The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1992 (2), 326: 77-82.
 63. Mittmann, C., Eschenhagen, T. and Scholz, H.: Cellular and molecular aspects of the contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39 (2): 267-275.
 64. Müller-Derlich, J., du Moulin, A. and Spaethe, R.: Removal of human immunoglobulins with Ig-Therasorb. *Transfusion Med*, 1993, 3:91.
 65. Paaerez-Leiros, C., Sterin Borda, L., Cossio, P. and Borda, E. S.: Muscarinic cholinergic antibody in experimental autoimmune myocarditis regulates cardiac function. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1990; 195 (3): 356-363.
 66. Packer, M., O'Connor, C. M., Ghali, J. K., Pressler, M. L., Carson, P. E., Belkin, R. N., Miller, A. B., Neubergt, G. W., Frid, D., Wertheimer, J. H., Cropp, A. B. and De Mets, D. L.: Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation Study Group. *N Engl J Med*, 1996; 335 (15): 1107-1114.
 67. Palmer A., Gjorstrup, P. Severn, A., Welsh, K. and Taube, D.: Treatment of systemic lupus erythematosus by extracorporeal immunadsorption. *Lancet*, 1988; 2 (8505):272 [letter].
 68. Parrillo, J. E., Cunnion, R. E., Epstein, S. E., Parker, M. M., Suffredini, A. F., Brenner, M., Schaer, G. L., Palmeri, S. T., Cannon, R. O. 3rd, Alling, D. et al.: A prospective, randomized, controlled trial of prednisone for dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1989; 321 (16): 1119-1121.

69. Pieske, B.: New aspects of the pathophysiology of heart failure. *Wien Med Wochenschr* 1998; 148 (5): 108-120.
70. Piper, H. M., Volz, A. and Schwartz, P.: Adult ventricular rat heart muscle cells. *Tissue and culture techniques in heart and vessel research*. H. M. Piper, Editor. 1992, Berlin, Heidelberg; S.: 36-60.
71. Powell, T., Terrar, D. A. and Twist, V. W.: Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J Physiol Lond*, 1980; 302: 131-153.
72. Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfras, I., Martin, I. and 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*, 1996; 93 (5): 841-842.
73. Schmidt, R. F. and Thews, G.: *Physiologie des Menschen*. 1995: 26. Auflage, Springer Verlag.
74. Schneider; K. M.: Plasmapheresis and immunadsorption: Different techniques and their current role in medical therapy. *Kidney Int Suppl*, 1998; 64: 61-65. Review.
75. Schultheiss, H.-P. and Bolte, H. D.: Immunological analysis of auto-antibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 1985; 17 (6): 603-617.
76. Schultheiss, H.-P., Kühl, U., Janda, I., Melzner, B., Ulrich, G. and Morad, M.: Antibody-mediated enhancement of calcium permeability in cardiac myocytes. *J Exp Med*, 1988; 168 (6): 2105-2119.
77. Schultheiss, H.-P., Pauschinger, M. and Kühl, U.: [Pathogenesis of inflammatory cardiomyopathies] Pathogenese der entzündlichen Kardiomyopathie. *Med Klin*, 1998; 93(4): 229-235.

78. Schulze, K., Becker, B. F., Schauer, R. and Schultheiss, H.-P.: Antibodies to ADP-ATP carrier - an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy - impair cardiac function. *Circulation*, 1990; 81 (3): 959-969.
79. Schulze, K., Becker, B. F. and Schultheiss, H.-P.: 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*, 1989 (2); 64: 179-192.
80. Schwimmbeck, P. L., Schwimmbeck, N. K., Schultheiss, H.-P. and Strauder, B. E.: Mapping of antigenic determinants of the adenine-nucleotide translocator and cocksackie B3 virus with synthetic peptides: Use for the diagnosis of viral heart disease. *Clin Immunol*, 1993; 68 (2): 135-140.
81. Schwinger, R. H. G., Böhm, M., Koch, A., Schmidt, U., Morano, I., Eissner, H.-J., Überfuhr, P., Reichert, B. and Erdmann, E.: The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res*, 1994; 74 (5): 959-969.
82. Schwinger, R. H. G., Böhm, M., Schmidt, U., Karczewski, P., Bavendiek, U., Flesch, M., Krause, E.-G. and Erdmann, E.: Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing heart. *Circulation*, 1995; 92 (11): 3220-3228.
83. Sharaf, A. R., Narula, J., Nicol, P. D., Southern, J. F. and Khwa, B.-A.: Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium ATPase, an autoimmune antigen in experimental cardiomyopathy. *Circulation*, 1994; 89 (3): 1217-1228.
84. Shibuya, N., Sato, T., Osame, M., Takegami, T., Doi, S. and Kawanami, S.: Immunoabsorption therapy for myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1994; 57 (5): 578-581.
85. Sigusch, H. H., Reinhardt, D. and Figulla, H. R.: [Clinical picture and differential diagnosis of cardiomyopathy and myocarditis] Klinisches Bild und

- Differentialdiagnose von Kardiomyopathie und Myokarditis. Med Klin, 1998; 93 (4): 236-239.
86. Spielhagen, T.: Entfernung kardiodepressiver Faktoren bei Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie durch eine Immunadsorption. Dissertation, 2001.
 87. Staudt, A., Böhm, M., Knebel, F., Grosse, Y., Bischoff, C., Hummel, A., Dahm, J. B., Borges, A., Jochamnn, N., Wernecke, K. D., Wallukat, G., Baumann, G. and Felix, S. B.: Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclasses in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 2002; 106 (19): 2448-2453.
 88. Staudt, A., Schäper, F., Stangl, V., Plagemann, A., Böhm, M., Merkel, K., Wallukat, G., Wernecke, K. D., Stangl, K., Baumann, G. and Felix, S. B.: Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation*, 2001; 103 (22): 2681-2686.
 89. Staudt, A., Staudt, Y., Dörr, M., Böhm, M., Knebel, F., Hummel, A., Wunderle, L., Tiburcy, M., Wernecke, K. D., Baumann, G. and Felix, S. B.: Potential role of humoral immunity in cardiac dysfunction of patients suffering from dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2004; 44 (4): 829-836.
 90. Takahashi, T., Allen, P. D., Lacro, R. V., Marks, A. R., Dennis, A. R., Schoen, F. J., Grossman, W., Marsh, J. D. and Izumo, S.: Expression of dihydropyridine receptor (Ca^{2+} channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *J Clin Invest*, 1992; 90 (3): 927-935.
 91. Waagstein; F.: Adrenergic beta-blocking agents in congestive heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 1995; 16: Suppl O, 128-132.
 92. Wallukat, G., Fu, H.-M., Matsui, S., Hjalmarson, A. and Fu, M. L. X.: Autoantibodies against M2 muscarinic receptors in patients with cardiomyopathy display non-desensitized agonist-like effects. *Life Sci*, 1999; 64 (6-7): 465-469.

93. Wallukat, G., Morwinski, M., Kowal, K., Förster, A., Boewer, V. and Wollenberger, A.: Autoantibodies against the β -adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: β -adrenergic agonism without desensitization. *Eur Heart J*, 1991; 12: Suppl D, 178-181.
94. Wallukat, G.: The β_1 -adrenoceptor as antigen: functional aspects. *Eur Heart J*, 1995a; 16 (Suppl. O): 85-88.
95. Wallukat, G., Reinke, P., Dörffel, W. V., Luther, H. P., Bestvater, K., Felix, S. B. and Baumann, G.: Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunadsorption. *Int J Cardiol*, 1996; 54 (2): 191-195.
96. Wallukat, G. and Wollenberger, A.: Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic β adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim Acta*, 1987; 46 (8-9): 634-639.
97. Wallukat, G., Wollenberger, A., Morwinski, R., Anti- β_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 Moll Cell Cardiol*, 1995b; 27: 397-406.
98. Wang, W. Z., Zhao, R. R., Wu, B. W., Jin, X. H., Zhu, L., Hjalmarson, A. and Fu, M. L.: Effects of anti-peptide antibodies against human M2 muscarinic receptors on cardiac function in rats in vivo. *Blood Press Suppl*, 1996; 3: 25-27.
99. Weisensee, D., Bereiter-Hahn, J., Schoeppe, W. and Low-Friedrich, I.: Effects of cytokines on the Contractility of cultured cardiac myocytes. *Int J Immunopharmacol*, 1993; 15 (5): 581-587.
100. Wenger, N. K.: Women, heart failure, and heart failure therapies. *Circulation*, 2002; 105 (13):1526-1528.

101. Wolff, P. G., Kühl, U. and Schultheiss, H.-P.: Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Am Heart J*, 1989; 117 (6): 1303-1309.
102. Yokoyama, T., Vaca, L., Rossen, R. D., Durante, W., Hazarika, P. and Mann, D. L.: Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*, 1993; 92 (5): 2303-2312.
103. Zannad, F., Briancon, S., Juilliere, Y., Mertes, P.-M., Villemot, J.-P., Alla, F. and Virion, J.-M.: Incidence, clinical and etiologic features and outcomes of advanced chronic heart failure: The EPICAL study. *J Am Coll Cardiol*, 1999; 33 (3): 734-742.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Alexandra Kalisch
geboren am 01.10.1975 in Helmstedt
ledig

Schulbildung

1982-1986 Grundschule Lessingstraße, Helmstedt
1986-1988 Orientierungsstufe Amtsgasse, Helmstedt
1988-1995 Gymnasium Julianum, Helmstedt
Mai 1995 Abitur

Hochschulausbildung

01.10.1995-31.03.1996 Studium der Biologie,
Technischen Universität Braunschweig
01.04.1996-31.03.1998 Studium der Humanmedizin, Freie Universität Berlin
ab dem 01.04.1998 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Humboldt
Universität Berlin
01.05.1999-16.04.2000 Arbeit im Kardiologischen Forschungslabor der Charité im
Rahmen der Dissertation
WS 2001/02 Auslandssemester an der Universität Maastricht,
Niederlande im Rahmen des Erasmus-Austauschprogramms
15.12.2003 Abschluß des Medizinstudiums

Praktische Tätigkeiten/Auslandsaufenthalte

August 1998 Famulatur in der Inneren Medizin, Kreiskrankenhaus St.
Marienberg, Helmstedt
August 2000 Famulatur in der Pädiatrie, Royal Children´s Hospital,
Melbourne, Australien
Sept./Okt. 2000 Famulatur in der Pädiatrie, Hôpital St. Vincent de Paul, Paris,
Frankreich
März/April 2001 Famulatur in der Strahlenklinik der Charité, Campus
Virchow-Klinikum

Sept./Okt. 2001	Famulatur in der Strahlenklinik der Charité, Campus Mitte
Dez. 2001/Jan. 2002	Famulatur in der Pathologie, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Niederlande
Februar 2002	Famulatur in der Inneren Medizin, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Niederlande
2002/2003	Praktisches Jahr 1. Terial: Department of Diabetes and Endocrinology, Royal Melbourne Hospital, Melbourne, Australien; Leitung Prof. Colman Abteilung für Gastroenterologie des Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe, Berlin; Leitung Dr. med. Matthes 2. Terial: Abteilung für Radiologie des Universitätsklinikums Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin; Leitung Prof. Dr. med. Dr. h. c. Felix 3. Terial: Abteilung für Allgemein- sowie Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Leitung Prof. Dr. Neuhaus bzw. Prof. Dr. Mau
Feb.- Sept. 2004	Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie in der DRK-Klinik Mark Brandenburg, Berlin; Leitung Prof. Dr. Steinkamp
ab Oktober 2004	Übernahme als Assistenzärztin in der oben genannten Abteilung

Alexandra Kalisch

11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Stephan B. Felix danke ich für die Überlassung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit und für seine konstruktive Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Alexander Staudt, der mich während meiner Arbeit hervorragend betreut hat und für Fragen und Hilfestellungen zum Arbeitsablauf immer ansprechbar war.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Gert Baumann, der mir eine Arbeitsstelle im Labor ermöglicht hat und somit die Voraussetzung für diese Arbeit geschaffen hat.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Kardiologischen Forschungslabors für anregende Tips und die gute Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders möchte ich Frau Angelika Westphal danken, die mir das Erlernen der Methoden durch ihre Hilfe erleichtert hat und die mich bei der Isolationen der Rattenkardiomyozyten sowie weiteren Arbeitsschritten unterstützt hat. Ohne ihre Hilfe hätte ich die Versuche sicher nicht in so schneller Zeit abschließen können.

Des Weiteren danke ich allen freiwilligen Blutspendern und den Ärzten der Charité Berlin sowie der Klinik für Innere Medizin B in Greifswald, die mir bei der Blutentnahme behilflich waren. Ohne deren Mithilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ferner möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, vor allem bei meinen Eltern Herrn Wolfgang und Frau Sieglinde Kalisch, die durch ihren seelischen Beistand und auch durch ihre finanzielle Unterstützung zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Des Weiteren danke ich meiner Großmutter Frau Margot Kalisch, die mir durch Ratschläge und Aufmunterungen stets sehr geholfen hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt am Schluß all meinen Freunden, besonders Frau Dr. Adrienne Thiele und Herrn Dr. Philipp Boyé, die immer Verständnis für meine Probleme hatten und mir durch ihre Ratschläge weiter geholfen haben.