

III. Eigene Untersuchungen

1. Material

1.1. Patienten

Für die vorliegende Arbeit konnten von 150 untersuchten Hunden mit dilatativer Kardiomyopathie insgesamt 80 Hunde aus 26 unterschiedlichen Rassen und Mischlingen ausgewählt werden. Hiervon waren 62 (77,5%) Tiere männlich und 18 (22,6%) weiblich. Das Alter der Hunde bei Erstvorstellung lag zwischen 6 Monaten und 13 Jahren. Bei den Tieren handelt es sich um eine Auswahl von Patienten der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin, bei welchen im Untersuchungszeitraum von Januar 1997 bis Dezember 2000 durch mindestens eine kardiologische Untersuchung eine dilatative Kardiomyopathie diagnostiziert wurde. Die Auswertung erfolgte bis Juni 1998 retrospektiv, danach prospektiv. Folgende Auswahlkriterien führten zur Aufnahme in die Untersuchungsgruppe:

Bei der echokardiographischen Untersuchung mußte die Verkürzungsfraktion unter $FS = 25\%$ liegen und/oder eine sichtbare Dilatation des linken Ventrikels vorhanden sein. Es durften keine Hypertrophie von Septum oder linksventrikulärer Hinterwand, sowie Anomalien der Herzklappen oder anderen Strukturen vorhanden sein, die zu einer kongestiven Herzinsuffizienz führen können. Die dopplerechokardiographisch ermittelten maximalen Blutflußgeschwindigkeiten mußten in der Aorta unter 1,8 m/sek und in der Pulmonalarterie unter 1,6 m/sek liegen. Ebenso durfte keine überwiegende rechtsventrikuläre Vergrößerung durch ein „Cor pulmonale“ vorhanden sein. Außerdem sollten keine weiteren systemischen Erkrankungen vorliegen, wovon die Hypothyreose ausgenommen wurde.

Bei Hunden, die bei der Erstuntersuchung an einer klinisch und radiologisch erkennbaren Stauungsinsuffizienz litten, reichte eine echokardiographische Untersuchung zur Diagnosesicherung. Bei klinisch und radiologisch unauffälligen Hunden, d.h. Hunde mit der Diagnose „subklinische DKMP“, mußten sich die Befunde der ersten sonographischen Untersuchung in mindestens einer Wiederholungsuntersuchung bestätigen. Ohne Therapie durfte es keine Verringerung der Ventrikeldiameter oder einen Anstieg der Verkürzungsfraktion auf $FS \geq 25\%$ geben. Bei einem Hund mit subklinischer DKMP, der nicht erneut einer echokardiographischen Untersuchung unterzogen werden konnte, wurde das spätere Auftreten von Symptomen einer Herzinsuffizienz als Bestätigung dieser Diagnose bewertet.

1.2. Untersuchungsgruppen

Bei 70 Hunden wurde eine dilatative Kardiomyopathie ohne eine weitere systemische Erkrankung diagnostiziert. Diese bildeten die **Gruppe 1**, die anhand des bei der Erstuntersuchung ermittelten Herzinsuffizienzstadiums der Hunde weiter unterteilt wurde. Hierbei bestand **Gruppe 1a** aus 13 Hunden, **Gruppe 1b** aus 29 Hunden und **Gruppe 1c** aus 28 Hunden.

Zehn weitere Hunde mit DKMP litten zusätzlich an einer Hypothyreose. Diese Tiere bildeten die **Gruppe 2**. Hier wurde aufgrund der durch die Schilddrüsenunterfunktion möglichen Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens keine Einteilung in Herzinsuffizienzstadien vorgenommen.

Die Herzinsuffizienz-Gruppen (**1a** bis **1c**) ergaben sich aus einer Modifikation der Einteilung in Herzinsuffizienzstadien entsprechend der „New York Heart Association“ (NYHA) (*Ettlinger und Suter 1970*). **Gruppe 1a** stellte hier die Gruppe von Hunden mit asymptomatischer (subklinischer) DKMP dar. Hunde dieser Gruppe erschienen dem Besitzer unauffällig hinsichtlich der Belastungsfähigkeit und wurde nur aus eigenem Interesse oder aus Gründen wie die Feststellung eines Herzgeräusches, einer bekannten Herzerkrankung bei einem verwandten Tier oder gewissenhafter Zuchtabsicht zur kardiologischen Untersuchung vorgestellt. Ebenfalls als „symptomfrei“ wurden hierbei Tiere angesehen, bei denen ein oder mehrere „Anfälle“ beobachtet wurden, wenn kein erkennbarer Zusammenhang mit der Herzfunktion bestand (entsprechend NYHA-Stadium I).

In **Gruppe 1b** befanden sich diejenigen Hunde, bei denen geringe Leistungseinbußen aufgefallen waren, die vermehrt hechelten oder nach größerer Belastung längere Erholungsphasen brauchten als zuvor und keinen Husten zeigten (entsprechend NYHA-Stadium II).

Der **Gruppe 1c** wurden Hunde zugeordnet, die bei geringer bis mäßiger Belastung oder anderem Streß Symptome der Herzinsuffizienz, insbesondere Husten zeigten. Tiere, die schon in Ruhe oder bei sehr geringem Streß Symptome wie Husten und Dyspnoe oder Anzeichen einer Rechtsherzinsuffizienz aufwiesen, sind ebenfalls in dieser Gruppe enthalten. Außerdem mußten sich in dieser Gruppe die unterschiedlichen Zeichen einer kongestiven Herzinsuffizienz auch im Thoraxröntgenbild nachvollziehen lassen. **Gruppe 1c** stellte also die Gruppe der Hunde mit „Stauungsinsuffizienz“ infolge DKMP dar (entsprechend den NYHA-Stadien III und IV). Eine Zusammenfassung dieser Gruppeneinteilung gibt Tabelle 4.

Tab. 4: Einteilung der Hunde mit dilatativer Kardiomyopathie (**Gruppe 1**) in modifizierte Herzinsuffizienz-Gruppen.

Gruppe	Kennzeichen
1a	Der Hund ist gut belastbar und für den Besitzer unauffällig. Bei Anamnese und klinischer Allgemeinuntersuchung sind keine pathologischen Befunde zu erheben (asymptomatische DKMP) \cong NYHA I.
1b	Der Hund zeigt eine geringe Abnahme der Leistungsfähigkeit. Vom Besitzer werden längere Erholungsphasen und/oder vermehrtes Hecheln nach starker Belastung bemerkt \cong NYHA II.
1c	Der Hund zeigt eine deutlich verminderte Belastungsfähigkeit und zeigt in Ruhe oder bei geringer Belastung Beschwerden der Herzinsuffizienz. Vom Besitzer werden Husten, Bewegungsunlust, Atemnot, eine Zunahme des Bauchumfanges, Anorexie oder ein reduziertes Allgemeinbefinden bemerkt (Stauungsinsuffizienz) \cong NYHA III und IV.

29 Hunde wurden zu einer Wiederholungsuntersuchung und 21 zu einer oder mehreren weiteren Untersuchungen vorgestellt. Bei 30 Hunden konnte nur eine Untersuchung durchgeführt werden.

1.3. Rasse- und Geschlechtsverteilung

Die Gesamtgruppe setzte sich aus 26 unterschiedlichen Hunderassen, sowie verschiedenen Mischlingen zusammen. Als kleinste Hunderasse kam der Englische Cocker Spaniel, als größte die Deutsche Dogge vor. Mit 14 Tieren (17,5%) stellte der Dobermann Pinscher die am häufigsten vertretene Rasse dar. Es folgten die Rassen Deutsche Dogge (n = 8; 10%), sowie Boxer und Englischer Cocker Spaniel (beide n = 6; 7,5%). Je vier Tiere der Gesamtgruppe waren Golden Retriever und Pon. Der Deutsche Schäferhund war mit drei Tieren vertreten, während alle anderen Rassen ein oder zweimal vorkamen. Die genaue Verteilung der am häufigsten vorkommenden Rassen insgesamt und in den einzelnen Untersuchungsgruppen ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Verteilung der Geschlechter in der Gesamtgruppe und den vier Untersuchungsgruppen zeigt Tabelle 6.

Tab. 5: Verteilung der sechs häufigsten Rassen insgesamt und innerhalb der Untersuchungsgruppen.

Rasse n	gesamt 80	Gruppe 1a 13	Gruppe 1b 29	Gruppe 1c 28	Gruppe 2 10
Dobermann	14	0	5	8	1
Dt. Dogge	8	1	4	3	0
Boxer	6	1	0	3	2
Cocker Spaniel	6	0	1	4	1
Gold. Retriever	4	2	2	0	0
Pon	4	3	1	0	0
sonstige	38	7	16	9	6

Tab. 6: Geschlechtsverteilung in der Gesamtgruppe und in den einzelnen Untersuchungsgruppen.

Geschlecht n	gesamt 80	Gruppe 1a 13	Gruppe 1b 29	Gruppe 1c 28	Gruppe 2 10
m/mk	56/6	8/2	18/2	22/2	8/0
% männliche	77,4	76,9	69,0	85,7	80,0
w/wk	13/5	3/0	8/1	2/2	0/2
% weibliche	22,6	23,1	31,0	14,2	20,0

2. Methode

Bei den retrospektiv betrachteten Hunden wurden alle noch zugänglichen Daten zur Beurteilung herangezogen und fehlende Befunde ggf. bei erneuter Vorstellung ergänzt. Alle prospektiv beurteilten Hunde wurden mindestens einer speziellen Untersuchung des Herzkreislaufsystems unterzogen. Diese bestand aus Aufnahme der Anamnese, Auskultation, Beurteilung von Röntgenaufnahmen des Thorax und EKG, sowie einer echokardiographischen Untersuchung. Zudem erfolgten blutchemische Analysen, die im entsprechenden Abschnitt genauer beschrieben werden.

2.1. Anamnese und Allgemeinuntersuchung

Bei der Befunderhebung wurde insbesondere auf die Belastungsfähigkeit des Hundes, verlängerte Erholungsphasen oder auf eventuell bei Belastung, Freude oder anderem Streß auftretende Symptome einer Herzinsuffizienz geachtet. Gezielt gefragt wurde nach dem Auftreten von Synkopen, Zyanosen sowie Anorexie. Desweiteren sollte eine Hypothyreose anamnestisch erkannt, bzw. die Notwendigkeit einer diagnostischen Abklärung abgeschätzt werden.

Die klinische Allgemeinuntersuchung umfaßte die Adspektion des Tieres zur Beurteilung der Atemfrequenz und des Atmungstyps, sowie der Schleimhautfarbe und die Palpation von Lymphknoten, Abdomen und Femoralarterien. Bei Verdacht auf einen Aszites mußte dieser sonographisch oder radiologisch bestätigt werden.

2.2. Auskultation

Die Auskultation des Herzens wurde am stehenden Tier von beiden Thoraxseiten vorgenommen. Beurteilt wurden Herzfrequenz, Rhythmus, Lautstärke der Herztöne und Herzgeräusche.

In die Untersuchungsbefunde aufgenommen wurde die Lautstärke eines vorhandenen systolischen Geräusches eingeteilt nach *Detweiler und Patterson (1965)*:

Grad 1: Das leiseste noch hörbare Geräusch.

Grad 2: Ein leises, nach wenigen Herzschlägen hörbares Geräusch.

Grad 3: Ein sofort und über einen größeren Thoraxbereich hörbares Geräusch.

Grad 4: Das lauteste Geräusch, das nicht mit von der Thoraxwand abgehobenem Phonendoskop hörbar ist.

Grad 5: Ein lautes Geräusch, das auch mit von der Thoraxwand abgehobenem Phonendoskop hörbar ist.

2.3. Röntgenologische Untersuchung

Bei der Erstuntersuchung wurde von 76 Hunden eine Thoraxaufnahme im latero-lateralen Strahlengang in linker Seitenlage und von 50 dieser Tiere zusätzlich eine Aufnahme in Brustbauchlage im dorsoventralen Strahlengang erstellt. Bei drei Hunden konnten aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes keine Röntgenaufnahmen angefertigt werden. Bei einem weiteren Tier wurden bei der Untersuchung Fremdaufnahmen beurteilt, die später nicht mehr zugänglich waren. Die Beurteilung erfolgte entsprechend den Angaben von *Kealy (1981)* sowie *Lord und Suter (1999)* in Bezug auf

Veränderungen von Größe und Form der Herzsilhouette sowie Stauungserscheinungen. Zur Beurteilung der Höhe der Herzsilhouette im Verhältnis zur Thoraxhöhe wurde die maximale Ausdehnung des Herzens in der Höhe und die Thoraxhöhe als Verlängerung dieser Geraden mittels Lineal ausgemessen. Aus den Werten wurde der Quotient Herzhöhe/Thoraxhöhe gebildet. Zusätzlich wurde eine Beurteilung der Herzgröße in der lateralo-lateralen Aufnahme mittels „Vertebral scale system“ nach *Buchanan und Bücheler (1995)* vorgenommen (Angabe der Herzgröße in Relation zur Größe der Wirbelkörper).

2.4. Elektrokardiographische Untersuchung

Standardmäßig wurde ein EKG des Patienten in rechter Seitenlage mit senkrecht zum Körper und parallel zueinander gehaltenen Gliedmaßen angefertigt. Es wurden die allgemein üblichen Ableitpunkte nach *Tilley (1989)* verwendet. Die Aufzeichnung der Elektrokardiogramme erfolgte mittels tragbarer Dreikanalschreiber vom Typ „Cardiotest EK 53 R“¹ und „Multiscriptor EK 33“¹.

Die Auswertung und Interpretation der bipolaren Ableitungen nach Einthoven (I, II und III) sowie der unipolaren Extremitätenableitungen nach Goldberger (aVR, aVF, aVL) erfolgte entsprechend den Angaben von *Tilley (1989)*. Außerdem wurde aus den Summen der QRS-Komplexe der Ableitungen I und aVF der Frontal- bzw. Modalvektor bestimmt (*Detweiler 1984*).

Zur Beurteilung von Anzeichen einer pathologischen linksventrikulären Vergrößerung wurden folgende Größenangaben als „Normalwerte“ angesehen: R-Zacken Amplituden in Ableitung II und aVF bis 2,5 mV bzw. bei Hunden unter zwei Jahren und schmalen Brustkorb bis 3,0 mV, eine QRS-Komplex Dauer bis 0,06 Sekunden, eine ST-Strecken Senkung bis -0,2 mV, T-Wellen Amplituden bis zu ¼ der R-Zacken Amplitude sowie ein Frontalvektor bis + 40° (*Tilley 1989*).

2.5. Echokardiographische Untersuchung

Die sonographische Untersuchung wurde in allen Fällen mit dem 2D-Echtzeit-Sektorscanner Ultraschallgerät „Sigma 44 HVCD“² unter Verwendung eines 5 MHz-Schallkopfes mit Annular-Phased-Array Technik durchgeführt. Die Beurteilung des Herzens erfolgte im 2D-Bild, im M-Mode sowie durch Doppleruntersuchung im gepulsten und kontinuierlichen Verfahren, wobei eine gleichzeitige EKG-Ableitung auf dem Gerätebildschirm dargestellt wurde. Das Gerät ermöglicht die zeitgleiche Darstellung

¹ Fa. Hellige, Freiburg

des zweidimensionalen und des „time motion“ Bildes nebeneinander, wobei jeweils eine der Darstellungen als Standbild erfolgt, so daß die Ebene des abgebildeten M-Modus jederzeit im 2D-Bild überprüft werden kann. Gleiches gilt auch für die Dopplerdarstellung.

Teile der Untersuchungen wurden mit einem S-VHS-Videorekorder zur späteren Überprüfung und Wiederholung der Messungen aufgezeichnet.

Standardmäßig fand die echokardiographische Untersuchung am in Seitenlage fixierten Tier statt. Zur Verbesserung der Darstellbarkeit erfolgte die Anschallung durch eine Aussparung in der Platte des Untersuchungstisches von der jeweils unten liegenden Thoraxseite aus. Tiere, deren Allgemeinbefinden keine Seitenlage zuließ wurden im Stehen untersucht. Nach Rasur und Entfettung der Haut mit Ethanol wurde Ultraschallkontaktgel im Bereich parasternal zwischen 3. und 5. Interkostalraum aufgetragen.

Die Nomenklatur der für die Ausmessungen benutzten Schnittebenen und Schallkopfpositionen richtet sich nach den Empfehlungen des „Committee on nomenclature and standards in two-dimensional echocardiography“ der „American Society of Echocardiography“ (*Henry et al. 1980*) unter Berücksichtigung der Besonderheiten beim Hund (*Thomas et al. 1993*). Die verwendeten Abkürzungen, die sich auf die einzelnen Herzabschnitte oder -strukturen beziehen, entsprechen nicht in jedem Fall den „nomina anatomica“.

Nach subjektiver Beurteilung der kardialen Strukturen und Bewegungen in der rechtsparasternalen Kurzachsen-Ansicht durch beide Ventrikel, sowie im Längsachsenschnitt der gleichen Seite.

erfolgte die Messung der Wandstärken von Septum und linksventrikulärer Hinterwand, sowie der Diameter des linken Ventrikels in Diastole und Systole im M-Mode entsprechend den Empfehlungen der „American Society of Echocardiography“ (*Sahn et al. 1978*) sowie der WHO (*O'Rourke et al. 1984*). Angestrebt wurde eine einheitliche Messung im rechtsparasternalen Längsachsen-Vierkammerblick bei vollständig geöffnetem linken Vorhof und linkem Ventrikel, ohne Anteile der Aorta im 2D-Bild (*Thomas et al. 1993*). Die Messungen in der Diastole erfolgten zu Beginn des QRS-Komplexes, die Messungen der systolischen Dimensionen bei normaler Septumbewegung an der Spitze der Posteriorbewegung des Septums, in anderen Fällen am kleinsten LV-Diameter (*Sahn et al. 1978*; *O'Rourke et al. 1984*).

² Fa. Kontron instruments, Neufahrn

In der gleichen Ansicht wurde die Mitralklappenbewegung beurteilt und die „E-point septal separation“ (EPSS) gemessen, wobei eine Darstellung beider Klappensegel im M-Mode nicht immer gelang. Die EPSS-Messung erfolgte routinemäßig als Abstand zwischen dem E-Punkt des septalen Mitralklappensegels und dem direkt senkrecht darüber liegenden Septumendokard (*Kienle und Thomas 1995*). Zusätzlich erfolgte die Messung des kürzesten Abstandes zwischen E-Punkt und Septum eines Herzzyklus entsprechend den Angaben von *Massie et al. (1977)*. Die Messung des Verhältnisses der Diameter von linkem Atrium und Aorta erfolgte in der Ansicht des rechtsparasternalen Längsachsen-LV-Ausflußtraktes bei vollständig geöffneter Aorta auf der Höhe der Aortenklappe (*Sahn et al. 1978; Thomas et al. 1993; O'Rourke et al. 1984*).

Bei allen Messungen wurden jeweils die Mittelwerte aus drei (nicht direkt aufeinander folgenden) Herzzyklen verwendet.

Durch die geräteeigene Software wurden aus den Mittelwerten der Meßdaten die Verkürzungsfraction (Fractional shortening = FS), die Ejektionsfraction (Ejection fraction = EF), das endsystolische und enddiastolische Volumen (ESV und EDV) mittels korrigierter CUBE-Formel nach *Teichholz et al. (1976)* und der Quotient aus enddiastolischem Aortendiameter und endsystolischem Diameter des linken Vorhofs (LA/Ao) errechnet. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des endsystolischen Volumenindex (ESVI) entsprechend den Angaben von *Knight (1995)*, sowie die Berechnung der systolischen Dickenzunahme (% Δ) von interventrikulärem Septum und linksventrikulärer Hinterwand. Die Formeln für die genannten Berechnungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Interpretation der ermittelten Daten erfolgte nach den Angaben von *Bonagura et al. (1985)*.

Die im linksparasternalen apikalen Vierkammer- und Fünfkammerblick, sowie in linksparasternaler kranialer Kurzachsen-Ansicht durchgeführten Doppleruntersuchungen dienten dem Ausschluß von Stenosen der Gefäße oder Semilunarklappen, AV-Klappen-Anomalien und anderer angeborene kardiovaskulärer Defekte. Soweit vorhanden, wurde ein Reflux über den AV-Klappen mittels gepulstem (PW), sowie kontinuierlichem (CW) Dopplerverfahren in Anlehnung an die Angaben von *Boon (1998 a)* semiquantitativ beurteilt. Hierbei wurde eine Unterteilung des Refluxes in drei Schweregrade vorgenommen, wobei ein geringgradiger Reflux einem systolisch auftretendem Blutfluß in das Atrium hinein entsprach, der maximal 20% von dessen Ausdehnung erreichte. Als mittelgradig wurde ein Reflux bezeichnet, der bis zu 50% der Vorhoffläche einnahm, als hochgradiger Reflux ein noch stärker ausgeprägter Regurgitationsjet.

2.6. Laboruntersuchungen

Bei allen untersuchten Hunden wurde mindestens bei einer Vorstellung eine Blutuntersuchung zur Erkennung weiterer Erkrankungen oder Imbalanzen vorgenommen. Die Blutprobenentnahme erfolgte hierzu entweder aus der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena lateralis. Je nach Größe des Tieres wurde eine Kanüle mit 0,9 mm oder 1,1 mm Durchmesser verwendet. Es wurden Lithiumheparin-Röhrchen³ zur Gewinnung von Plasma, EDTA-Natrium Röhrchen⁴ zur Gewinnung von Vollblut und unbeschichtete Serumröhrchen⁴ verwendet.

Natrium, Kalium, Blutzucker und Harnstoff wurden im Analysegerät Nova 14 plus⁴ bestimmt. Die Bestimmung der Konzentrationen von Kreatinin, Magnesium, Cholesterin und der Enzymaktivität von Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Alanin-Aminotransferase (GPT), Alkalischer Phosphatase (AP) und Aspartat-Amino-Transferase (GOT) erfolgte mit dem Cobas-Mira-Großanalyser⁵. Im Verdachtsfall wurde zusätzlich ein großes Blutbild im Gerät Cell Dyn 3500⁶ angefertigt.

Die Interpretation der Laborparameter erfolgte entsprechend den Angaben der Referenzbereiche nach *Schmidl und Forstner (1985)*.

Zur Erkennung einer Hypothyreose wurde bei verdächtigen Hunden eine Bestimmung der Konzentration von T₄ und TSH im Serum in einem Fremdlabor⁷ durchgeführt. Als pathognomonisch galt hierbei eine Serum T₄ Konzentration unter 1,0 µg/dl bei einer TSH-Konzentration von über 0,45 ng/ml. Bei sechs Hunden wurde die Diagnose mittels TSH-Stimulationstest gesichert, wobei nach Feststellung eines basalen T₄ Spiegels ≤ 1,2 µg/dl ein Anstieg vier Stunden nach i.m.-Injektion von 2 IU TSH⁸ um nicht mehr als 0,5 µg/dl bei einem Gesamt T₄ Spiegel unter 2,5 µg/dl als beweisend für das Vorliegen einer Hypothyreose angesehen wurde. Die Bestimmung des Thyroxinspiegels wurde bei vier dieser Hunde in einem anderen Großlabor⁹ durchgeführt.

³ Fa. Saarstedt, Nümbrecht

⁴ Fa. Nova biomedical, Rödermark

⁵ Fa. Hoffmann- La Roche AG, Grenzen-Wyhren

⁶ Fa. Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden

⁷ Fa. Biocontrol, Mainz

⁸ Fa. Sigma Albrecht Chemie GmbH, Steinheim

⁹ Laboklin, Labor für klinische Diagnostik GmbH, Bad Kissingen

2.7. Spezielle Laboruntersuchungen

2.7.1. L-Carnitinbestimmung

Die Bestimmung der Carnitinkonzentrationen im Serum erfolgte im Stoffwechsellabor der Kliniken für Kinderheilkunde und Kinderchirurgie der Charité, Campus Virchow-Klinikum der Humboldt-Universität zu Berlin. Hierzu wurden die Serumproben zunächst tiefgefroren, um dann als Sammelprobe in das oben genannte Labor transportiert zu werden, wo die sofortige Analyse vorgenommen wurde.

Die Bestimmung der Konzentration von Gesamtcarnitin und von freiem Carnitin im Serum erfolgte spektrophotometrisch nach der Methode von *Cederblad et al. (1986)*. Nach Ultrafiltration der Serumprobe mittels MPS Filter¹⁰ bei mind. 2000g für 30 Minuten wurden für die Bestimmung des Gesamtcarnitins zunächst 100 µl der Probe bei 50°C mit 10 µl 1,0 mol/L KOH inkubiert, um eine Hydrolyse der Carnitinerester zu erreichen. Anschließend erfolgte die Neutralisation des Inkubates mit 2,0 µl HCL (5,0 mol/L). Die Bestimmung des freien Carnitins erfolgte direkt aus einer ultrafiltrierten Probe. Die spektrophotometrische Analyse der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 412 nm mittels Cobas Fara¹¹ vorgenommen. Erhaltene Werte wurden in µmol/l angegeben. Die Meßgenauigkeit der Methode lag bei 1,0 µmol/l bei einer Nachweisgrenze von 2,0 µmol/l.

2.7.2. Taurinbestimmung

Als weitere spezielle Untersuchung wurde im oben genannten Labor eine Bestimmung der Plasmataurinkonzentration durchgeführt. Hierzu wurden 500 µl des durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4000 Umdrehungen/min. gewonnenen Plasmas zur Eiweißausfällung mit 100 µl 25%-iger Sulfosalicylsäure vermischt und 30 Minuten lang bei 4°C gekühlt. Bei der Bestimmung aus Vollblut wurden 1000 µl des Blutes mit 200 µl Sulfosalicylsäure vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren der Probe für fünf Minuten bei 12000 Umdrehungen pro Minute wurde der gewonnene Überstand abpipettiert und bei -18°C tiefgefroren.

¹⁰ Fa. Milipore GmbH, Eschborn

¹¹ Fa. Hoffmann-La Roche & Co., Basel

Jeweils vor Abgabe einer Sammelprobe zur Taurinbestimmung erfolgte die weitere Aufbereitung der einzelnen Proben, indem nach dem Auftauen je 200 µl mit 500 µl Lithiumcitratpuffer¹² vermischt und hiervon 300 µl in ein Analyseröhrchen pipettiert wurden. Die Taurinbestimmung erfolgte im chromatographischen Labor der oben genannten Kliniken mittels Säulenchromatograph¹³ bei einer Säulentemperatur von 38°C. Der Tauringehalt wurde im Kationenaustauschverfahren mit Lithiumcitrat ermittelt. Hierbei wird Taurin ausgewaschen und reagiert dann bei 120°C mit Ninhydrin zu einem blau-violetten Farbkomplex, dessen photometrische Messung (750 nm) einen Peak ergibt. Die Fläche unterhalb des Peaks wird mittels Differentialrechnung bestimmt und der Tauringehalt gegen eine Taurinstandardlösung¹⁴ ermittelt. Bei dieser Methode lag die untere Nachweisgrenze bei 2,0 nmol/l.

2.8. Verlaufskontrolle

Die Überlebenszeit wurde vom Tag der ersten kardiologischen Untersuchung bis Dezember 2000 betrachtet. Zur Auswertung der Überlebenszeiten wurden die Hunde verwendet, die aufgrund der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz euthanasiert wurden, sowie verstorbene Hunde, bei denen keine andere Todesursache gefunden werden konnte. Hunde, die am Ende der Untersuchung noch lebten oder aufgrund nicht kardialer Ursachen verstorben waren wurden „zensiert“. Dabei sollte nicht versucht werden, einen Einfluß der Therapie auf den Verlauf der Erkrankung oder die Überlebenszeit der Hunde aufzudecken. Bis auf vier Hunde mit subklinischer DKMP erhielten alle Hunde der **Gruppe 1** eine Therapie, die aus einem ACE-Hemmer (Enalapril oder Ramipril), einer positiv inotrop wirkenden Substanz (β -Methyldigoxin oder Pimobendan) und einem Diuretikum (Furosemid oder Bumetanid) allein oder in Kombination bestand. In Einzelfällen wurden zusätzlich Propranolol oder Mexiletin zur antiarrhythmischen Therapie eingesetzt. Außerdem erfolgte bei Bedarf eine Kalium-und/oder Magnesiumsubstitution. Hunde mit Hypothyreose erhielten je nach Schweregrad der Herzinsuffizienz Thyroxin allein (zwei Fälle) oder zusammen mit einem oder mehreren der oben erwähnten Medikamente. Ein Hund erhielt aufgrund erniedrigter Taurinkonzentrationen im Plasma zusätzlich Taurin¹⁵ und ein weiteres Tier wurde mit einem carnitinhaltigen Präparat¹⁶ versorgt.

¹² Fa. Merk, Darmstadt

¹³ Fa. Biotronic-Wissenschaftliche Geräte GmbH, Maintal

¹⁴ Fa. Sigma, Deisenhofen

¹⁵ Fa. Serva, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg

¹⁶ Cardiotin H-Pulver, Fa. Almapharm, Kempten

2.9. Statistische Methoden

Alle Berechnungen der beschreibenden sowie der schließenden Statistik erfolgten mit Hilfe des Programms SPSS für Windows Version 10.0. Insgesamt handelt es sich in dieser Arbeit um eine explorative Beschreibung von Fällen, die in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere vorgestellt wurden, so daß verallgemeinernde Aussagen für eine Gesamtpopulation nicht möglich sind.

Zur Beschreibung einiger Daten und zur gleichzeitigen graphischen Darstellung wurden Box-and-Whisker Diagramme verwendet. Bei dieser Darstellung umfaßt die Box die mittleren 50% der Werte, also den Bereich zwischen erstem und drittem Quartil. Die breite horizontale Linie innerhalb der Box stellt den Median dar. Die Whisker dienen der Darstellung des minimalen, sowie des maximalen Wertes, solange diese innerhalb des 1,5-fachen Boxabstandes von der Box entfernt liegen. Weiter entfernt liegende Werte werden als Ausreißer durch Kreise gekennzeichnet, solche, die mehr als den 3-fachen Boxabstand entfernt liegen, werden als Extremwerte durch Sterne gekennzeichnet.

Zum Vergleich einzelner Merkmale zwischen den Untersuchungsgruppen wurden nichtparametrische Tests verwendet. Zum Aufdecken von Unterschieden zwischen allen vier Gruppen kam der Kruskal-Wallis Test zum Einsatz, zum Vergleich eines Merkmals zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Bei beiden führte eine Signifikanz von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese. Die Ermittlung von Abhängigkeiten zwischen zwei Merkmalen wurde durch die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman durchgeführt. Hier wurde $p > 0,05$ als signifikant und $p < 0,01$ als hoch signifikant angesehen.

Mittels Kaplan-Meier Methode wurden Überlebenskurven erstellt. Dabei fanden auch diejenigen Fälle Berücksichtigung, bei denen das betrachtete Ereignis (in diesem Fall der Tod) bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes noch nicht eingetreten war. Diese wurden in der graphischen Darstellung als zensierte Fälle gekennzeichnet. Bei der Berechnung des Mittelwertes wurden die Überlebenszeiten der zensierten Fälle auf die längste beobachtete Überlebenszeit reduziert. Um Unterschiede der Verläufe der Überlebenskurven unter Berücksichtigung diskreter Merkmale zu berechnen, wurde der Log Rang Test verwendet. Als signifikant galt hierbei $p < 0,05$.

Zum Aufdecken eventueller Einflüsse von kontinuierlichen Variablen auf die Überlebenszeit wurde eine Regressionsanalyse nach Cox durchgeführt. Auch hier wurden die zensierten Fälle mit einbezogen. Für Fälle, bei denen sofort nach der Diagnosestellung die Euthanasie erfolgte, wurde hierbei die

Überlebenszeit mit einem Tag angegeben, da das verwendete SPSS-Programm Fälle mit nicht positiver Zeit von den Berechnungen ausschließt. Es wurde ein $p < 0,05$ bei der Wald-Statistik als signifikant angesehen.

Sämtliche Tests wurden nur verwendet, um die Wertung eines „deutlichen“ Unterschieds zu rechtfertigen. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde hier als „deutlich“ bezeichnet.