

Originalien

Auto-Antikörper gegen Herzmuskelsarkolemm im Serum von Patienten mit primärer Cardiomyopathie

W. Sack, H. Sebening und E.D. Wachsmuth

2. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. H. Ley) und 1. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. H. Blömer) der Technischen Universität München und Friedrich-Miescher-Institut, Basel

Autoantibodies against Heartmuscle Sarcolemma in Sera of Patients with an Idiopathic Cardiomyopathy.

Summary. 68 patients with clinical and hemodynamical diagnosis of idiopathic cardiomyopathy (CM) were analysed for antibody in their sera using an immunofluorescence sandwich technique after titration of the sera in tissue sections. 60 of these patients had antibodies against heart muscle sarcolemma with titers up to 1:64. Out of these, the antibodies in 9 sera could be absorbed with group A streptococci. The antibodies reacted in no case with striated or smooth muscle sarcolemma. The 25 patients with an obstructive type of CM showed the highest titers and 12 of them, in addition, had antinuclear factors in their sera. These findings suggested an auto-allergic etiology for most cases of idiopathic CM.

Key words: Idiopathic cardiomyopathy, primary cardiomyopathy autoantibodies reacting with heart muscle sarcolemma.

Zusammenfassung. Antikörper gegen Determinanten des Herzmuskel-Sarkolemm ließen sich in den Seren von 60 der 68 erfaßten Patienten mit idiopathischer Cardiomyopathie (CM) nachweisen. Die Diagnose der Patienten war klinisch und auf Grund haemodynamischer Messungen gestellt worden. Titerendstufen wurden durch Titration des Patientenserums auf Herzmuskelgewebeschnitten gefolgt von Inkubationen mit fluoreszenzmarkiertem Kaninchen-Anti-Human-IgG und fluoreszenzmarkiertem Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG bestimmt. Die Titerendstufen betragen bis 1:64. Nur in 9 Fällen konnte dieser Antikörper durch Streptokokken der Gruppe A absorbiert werden, in keinem jedoch durch quergestreifte oder glatte Muskulatur. Zusätzlich hatten 12 der 25 Patienten mit CM vom obstruktiven Typus antinucleäre Antikörper im Serum. Es ist deshalb mit berechtigten Gründen zu diskutieren, ob für die als idiopathische CM diagnostizierten Fälle eine Autoimmunerkrankung angenommen werden kann.

Schlüsselwörter: Idiopathische Cardiomyopathie, primäre Cardiomyopathie, Autoantikörper gegen Herzmuskelsarkolemm.

Die Diagnose „Cardiomyopathie“ (CM) wird als eine nicht vasculär bedingte Erkrankung des Herzmuskels definiert. Nach Ausschluß von coronaren Herzerkrankungen und Coronarsklerosen, erworbenen Herzklappenfehlern, angeborenen Vitien und Mißbildungen sowie Folgen von arterieller oder pulmonaler Hypertonie werden auf Grund physikalisch-klinischer Untersuchungsergebnisse und haemodynamischer Kriterien eine primäre (idiopathische) und eine sekundäre CM unterschieden [6, 7, 9, 10, 12, 25].

Ursachen wie chronische Mangel- und Fehlernährung, post- bzw. peripartale Genese, metabolische Stö-

rungen sowie toxische und entzündliche Herzmuskel-schädigungen können einen Teil der CM, die sekundären, erklären [6, 12, 31]: deshalb kann bei den sekundären CM eine Einteilung nach ätiologischen Gesichtspunkten erfolgen.

Die Ätiologie und Pathogenese der primären CM sind unbekannt; sie werden nach Ausschluß aller sekundären Formen diagnostiziert [6, 25].

Kaplan [5, 19, 20, 22] und Zabriskie [38–40] haben gezeigt, daß Seren von Patienten mit sekundärer CM Antikörper enthalten, die gegen menschliches Herzmuskelgewebe gerichtet sind; diese Antikörper kreuzreagieren mit autologen, körpereigenen Determinanten und sind deshalb als Autoantikörper zu bezeichnen. β -haemolytische Streptokokken der Gruppe A, Typ V, besitzen antigene Determinanten, die identisch sind mit antigenen Determinanten des Herzmuskelsarkolemm; sie bewirken somit eine Autoimmunerkrankung.

In einem Fall von primärer CM gelang es uns, den Nachweis für eine solche Autoimmunerkrankung zu führen, — auf Grund von Determinantengleichheit zwischen einem α -haemolytischen Streptokokkus und dem Herzmuskelsarkolemm des obduzierten Patienten [35, 36].

Es haben sich deshalb die Fragen gestellt, ob auch bei anderen Patienten mit einer primären CM Autoantikörper gegen Sarkolemm nachzuweisen sind, ob solche Antikörper gegen die gleichen antigenen Determinanten gerichtet sind wie die nach Infektion von Gruppe-A-Streptokokken induzierten Antikörper und ob ihnen eine pathogene Bedeutung zukommt.

Wir haben deshalb innerhalb von 3 Jahren alle Patienten des uns zur Verfügung stehenden Krankengutes mit der Diagnose einer primären, idiopathischen CM auf Antikörper gegen Herzmuskelsarkolemm bzw. gegen Herzmuskulatur untersucht. In der Mehrzahl der Fälle haben wir Antikörper mit Spezifität für Herzmuskelsarkolemm nachweisen können und damit die über eine geringere Anzahl von Patienten mitgeteilten Ergebnisse bestätigt [27, 28]. Die dabei

entwickelte Methode bietet den Ansatz zu einem serologischen Labortest, mit dem primäre CM diagnostiziert und von den sekundären Formen eindeutiger als bisher abgegrenzt werden können.

Krankengut und Methoden

1. Patientenseren

Patienten mit primärer Cardiomyopathie

Die Diagnose primäre CM wurde nach Ausschluß der Ursachen, die für eine sekundäre CM gelten [7, 12, 25], bei 68 Patienten unseres Krankengutes¹ im Zeitraum von Ende 1970 bis Herbst 1973 gestellt.

Bei der Diagnostik der primären CM wurden folgende Untersuchungen routinemäßig durchgeführt: Blutbild, BSG und Bestimmung von Enzymkonzentrationen im Serum, Elektrophorese der Serumproteine, Antistreptolysin-Titer, virologische Untersuchungen sowie Fettwerte im Serum. Es ließen sich in keinem Fall Anzeichen für entzündliche Prozesse, *Carditis rheumatica*, Abweichungen der Enzymkonzentrationen von der Norm, oder Fettstoffwechselstörungen nachweisen; die Luesreaktionen im Serum waren bei allen Patienten negativ.

EKG-Veränderungen unterschiedlicher Ausprägung waren bei allen Patienten festzustellen [7, 9]; 66 der 68 Patienten mit klinischen Hinweisen auf das Vorliegen einer primären CM wurden zur Festlegung der Diagnose einer Herzkatheterisation unterzogen und auf Grund der intracardialen Meßergebnisse in 3 Gruppen eingeteilt [6, 25]:

- 25 Fälle mit hypertrophisch-obstruktiver Form (HOCM),
- 42 Fälle mit kongestiver CM (Insuffizienz-Typ),
- 1 Fall mit obliterativer CM.

Die HOCM zeigten Veränderungen der Carotispulskurve mit rasch ansteigendem und abfallendem Gipfel; das Apex-Cardiogramm führte nach einer überhöhten Vorhofkontraktionswelle (a-Welle) zu einer Doppelgipfelform. Die erhaltenen Druckwerte zeigten ein sog. paradoxes Druckverhalten: nach Auslösen ventriculärer Extrasystolen kommt es während einer der Extrasystole folgenden Kammerkontraktion zu einem Anstieg des Druckgradienten zwischen Ventrikel und Aorta. Ein einheitlich verändertes EKG-Bild ist bei der HOCM nicht festzustellen: häufig sind — auch in unserem Krankengut — große Q-Wellen.

Die kongestive CM weist als häufigste Form der primären CM eine zunehmende Herzinsuffizienz auf, in jedem Fall eine Cardiomegalie (wie bei allen 42 Patienten), oft einen 3. oder 4. Herzton, systolische Geräuschphänomene, — immer ein verändertes EKG [11]. Die typische Dilatation der Ventrikel wurde durch eine der Herzkatheterisation folgende Angiocardiographie als deutliche Vergrößerung des linksventriculären endsystolischen und enddiastolischen Volumens festgestellt.

Die Gruppe der obliterativen CM ist sehr selten; wir konnten einen Fall einordnen, — eine Endocarditis fibroplastica „Löfller“. Die Druckverhältnisse wurden wie die bei HOCM als Kriterien der Einteilung herangezogen.

¹ Die Seren von Patienten, bei denen die Diagnose einer primären CM gestellt worden war, wurden aus folgenden Kliniken zur Verfügung gestellt: I. und II. Medizinische Klinik der Technischen Universität München. III. Medizinische Abteilung des Städt. Krankenhauses München-Harlaching.

Patienten mit anderen myocardialen Erkrankungen

Seren von 21 Patienten mit ausgedehntem Vorder- oder Hinterwandmyocardinfarkt wurden 6–12 Std sowie 4–5 Wochen nach Beginn der Symptome des Herzinfarktes entnommen und getestet; 8 Patienten mit Re-Infarkt wurden ebenfalls in das Krankengut einbezogen. Die Herzinfarkte wurden mittels EKG und Abweichungen der Enzymkonzentrationen von der Norm (SGOT, SGPT, CPK) sowie nach klinischem Verlauf verifiziert.

Weiterhin wurden 18 Seren von Patienten nach Myocardiotoomie und 9 Seren von Myocarditis-Patienten untersucht. Die ersten wurden wegen einer Mitralklappenstenose, eines Vorhofseptum-Defektes oder anderer Herzfehler operiert, die Myocarditis-Fälle durch virologische Untersuchungen verifiziert (Coxsackie, Echo, PPLO etc.).

Gesunde Kontrollpersonen

Seren von 31 klinisch gesunden Kontrollpersonen wurden ebenfalls analysiert; sie setzten sich aus Ärzten der Klinik zusammen, bei denen anamnestisch und auf Grund mindestens jährlich erfolgter Routineuntersuchungen eine cardiale oder andere Erkrankung ausgeschlossen waren. Außerdem wurden hierbei junge Männer berücksichtigt, bei denen zum 1. Mal ein unkompliziertes *Ulcus ventriculi* festgestellt war, die in diesem Zusammenhang klinisch durchuntersucht und mit Ausnahme des Magenculcus als gesund befunden wurden.

2. Herzmuskel-Gewebeschnitte

Das Gewebe wurde bei der Autopsie jugendlicher, durch Unfall plötzlich verstorbener Patienten aus dem linken Ventrikel des Herzens entnommen. Die Zeit der Entnahme bei den drei Patienten war 6,9 resp. 12 Std post mortem. Alle drei Patienten hatten die Blutgruppe 0, Rh positiv. Pathologisch-anatomisch wurden weder makroskopisch noch mikroskopisch cardiale Veränderungen festgestellt. Diese Gewebestücke wurden bei -196°C in flüssigem N_2 eingefroren und in Plastiksäckchen in N_2 aufbewahrt. Kleine Blöcke dieses Herzmuskelgewebes wurden auf -30°C gebracht und von ihnen in einem Kryostaten 5μ dicke Schnitte gefertigt, auf Objektträger aufgezogen und während mindestens 30 min mit einem Föhn bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden in trockenem Aceton 10 min bei $+4^{\circ}\text{C}$ fixiert und anschließend erneut getrocknet. Solche Schnitte wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb von 14 Tagen verwendet.

3. Antiseren

Alle Antiseren wurden selbst hergestellt und gereinigt [34, 37].

Slow-IgG (γ_2)-Fraktionen

Sie wurden aus menschlichem Plasma, Kaninchen- und Ziegen血清 hergestellt durch: 1. Ausfällung von Globulin aus dem Serum (nach vorhergehender Inaktivierung bei 56°C für 30 min) bei 4°C mit 240 g Ammoniumsulfat per Liter gefolgt von 2. Chromatographie auf DEAE-Cellulose bei pH 6,5 in 0,0175 M Natrium-Phosphat-Puffer (1 g DEAE-Cellulose, DE 32 Whatman pro 40 mg Protein), Sammeln der Durchlaufaktion, die 3. nach Ausfällung bei 4°C mit 320 g Ammoniumsulfat per Liter und Dialyse gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS: 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 7,68 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4) auf 25–50 mg Protein

pro ml konzentriert wurde. Die Immunglobulin-Fractionen (IgG) verhielten sich elektrophoretisch wie sehr langsam wandernde γ_2 -Fractionen (slow IgG) und waren immunoelektrophoretisch einheitlich.

Kaninchen-Anti-Human-IgG Serum

10 mg γ_2 -Fraktion aus menschlichem Serum in komplettem Freund Adjuvans wurden jeweils einem Kaninchen in Fußpfoten injiziert, nach 3 Wochen Serum gewonnen und 2 mg subkutan injiziert. Dieser Vorgang wurde 5mal wiederholt, die entnommenen Seren schließlich vereinigt, bei 56°C für 30 min inaktiviert und bei -40°C tiefgefroren aufbewahrt.

Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG Serum

40 mg γ_2 -Fraktion aus Kaninchen-Serum in komplettem Freund Adjuvans wurde in 6 Quaddeln einer Ziege intracutan injiziert, nach 3 Wochen Serum gewonnen und der Injektionsvorgang wiederholt. Seren von 4 Wiederholungen wurden vereinigt, bei 56°C für 30 min inaktiviert und bei -40°C tiefgefroren.

Fluoreszenzmarkiertes γ_2 -Globulin

Nach Präparation von γ_2 -Fraktionen aus Kaninchen-Anti-Human-IgG Seren und aus Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG Seren wurden zu je 100 mg Protein (50 mg/ml PBS) 2 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 9,3 und zu dieser Lösung bei Zimmertemperatur tropfenweise 1 mg Fluoresceinisothiocyanat (FITC) per 100 mg Protein gegeben, für 1 Std das pH oberhalb von 9,0 gehalten, danach neutralisiert und auf Sephadex G 25 in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,6 das freie Fluorescein vom markierten Protein getrennt. Diese Proteinfraktionen wurden an DEAE-Cellulose, äquilibriert mit 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,6 und 0,2% Na₂CO₃, adsorbiert und mit verschiedenen Konzentrationen von NaCl auf Grund ihrer verschiedenen Markierungsgrade eluiert. Die Proteinfraktionen wurden schließlich mit 20 mg Aceton-getrocknet, pulverisierter Meerschweinchen-Leber per 1 mg Konjugat absorbiert. Das molare Verhältnis Fluorescein zu Protein der konjugierten γ_2 -Fraktion des Kaninchen-Anti-Human-IgG war 2,64, das des Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG 1,41.

4. Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Lokalisation fluoreszenzmarkierter Verbindungen im Gewebeschnitt wurde an einem Leitz-Orthoplan-Mikroskop ausgeführt. Hierbei wurde Durchlichtmikroskopie (im Phasenkontrast mit einem Zernike-Kondensor) kombiniert mit der Fluoreszenz-Mikroskopie im Auflichtverfahren (mit Hilfe eines Opak-Illuminators). Als Lichtquelle für die Fluoreszenzmikroskopie diente eine Hg-Hochdrucklampe 100 Watt, deren Anregungslicht mit einem Interferenzlinienfilter von 487 nm gefiltert wurde, während ein Kantensperrefilter 530 nm die Beobachtung des emittierten Lichtes erlaubte. Für die Untersuchungen wurde der Opak-Spiegel Nr. 3 benutzt.

5. Histoimmunologische Fluoreszenztechnik

Anti-Sarkolemm Antikörper im Serum von Patienten

Verdünnungsreihen der zu testenden Humansenen wurden in PBS angesetzt. Aus ihnen wurden jeweils 20 μ l auf einen luftgetrock-

neten Gewebeschnitt getropft, das Präparat in einer feuchten Kammer für 60 min inkubiert, danach mit PBS für 2 \times 5 min gewaschen, kurz in dest. Wasser getaucht, vorsichtig getrocknet (1. Inkubationsschritt) und mit fluoreszenzmarkiertem Kaninchen-Anti-Human-IgG (1 mg/ml) für 45 min inkubiert. Nach 2 \times 5 min Waschen in PBS, Eintauchen in dest. Wasser und geringem Trocknen (2. Inkubationsschritt) wurde für 30 min mit fluoreszenzmarkiertem Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (0,5 mg/ml) inkubiert (3. Inkubationsschritt). Nach erneutem Waschen wurde das Präparat mit einer Mischung aus 50% Glycerin - 50% 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,6 eingebettet und mikroskopisch analysiert. Ein Schnitt wurde dann als negativ beurteilt, wenn im Bereich des Sarkolems des Herzmuskels sowie der Zellkerne die Fluoreszenz gegenüber den Schnitten mit höherer Serumkonzentration nicht mehr nachweisbar war. Als Titerendstufe wurde die Verdünnungsstufe eines Human-Serums bezeichnet, bei der noch Fluoreszenz optisch nachweisbar war.

Anti-Nucleus Antikörper im Serum von Patienten

Für die Bestimmung des Gehaltes an antinucleären Antikörpern (ANF) wurden frische, 5 μ dicke Rattenleberschnitte verwandt, die Aceton-fixiert waren; sie wurden mit dem Serum für 45 min inkubiert (1. Inkubationsschritt), gewaschen und mit fluoreszierendem Kaninchen-Anti-Human-IgG (2. Inkubationsschritt) die Bindung an Zellkerne gemessen. Als positive Kontrollen dienten Seren von Patienten mit Lupus erythematoses visceralis. Titerendstufe war die Verdünnungsstufe des Humansenums, bei der Zellkerne der Leber durch FITC-Antikörper-Anfärbung noch optisch sichtbar waren.

6. Isolierung von Streptokokken-Zellmembranen

Die Präparation wurde in Anlehnung an [2, 8] durchgeführt. Beta-haemolytische Streptokokken der Gruppe A wurden in Serum-Bouillon (20 l von Todd-Hewitt-Brühe) bei 37°C 12 Std gezüchtet, autoklaviert, die Bakterien mit 3000 rpm aus dem Nährboden abzentrifugiert, 2 \times mit physiologischer NaCl-Lösung und 1 \times mit Aqua dest. gewaschen und mit Aqua dest. aufgeschwemmt. Nach Homogenisierung (Homogenisator der Fa. Braun, Melsungen) mit Glaskugeln von 0,16-0,18 mm Durchmesser für 5 min wurde der Überstand bei 8000 \times g für 60 min bei +4°C zentrifugiert, das Sediment verworfen, der Überstand in PBS resuspendiert und für 120 min bei 8000 \times g erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer präparativen Ultrazentrifuge (Spinco, Rotor Nr. 30) bei 100000 \times g für 120 min zentrifugiert, das Sediment in PBS aufgenommen.

Um übriggebliebene Zellwände von Zellmembranen zu lösen, wurden kleine Mengen von Streptomyces albus-Enzym (Endo-N-Acetyl-Muramidase) zugegeben [16, 17, 30, 32]. Diese Aufschwemmung von Streptokokken-Zellmembranen enthielt 13 mg Protein per ml.

7. Humanes Muskelgewebe-Homogenat

Herzmuskel wurde 4-12 Std nach Autopsie, quergestreifte Skelettmuskulatur aus M. rectus abdominalis und glatte Muskulatur aus der Cervix uteri von Operationsmaterial gewonnen, in einem Fleischwolf zerkleinert und in dreifachem Volumen 0,01 M Tris-HCl-Puffer, 0,25 M Saccharose pH 7,2 aufgenommen und in einem Potter-Elvehjem-Apparat fein homogenisiert. Die Suspension wurde für 30 min bei 16000 \times g zentrifugiert und der Überstand zur Absorption von Seren verwendet. Die Proteinkonzentration betrug für

das Präparat aus Herzmuskel 16 mg/ml, für das aus Skelettmuskulatur 14 mg/ml und das aus glatter Muskulatur 9 mg/ml.

8. Absorptionstechnik

Ein Teil der Streptokokken-Zellmembranen (Methoden 6) bzw. ein Teil Muskelextrakt (Methoden 7) wurde mit einem gleichen Teil Patientenserum gemischt und für 120 min bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend für 20 min bei 8000 RpM abzentrifugiert und der Überstand in PBS bis 1:128 verdünnt; diese Verdünnungen wurden auf Herzmuskelschnitten inkubiert, um die Titerstufe des Antikörpers zu erfassen (Methoden 5).

9. Cardiolipin-Bestimmung

Jedes Patienten-Serum wurde zum Ausschluß falsch-positiver Ergebnisse mit dem Cardiolipin-Flockungs-Test und auf Lues-Nebenreaktionen untersucht.

Als Kontrollen wurden CF-positive Seren von Patienten mit Lues-Infektion auf humanen Herzmuskel-Gewebeschnitte inkubiert.

Ergebnisse

1. Methode und Spezifität des Nachweises humoraler Antikörper aus Seren von Patienten mit primärer Cardiomyopathie

Herzmuskelgewebeschnitte, inkubiert mit Verdünnungsreihen humaner Seren der CM-Patienten, banden humanes Immunglobulin sarkolemmal und subsarkolemmal (Abb. 1). Dieses Human-Immunglobulin konnte mit der Immunfluoreszenzmethode nur bei ad-

ditiver Verwendung von Kaninchen-Anti-Human-IgG und Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen werden: die Menge an gebundenem fluoreszierendem Immunglobulin des Kaninchen-Anti-Human-IgG reichte für einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis nicht aus. Erst die zusätzliche Anwendung von fluoreszierendem Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG Immunglobulin ermöglichte es den Bindungsort zu lokalisieren (Abb. 1). Die „Anfärbarkeit“ in diesem 3-Schichten-Verfahren des Immunfluoreszenztestes war abhängig von der Konzentration des in dem ersten Schritt zugefügten Patientenserums. Voraussetzung hierfür war, daß Antikörper aus Kaninchen-Anti-Human-IgG und Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG Immunglobulinfraktionen unter Sättigungsbedingungen eingesetzt werden. Nach Vorinkubation mit unverdünntem Patientenserum und Kaninchen-Anti-Human-IgG in Konzentrationen von 4 mg/ml, 2 mg/ml und 1 mg/ml und nachfolgender Inkubation mit Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (10 mg/ml) war die Fluoreszenz auf dem Schnitt gleich stark, während sie bei niedrigeren Konzentrationen abnahm. Aus analogen Verdünnungsversuchen mit Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG bei gleichbleibender Konzentration des Human-Serums und des Kaninchen-Immunglobulins (1 mg/ml) ergab sich eine kritische Konzentration von 0,5 mg/ml für gleichbleibende Fluoreszenz auf dem Schnitt. Mit einer Konzentration von 1 mg/ml Kaninchen-Immunglobulin und 0,5 mg/ml Ziegen-Immunglobulin werden also alle Antigen-Determinanten in dem Inkubationssystem zur Sättigung titriert. Inkubation der Schnitte mit 1. markier-

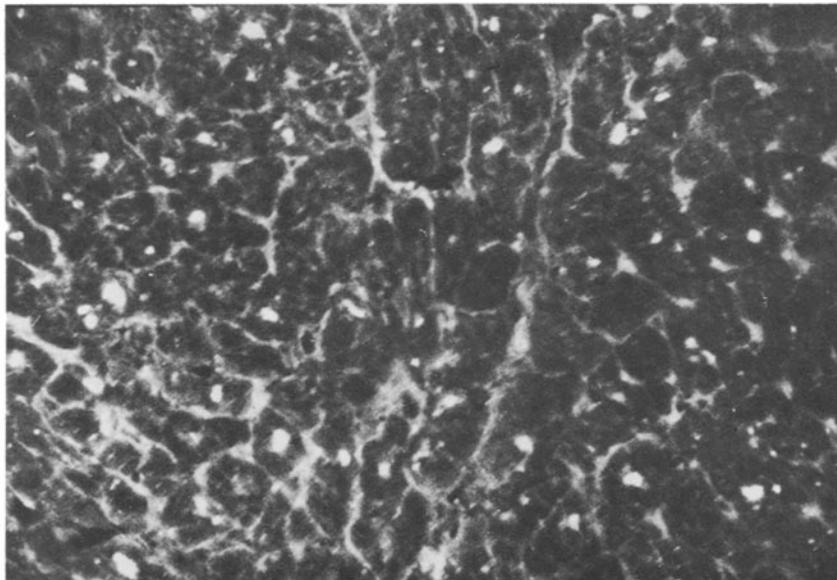


Abb. 1. Darstellung der Lokalisation von Antikörper aus Patientenserum auf einem menschlichen Herzmuskelschnitt. Der Schnitt wurde mit einem Patientenserum, das 1:32 verdünnt war, inkubiert. Die Lokalisation des Bindungsortes erfolgte durch Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Immunglobulinen, Kaninchen-Anti-Human-IgG, gefolgt von Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG. Vergrößerung 360×

tem Kaninchen-Anti-Human-IgG allein, oder 2. gefolgt von markiertem Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG, oder 3. von markiertem Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG allein, jeweils ohne Vorinkubation mit Human-Serum vom CM-Patienten, oder 4. gleiches wie 1–3 nach Vorinkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen bewirkten keine Fluoreszenz des Schnittes. Als Kontrollen für die Spezifität der Antikörper aus CM-Serum gegen Herzmuskelsarkolemm wurden alle Seren auf Gewebeschnitten von Skelettmuskulatur und glatter Muskulatur titriert. In keinem Fall ließ sich eine Fluoreszenz nachweisen.

2. Reproduzierbarkeit der Methode

Um zu prüfen, ob die antigenen Determinanten des durch Autopsie gewonnenen menschlichen Herzmuskelgewebes (1) durch fortschreitende Autolyse eine Änderung erfahren und in der Lage sind, Antikörper aus dem Serum zu binden, wurden 63 Patientenserum simultan an 3 Herzmuskelproben untersucht, die 6 Std, 9 Std resp. 12 Std post mortem entnommen und bei -196°C konserviert worden waren (Tabelle 1). Es wurden nur diese 3 Herzmuskelgewebsstücke benutzt, d.h. immer auf den gleichen Standard zurückgegriffen. Es war nicht erkennbar, daß die antigenen Determinanten mit zunehmender Zeitdauer nach post-

Tabelle 1. Histologischer Nachweis von Serumantikörper nach Bindung an Herzmuskelsarkolemm

	Endverdünnung des Patienten- serums (Titerendstufe)	Zahl der positiven Seren (Endstufen)		
		6 Std ^a	9 Std ^a	12 Std ^a
Cardio- myopathie Patienten (n=63)	1:1	—	1	—
	1:2	4	5	4
	1:4	8	8	9
	1:8	10	9	10
	1:16	14	15	14
	1:32	11	12	13
	1:64	7	6	7
1:128	1	—	—	
Myocarditis- Patienten (n=9)	1:1	1	1	—
	1:2	—	1	1
	1:4	—	—	—
	1:8	—	—	—
	1:16	—	—	—
Gesunde Kontroll- Personen (n=31)	1:1	1	1	1
	1:2	—	—	1
	1:4	—	—	—
	1:8	—	—	—
	1:16	—	—	—

^a Die Zahlen in Klammern geben den Zeitpunkt der Entnahme des Herzmuskels post mortem an.

mortaler Entnahme des Herzmuskels (bis zu 12 Std) eine Änderung erfahren haben. Es ist wahrscheinlich, daß diese Tatsache mit der im Vergleich zu anderen Organen langsamer fortschreitenden Autolyse der Herzmuskulatur zu erklären ist. Bei der Bestimmung des Titers jeweils eines Serums auf den 3 verschiedenen Herzmuskelpräparaten, am gleichen Tag oder an verschiedenen Tagen, variierte die Titerbestimmung um maximal 1 Stufe (Tabelle 1). Patientenserum, die über längere Zeit von $1/2$ –1 Jahr bei -40°C eingefroren aufbewahrt worden waren, zeigten einen Verlust an Antikörperaktivität von etwa einer Titerstufe. Herzmuskelgewebe von Patienten mit rheumatisch bedingten Vitien, ob intra operationem oder post mortem gewonnen, waren nicht verwertbar. Schnitte von solchen Geweben lieferten bereits positive Resultate, wenn sie nur mit fluoreszenzmarkiertem Kaninchen-Anti-Human-IgG (ohne vorherige Inkubation mit Patientenserum) behandelt worden waren. Human-Antikörper muß also bereits in vivo am Sarkolemm dieser Testpräparate gebunden sein. Für die immunhistologische Untersuchung schied somit frisches Herzmuskelgewebe, das aus Operationsmaterial gewonnen worden war, aus.

3. Serumantikörper-Konzentrationen bei idiopathischer Cardiomyopathie

Die Untersuchung von Serum auf Antikörper gegen Herzmuskelsarkolemm bei 68 Patienten mit primärer, idiopathischer Cardiomyopathie ergab, daß dieser Antikörper in 60 Fällen nachweisbar war. Die Mehrzahl der Seren hatte einen Titer von 1:16, nur wenige einen Titer von 1:2 bzw. 1:64 (Tabelle 1, Abb. 2).

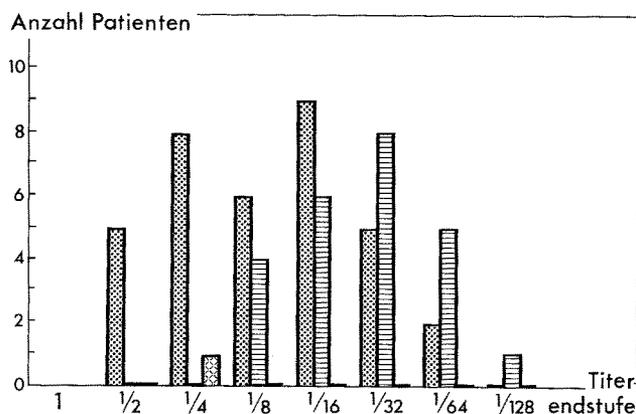


Abb. 2. Titerendstufen der Anti-Sarkolemm-Antikörper von Patientenserum mit idiopathischer Cardiomyopathie. Antikörper war nachweisbar bei der CM vom kongestiven Typus in 35/42 Fällen (linke Säulen), vom obstruktiven Typus in 24/25 Fällen (mittlere Säulen) und vom obliterativen Typus in 1/1 Fällen (rechte Säulen)

Die Verteilung von Titerendstufen der Patientenserum in den einzelnen klinischen Formen war unterschiedlich. So hatten die Patienten mit einer primären CM vom Insuffizienztypus im Mittel weniger Antikörper als Patienten mit hypertrophisch-obstruktiver CM (Abb. 2). Die Anzahl der Seren von Patienten mit obliterativer CM war zu klein, um sie analysieren zu können.

4. Spezifität des Serumantikörpers

Um die Spezifität der Nachweismethode sowie des Antikörpers zu überprüfen, wurden die Seren der Patienten mit primärer CM mit homologem Herzmuskelgewebe und mit isolierten Membranen von Streptokokken der Gruppe A absorbiert.

Diese Membranen wurden im Verhältnis 1:1 mit Serum von Patienten mit primärer CM gemischt und auf Herzmuskelschnitten bis 1:128 titriert. Aus dem Serum von 9 Patienten ließ sich auf diese Weise der Antikörper total absorbieren: Es waren dies 8/41 Seren von Patienten mit einer CM vom Insuffizienztypus und 1/25 Seren von Patienten mit obstruktiver, hypertrophischer CM. Alle übrigen Seren hatten nach Absorption unveränderte bzw. in 12/60 Fällen um eine Stufe erniedrigte Antikörpertiter.

Um die Spezifität der immunhistologischen Nachweismethode zu kontrollieren, wurden alle Seren mit humanem Herzmuskel absorbiert. In allen Fällen ließ sich der Antikörper abhängig von der Menge zugegebenen Herzmuskelextraktes aus dem Serum herausabsorbieren; 2 mg Herzmuskelextraktprotein in 1 ml Serum bewirkten eine Abnahme des Titers von 1:32 auf 1:4, 8 mg in 1 ml Serum eine totale Elimination des Antikörpers. Auch bei Patienten mit Zustand nach Cardiotomie waren dadurch die Antikörper zu beseitigen (12 Fälle).

Absorptionen mit Homogenaten von quergestreifter Skelettmuskulatur und glatter Muskulatur, die mit Proteinkonzentrationen des Gewebekomplexes bis zu 7 mg/ml Serum ausgeführt wurden, erzielten keine Erniedrigung oder Elimination der Antikörpermenge gegen Herzmuskelsarkolemm.

5. Antinucleärer Antikörper bei primären Cardiomyopathien

Antikörper gegen Nucleoproteine, DNS und andere Zellkernbestandteile (ANF) werden bei vielen autoimmunologischen Erkrankungen beobachtet. Aus diesem Grunde wurden alle CM-Seren qualitativ auf ihren Gehalt an ANF untersucht. Nur Patienten mit

Tabelle 2. Anzahl der Patienten mit antinucleärem Antikörper bei primärer Cardiomyopathie

kongestiv – insuffizient	3/42
obstruktiv – hypertrophisch	11/25
obliterativ	1/1

Es ist die Zahl der Patienten mit antinucleärem Antikörper pro Patienten – Gesamtzahl einer Gruppe angegeben.

obstruktiver, hypertrophischer CM besaßen in etwa der Hälfte der Fälle ANF (Tabelle 2).

6. Überprüfung des Vorkommens von Antisarkolemm-Antikörper

Seren von 31 klinisch gesunden Probanden wurden auf Antisarkolemm-Antikörper getestet (Tabelle 1). Nur in 2 Fällen wurde eine Antikörperbindung an das Sarkolemm beobachtet, jedoch war dies nur mit unverdünntem Serum demonstrierbar. Von 21 Patienten, 1–35 Tage nach frischen, ausgedehnten Myocardinfarkten sowie 12 Patienten 1–18 Tage nach Re-Infarkten, hatte keiner Antisarkolemm-Antikörper im Serum. Dagegen waren Antikörper bei 2 von 9 Patienten mit akuter Myocarditis mit einem Titer von 1:1 bzw. 1:2 nachweisbar. In diesen letzten Fällen konnte eine Streptokokken-Infektion nicht ausgeschlossen werden.

7. Ausschluß falsch-positiver Lues-Reaktionen

Alle Seren der Patienten mit primärer CM wurden mit dem Cardiolipin-Flockungstest und auf Lues-Nebenreaktionen untersucht: in keinem Fall konnte ein positiver Befund nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden 3 Seren von Patienten mit positiven Lues-Reaktionen auf humane Herzmuskel-Gewebschnitte inkubiert: es konnte keine Bindung von Immunglobulin an Sarkolemm gefunden werden.

Diskussion

Im Serum von 60 Patienten mit primärer idiopathischer Cardiomyopathie (90%) war ein gegen Herzmuskelsarkolemm gerichteter Antikörper nachweisbar. Dieser reagierte nicht mit dem Sarkolemm von glatter oder Skelettmuskulatur. Der Befund legt den Gedanken nahe, daß ein Zusammenhang zwischen Vorkommen des Antikörpers und der Erkrankung im Sinne einer Autoimmunkrankheit besteht. Dies kann um so mehr angenommen werden, als bei bestimmten rheu-

matischen Herzerkrankungen in den vergangenen Jahren ebenfalls Antikörper, die mit menschlichem Herzmuskel reagieren, nachgewiesen werden konnte [3, 4, 13–15, 18, 21, 23, 24, 26, 31, 38]. Diese Antikörper – von Zabriskie „heart reactive antibodies“ genannt – sind Streptokokken-Zellmembran induziert bzw. weisen Kreuzreaktionen mit Antigenen von Streptokokken der Gruppe A auf [15, 38, 39]. Sie sind durch Streptokokken-Zellmembranen absorbierbar. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß eine solche Verwandtschaft antigener Determinanten bei der primären Cardiomyopathie nicht besteht. Hiermit im Einklang befinden sich auch unsere klinisch erhobenen Befunde, nach denen ein Herzrheumatismus ausgeschlossen wird.

Nach Cardiotomien wird humoraler Antikörper, der nicht durch Streptokokken-Membranen absorbierbar ist [18, 28], ähnlich wie im Fall der idiopathischen CM nachgewiesen. Es wird hierbei deshalb eine nicht durch Streptokokken induzierte Immunantwort angenommen, sondern als Ursache der Untergang von autologem Herzgewebe in Abhängigkeit vom „myocardial Trauma“ diskutiert [1, 15, 29]. Andererseits ist jedoch auch eine Booster-Reaktion nach Entfernung eines Endocarditisherdes denkbar, wenn die die Endocarditis auslösenden Bakterien mit Herzmuskel kreuzreagierende antigene Determinanten besitzen. Für letztere Annahme spräche, daß bei Myocardinfarkten, bei denen ebenfalls Gewebsuntergang stattfindet, bisher keine Antisarkolemm Antikörper gefunden wurden [4, 7], was wir nach unseren Ergebnissen an Patienten mit Myocardinfarkten bestätigen können.

In einem Modellsystem mit humanem ANF und mit den auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten fluoreszenzmarkierten Anti-Immunglobulinen haben wir kürzlich die quantitativen Verhältnisse des hier benutzten Testsystems und dessen Empfindlichkeit untersucht [37]. Durch Photometrie der fluoreszenzmarkierten Antikörper in loco wurde am Mikroskop gezeigt, daß der Nachweis von Antikörper in dem Dreischichten-System gegenüber dem in dem Zweischichten-System zehnfach sensitiver ist, und daß es sehr wohl gelingt, die Sättigung antigener Determinanten auf dem Gewebepräparat quantitativ zu erfassen [37]. Für eine diagnostische Routinemethode erschien diese Methode jedoch zunächst zu aufwendig, weshalb wir hier auf das Titrationsverfahren mit Endpunktbestimmung zurückgegriffen haben.

Aus unseren Ergebnissen an Serien von Patienten mit idiopathischer primärer CM kann geschlossen werden, daß auf Grund der Titerendstufen die Antikörpermenge im Serum hoch ist, andererseits aber die Anzahl oder Dichte der antigenen Determinanten am Herzmuskelsarkolemm gegen die der Antikörper gerichtet

ist, klein sein muß, da die gebundenen Antikörper ansonsten bereits mit einem Zweischichten-System nachweisbar werden.

Der bei der primären Cardiomyopathie vorkommende spezifische Antikörper gegen Herzmuskelsarkolemm sowie der antinucleäre Antikörper könnten eine Erklärung der Pathogenese dieser Erkrankung im Sinne einer speziellen Autoimmunkrankheit liefern. Da in der Mehrzahl der Fälle die Erkrankung mit einer Cardiomegalie und einer Herzinsuffizienz einhergeht, die durch Digitalispräparate nicht beeinflussbar ist, könnte angenommen werden, daß der Antikörper des Patienten eine Schädigung am Herzmuskel im Sinne einer cytotoxischen oder auch intercellulären Reaktion hervorruft [18, 33, 36]. Eine solche Schädigung würde dann die Leistung des Herzmuskels herabsetzen und in der Folge eine kompensatorische Hypertrophie des Herzens auslösen. Die Abklärung eines solchen Vorganges kann nur experimentell gelöst werden. Verlaufsformen der Krankheit sollten Hinweise liefern.

Herrn Prof. Dr. W. Gössner (Pathologisches Institut der TUM) sind wir für die Erlaubnis dankbar, einen Teil der Untersuchungen in seinem Institut ausführen zu können, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe (Wa 20/5).

Literatur

1. Bachmann, G.W.: Immunchemische Untersuchungen myocardialer Antigene des Menschen. *Verh. dtsh. Ges. Kreisf.-Forsch.* **36**, 324 (1970)
2. Bleiweiss, A.S., Karakawa, W.W., Krause, R.M.: Improved technique for the preparation of streptococcal cell walls. *J. Bact.* **88**, 1198 (1964)
3. Das, S.K., Callen, J.P., Dodson, V.N., Cassidy, I.T.: Immunoglobulin binding in cardiomyopathic hearts. *Circulation* **44**, 612 (1971)
4. Das, S.K., Cassidy, J.T., Petty, R.E.: Antibodies against heart muscle and nuclear constituents in cardiomyopathy. *Amer. Heart J.* **83**, 159 (1972)
5. Espinosa, E., Kaplan, M.H.: Antigenic analysis of human heart tissue. *J. Immunol.* **106**, 611 (1971)
6. Fowler, N.O.: Differential diagnosis of cardiomyopathies. *Progr. cardiovasc. Dis.* **14**, 113 (1971)
7. Fowler, N.O.: Classification and diagnosis of myocardial diseases. In: *Myocardial diseases*. New York and London: Grune & Stratton 1973
8. Freimer, E.H.: Studies of L-forms and protoplasts of group A streptococci. *J. exp. Med.* **117**, 377 (1963)
9. Friedberg, C.K.: Introduction – Symposium Cardiomyopathy. *Circulation* **44**, November (1971)
10. Goodwin, J.F.: Congestive and hypertrophic cardiomyopathies. A decade of study. *Lancet* **1970 I**, 731
11. Gleichmann, U., Loogen, F., Lück, I.: Verlaufsbeobachtungen bei Patienten mit nicht obstruktiver Form der idiopathischen Myocardiopathie. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **77**, 916 (1971)
12. Grosse-Brockhoff, F.: Zur Klassifizierung, Aetiologie und Pathogenese der Myocardiopathien. *Dtsch. med. Wschr.* **96**, 659 (1971)

13. Halbert, S.P., Holm, S.E., Thompson, A.: Cardiac auto-antibodies (I. Immunodiffusion analysis ...) *J. exp. Med.* **127**, 613 (1968)
14. Hess, E.V., Fink, C.W., Taranta, A., Ziff, M.: Heart muscle antibodies in rheumatic fever. *J. clin. Invest.* **43**, 886 (1964)
15. Hess, E.V., Kirsner, A.: Immunologic studies in myocardial diseases. In: *Myocardial diseases*. New York and London: Grune & Stratton 1973
16. Heymer, B., Haferkamp, O., Schmidt, W.C.: Präparation und Anwendung FITC-markierter Streptokokkenzellwand-Kohlenhydrate. *Z. Immun.-Forsch. Allerg., klin. Immun.* **140**, 457 (1970)
17. Heymer, B., Schäfer, H., Haferkamp, O.: Vergleichende elektronenoptische und biochemische Untersuchungen über die Wirkung einer *Streptomyces albus* Endo-N-acetyl-Muramidase auf die Streptokokkenzellwand. *Med. Microbiol. Imm.* **158**, 193 (1973)
18. Holm, S.E., Halbert, S.P., Lin, T.M., Sobran, S., Woldow, N.: Cardiac auto-antibodies. *Int. Arch. Allergy* **38**, 130 (1970)
19. Kaplan, M.H., Suchy, M.L.: Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. II. Crossreaction of antisera to mammalian heart tissue with a cell wall constituent of certain strains of group A streptococci. *J. exp. Med.* **119**, 643 (1964)
20. Kaplan, M.H., Svec, K.H.: Immunologic reaction of streptococcal and tissue antigens. III. Presence in human sera of streptococcal antibody crossreactive with heart tissue. Association with streptococcal infection rheumatic fever and glomerulonephritis. *J. exp. Med.* **119**, 651 (1964)
21. Kaplan, M.H.: Autoimmunity to heart. In: *Textbook of immunopathology*, vol. 2 (Miescher, P.A., Müller-Eberhard, H.J., eds.). New York and London: Grune & Stratton 1969
22. Kaplan, M.H.: Autoimmunity to heart and its relation to heart disease. *Progr. Allergy* **13**, 408 (1969)
23. Kaplan, M.H., Frengley, I.D.: Autoimmunity to heart in cardiac disease: Current concepts of the relation of autoimmunity to rheumatic fever, postcardiotomy and postinfarction syndromes and cardiomyopathies. *Amer. J. Cardiol.* **24**, 459 (1969)
24. Klaiman, A., Kamin-Belsky, N., Feldman, S., Kariv, I.: Immunologic studies in familial cardiomyopathie. *Amer. J. Cardiol.* **28**, 707 (1971)
25. Kuebler, W., Kuhn, H., Loogen, F.: Die Kardiomyopathien. *Z. Kardiologie* **62**, 3 (1973)
26. Robinson, I., Anderson, T., Griebble, H.: Serologic anomalies in idiopathic myocardial disease. *Clin. Res.* **14**, 335 (1966)
27. Sack, W., Wachsmuth, E.D.: Nachweis von Autoantikörpern bei Myocardiopathien. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **78**, 859 (1972)
28. Sack, W., Wachsmuth, E.D., Sebening, H.: Antikörper, antigene Determinanten und Kreuzreaktionsstudien bei Cardiomyopathien. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **79**, 1118 (1973)
29. Scheiffarth, F.: Immunpathogenese von Myocardiopathien. *Kliniker* **4**, 97 (1972)
30. Schmidt, W.C.: The lysis of cell walls of group A streptococci by *Streptomyces albus* enzyme treated with diisopropylfluorophosphate. *J. exp. med.* **121**, 771 (1965)
31. Segal, J.P., Harvey, W.P.: Diagnosis and treatment of primary myocardial disease. *Circulation* **32**, 837 (1965)
32. Sellin, D., Heymer, B., Smith, T.B., Bültmann, B., Haferkamp, O., Schmidt, W.C.: Streptococcal A-carbohydrate antigen. *Arch. Path.* **90**, 17 (1970)
33. Thompson, A.M., Halbert, S.P.: The cardiac auto-immune system. *Int. Arch. Allergy* **40**, 274 (1971)
34. Wachsmuth, E.D., Lachmann, P.: The use of antigen-antibody precipitates for specific detection of antigens in tissue sections. *Immunology* **17**, 469 (1969)
35. Wachsmuth, E.D.: Eine einfache und spezifische Fluoreszenzmethode für den Nachweis von Antigenen und Antikörpern. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **54**, 272 (1970)
36. Wachsmuth, E.D., Born, U.: An alpha-haemolytic streptococcus strain causing a lethal autoallergic disease in human heart. *Brit. med. J.* **1972 III**, 623
37. Wachsmuth, E.D., Woodhams, R.L.: A quantitative approach for immunofluorescence in microscopy: the use of antibody multilayers on nuclei. *Histochemistry* **38**, 339 (1974)
38. Zabriskie, J.B., Hsu, K.C., Seegal, B.C.: Heart-reactive antibody associated with rheumatic fever: Characterisation and diagnostic significance. *Clin. exp. Immunol.* **7**, 147 (1970)
39. Zabriskie, J.B., Read, S.E., Ellis, R.J.: Cellular and humoral studies with heart-reactive antibodies. *Progr. in Immunology*, vol. I (Amos, B., ed.). New York, London: Academic Press 1971.
40. Zabriskie, J.B., Freimer, E.H.: An immunological relationship between the group A streptococcus and mammalian muscle. *J. exp. Med.* **124**, 661 (1966)

Dr. W. Sack
 2. Medizinische Klinik
 der Technischen Universität
 Dr. H. Sebening
 1. Medizinische Klinik
 der Technischen Universität
 D-8000 München 80
 Ismaninger Str. 22
 Bundesrepublik Deutschland

Prof. Dr. E.D. Wachsmuth
 Friedrich-Miescher-Institut
 Postfach 273
 CH-4002 Basel
 Schweiz