

DEGENERATIEVE MYELOPATHIE BIJ DE HOND

Aantal woorden: <9.993>

Jody van der Beek

Studentennummer: 01502495

Promotor: dr. S. Bhatti

Promotor: Prof. dr. L. van Ham

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2017-2018

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

Voorwoord

Allereerst wil ik mijn begeleidende promotor bedanken voor alles. Dr. S. Bhatti heeft mij goed geholpen tijdens dit literatuuronderzoek. Ik heb misschien niet zoveel mails gestuurd en ben ook niet zoveel langs gegaan, maar het contact dat we hadden was heel goed. Ik werd snel geholpen en door haar enthousiasme werd ik zelf ook steeds meer enthousiast. Het was een heel interessant onderwerp om te beschrijven en ik ben blij dat ik dat onder haar begeleiding heb mogen doen.

Verder wil ik mijn ouders en mijn broer bedanken voor hun interesse en het feit dat ik het grootste deel van mijn onderzoek bij hen heb mogen schrijven. Het was een leuke ervaring om dat te mogen doen naast mijn vader in de werkkamer en naast de serieuze momenten hebben we ook goed gelachen. Ik bedank ze ook voor hun bewondering en enthousiasme want zonder hen was dit nooit mogelijk geweest!

Verder wil ik mijn vriend Wim, vrienden van Antwerpen en mijn studievrienden bedanken voor de gesprekken die we hebben gehad over mijn literatuuronderzoek. Ook zij hebben veel interesse getoond en mij gesteund waar nodig. Het was ook fijn om met mijn studievrienden erover te kunnen praten omdat zij op dat moment hetzelfde meemaakten. Hierdoor hebben wij elkaar ook goed kunnen helpen. In het bijzonder wil ik Machteld bedanken voor de gesprekken en Veerle en Niels voor het nalezen van mijn onderzoek. Naast de serieuze momenten hebben mijn vrienden mij uiteraard ook helpen ontspannen, iets waar ik ze ook heel dankbaar voor ben!

Inhoudsopgave

1	Samenvatting.....	6
2	Inleiding.....	7
3	Literatuurstudie	9
3.1	Signalement	9
3.2	Pathogenese.....	9
3.2.1	Genetisch	9
3.2.2	Inflammatoir.....	10
3.2.3	Amyotrofische laterale sclerose	11
3.3	Klinische symptomen.....	11
3.3.1	Vroeg stadium	12
3.3.2	Laat stadium	13
3.4	Differentiaaldiagnose	13
3.5	Diagnose	14
3.5.1	Ante-mortem.....	14
3.5.2	Post-mortem	15
3.6	Therapie.....	18
4	Discussie.....	22
5	Referentielijst	25

Lijst met afkortingen

ALS	amyotrofische laterale sclerose
cSOD1	canien superoxide dismutase 1
CSV	cerebrospinaal vocht
CT	computer tomografie
DM	degeneratieve myelopathie
EMG	elektromyografie
HMN	hoger motorneuron
hSOD1	humaan superoxide dismutase 1
hsp70	heat shock protein 70
LMN	lager motorneuron
MRI	magnetic resonance imaging
pNF-H	gefosforyleerd neurofilament
PWC(s)	Pembroke Welsh Corgi(s)
SOD1	superoxide dismutase 1

1 Samenvatting

Caniene degeneratieve myelopathie (DM) is een neurodegeneratieve aandoening welke wordt gezien in meerdere hondenrassen en kruisingen. Typisch voor deze aandoening is dat de symptomen beginnen op late leeftijd. De aandoening is het gevolg van een mutatie in het superoxide dismutase 1 gen. Deze mutatie wordt ook gezien bij 20% van een genetisch overdraagbare familiale vorm van amyotrofische laterale sclerose (ALS) bij de mens. Dit maakt dat DM gebruikt kan worden als model voor ALS. De diagnose van DM kan enkel post-mortem aan de hand van histopathologisch onderzoek met zekerheid worden gesteld. Bovendien bestaat er ook nog geen curatieve therapie voor DM. Dit maakt het zeer interessant om DM te vergelijken met ALS. Bij ALS speelt inflammatie namelijk een zeer belangrijke rol in de pathogenese, iets wat nog niet goed gekend is bij DM. Door dit te onderzoeken bij honden met DM kunnen er mogelijks nieuwe therapieën worden ontwikkeld. Verder is er voor ALS nog weinig bekend over het verloop van de aandoening omdat mensen enkel sterven in het eindstadium. Dit maakt dat DM zeer interessant is voor ALS omdat honden in verschillende stadia worden geëuthanaseerd. In dit literatuuronderzoek wordt er dan ook verder ingegaan op de aandoening DM en worden er ook vergelijkingen gemaakt met ALS. Er is echter nog meer onderzoek nodig naar beide aandoeningen. Dit komt enerzijds doordat de prevalentie van DM 0,19% is en dus niet veel voorkomt, maar anderzijds blijkt ook uit de studies dat de gebruikte groepen dieren te klein zijn om de bevindingen significant te kunnen noemen.

Sleutelwoorden:

- Degeneratieve myelopathie
- Amyotrofische laterale sclerose
- Superoxide dismutase 1
- Diagnose
- Therapie

2 Inleiding

Situering

Degeneratieve myelopathie (DM) is een progressieve neurodegeneratieve aandoening die voorkomt bij meerdere hondenrassen. De eerste symptomen worden gezien vanaf een leeftijd van 5 jaar, gemiddeld gezien komen de klinische symptomen voor rond de leeftijd van 8 jaar. De aandoening begint met symptomen die te wijten zijn aan een ruggenmergletsel gelokaliseerd tussen de 3^e thoracaalwervel en 3^e lumbaalwervel. Dit uit zich in een progressieve, asymmetrische hoger motorneuron (HMN) paraparese en een veralgemeende proprioceptieve ataxie ter hoogte van de achterste ledematen. Uiteindelijk zal dit evolueren naar lager motorneuron (LMN) paraparese van de achterste ledematen met mogelijks ook aantasting van de voorste ledematen. Dysfagie en incontinentie zijn ook mogelijk (Coats en Wininger, 2010). De meeste honden zijn echter al voor dat stadium geëuthanaseerd (Crisp et al., 2013).

Probleemstelling

Er is nog geen duidelijke oorzaak voor DM maar er zijn wel bepaalde zaken die worden gezien bij de aangetaste honden. Er zijn aanwijzingen dat DM een immunologische oorzaak kan hebben, maar het kan ook inflammatoir of genetisch zijn. Genetisch gezien is er een puntmutatie aangetoond in de hypervariabele regio 2 van het DLA-DRB1, een regio die is gelegen op het superoxide dismutase 1 (SOD1) gen (Coats en Wininger, 2010). Deze mutatie is enzymatisch actief en minder stabiel waardoor er aggregaten worden gevormd die de functie van de cellen in het centraal zenuwstelsel gaan verstoren (Crisp et al., 2013). Mutaties in dit gen worden ook gezien bij bepaalde vormen van amyotrofische laterale sclerose (ALS) bij de mens (Coats en Wininger, 2010).

Het probleem bij het stellen van de diagnose van DM is dat deze pas definitief is na histopathologisch onderzoek. Op dit onderzoek moet axonale degeneratie, demyelinisatie en astrogliosis worden aangetoond om definitief vast te kunnen stellen dat het om caniene DM gaat (Nardone et al., 2016). De diagnose kan dus pas post-mortem worden gesteld. Ante-mortem wordt er een vermoedelijke diagnose gesteld aan de hand van de progressieve klinische symptomen en het uitsluiten van andere mogelijke aandoeningen. Dit wordt onder andere gedaan door middel van magnetic resonance imaging (MRI), computer tomografie (CT) of myelografie (Coats en Wininger, 2016). Elektromyografisch onderzoek toont pas abnormale resultaten in een later stadium van de ziekte omdat er dan pas lager motorneuron letsels voorkomen (Nardone et al., 2016). Deze hulpmiddelen geven dus nog geen zekerheid. Doordat er een mutatie in het SOD1 gen is aangetoond, is het mogelijk om deze mutatie aan te tonen aan de hand van een DNA test. Dieren die homozygoot zijn voor deze mutatie hebben namelijk een risico op het ontwikkelen van DM. Bovendien geven deze dieren de mutatie door aan hun nakomelingen, dus ook naar de fok toe is dit interessant. Het nadeel is dat selectie tegen deze mutatie kans geeft op de ontwikkeling van andere aandoeningen of het kan goede eigenschappen van het ras laten verdwijnen (Coats en Wininger, 2010). Bovendien zullen niet alle honden die homozygoot zijn voor deze mutatie de aandoening ontwikkelen. Dit heeft te maken met het feit dat het niet volledig autosomaal recessief overerft (Awano et al., 2009; Nardone et al., 2016). Het stellen van de diagnose van caniene DM ante-mortem is dus niet vanzelfsprekend.

Er bestaat ook nog geen curatieve therapie voor DM. Er zijn een aantal onderzoeken geweest waarin men de levenskwaliteit van een hond met DM heeft geprobeerd te verbeteren, maar op lange termijn is de prognose voor deze aandoening slecht. Hetzelfde geldt voor ALS bij de mens. Er zijn een aantal medicijnen getest op muizen, maar het probleem is dat hun primitief zenuwstelsel en hun gebrek aan cognitieve capaciteit het beoordelen van het effect van de middelen bemoeilijkt (Coats en Wininger,

2016). Kathmann (2006) heeft met zijn onderzoek naar fysiotherapie bij honden met DM tot nu toe dan ook de beste resultaten gevonden. Naast fysiotherapie wordt er ook ingespeeld op het management om de dieren zo comfortabel mogelijk te houden (Oyake et al., 2016).

Doelstelling

Het doel van deze literatuurstudie is om dieper in te gaan op de relatie tussen DM bij de hond en ALS bij de mens. Doordat er bij beide aandoeningen een mutatie in het SOD1-gen is aangetoond, is het mogelijk dat er qua diagnose en therapie ook overeenkomsten zijn. Aangezien er bij beide aandoeningen ook gebreken zijn in de diagnose en de therapie kan het onderzoeken van beide aandoeningen interessante informatie opleveren. De mutatie die het meest belangrijk zal zijn is de E40K mutatie. Deze mutatie komt voor bij de hond en vertoont de grootste overeenkomsten met de mutaties die worden gezien bij de mens (Crisp et al., 2013). Er is echter aangetoond dat deze mutatie niet altijd aanleiding geeft tot de ziekte. Een paar dieren die homozygoot waren voor deze mutatie ontwikkelden namelijk geen klinische symptomen. Hier is dus nog meer onderzoek voor nodig (Nakamae et al., 2015).

Naast het genetisch aspect is er ook een overeenkomst te zien wat betreft inflammatoire etiologie. Bij ALS worden pro-inflammatoire mediators zoals IL-1 β , TNF- α en heat shock proteïne 70 (hsp70) teruggevonden in de pathologie. Deze mediators versterken het neurodegeneratief proces. Bij canine DM is er enkel een verhoogde concentratie van hsp70 terug te vinden in de ependymale cellen die het centraal zenuwstelsel aflijnen. De relatie tussen de mutatie en inflammatie moet dus nog verder worden onderzocht omdat de mutatie zich vooral in de motorneuronen afspeelt. Doordat er echter nog enige inflammatie kan worden aangetoond bij de hond, kan dit therapeutisch een mogelijkheid bieden (Lovett et al., 2014).

Bovendien vormt canine DM een goed model voor ALS omdat er al veel histopathologisch onderzoek is gedaan op meerdere stadia van de ziekte. Bij de mens is er enkel onderzoek mogelijk in het eindstadium omdat er pas biopten kunnen worden genomen wanneer de mensen zijn overleden (Nardone et al., 2016). Het verloop van DM bij de hond zou dus de kennis over ALS kunnen uitbreiden.

3 Literatuurstudie

3.1 Signalement

Caniene degeneratieve myelopathie (DM) is een aandoening die voorkomt bij verschillende hondenrassen. Bij de grote rassen worden de eerste symptomen waargenomen op een gemiddelde leeftijd van 9 jaar en bij de kleine hondenrassen ligt dit rond de 11 jaar. De meeste honden zullen vanaf het begin van de eerste symptomen non-ambulatorisch worden binnen een jaar. Na gemiddeld 3 jaar is respiratoire dysfunctie mogelijk of euthanasie vereist (Katz et al., 2017). Eerst kende men DM enkel toe aan Duitse Herders waardoor het ook wel "Duitse Herder myelopathie" werd genoemd (Awano et al., 2009; Kathmann et al., 2006; Nardone et al., 2014). Nu is DM ook histopathologisch bevestigd bij de Siberische Husky, Boxer, Pembroke Welsh Corgi, Miniatuur Poedel, Chesapeake Bay Retriever, Rhodesian Ridgeback en bij verschillende kruisingen. Verdere studies hebben DM ook bevestigd bij de Berner Sennenhond, Standaard Poedel, Kerry Blue Terriër, Cardigan Welsh Corgi, Golden Retriever, draadharige Foxterriër, Amerikaanse Eskimohond, Mopshond en de Irish Soft-Coaten Wheaten Terriër (Coates en Wininger, 2010). Kohyama (2017) heeft met een studie naar Collies in Japan aangetoond dat ook dit ras is gepredisposeerd voor DM. Volgens Nardone (2016) is de aandoening ook beschreven bij de Dalmatiër, Weimaraner, Samoyeed, Briard en de Pyrenese Berghond. Voor DM bestaat er geen geslachtsprevalentie. De prevalentie van de ziekte is 0,19% (Wininger et al., 2011; Shelton et al., 2012).

3.2 Pathogenese

3.2.1 Genetisch

De pathogenese van DM berust op een mutatie in de regio van chromosoom 31 waar het superoxide dismutase 1 (SOD1) gen is gelegen (Coates en Wininger, 2010). Dit enzym bestaat uit 153 aminozuren en zet superoxide anionen om tot moleculair zuurstof en waterstofperoxide. Doordat voor deze omzetting koper en zink nodig is, wordt het SOD1 ook wel een Cu,Zn-metallo-enzym genoemd. In het humaan SOD1 (hSOD1) zijn meer dan 160 mutaties gekend. Er is geen exact aantal mutaties bekend voor het canien SOD1 (cSOD1) maar doordat het voor 79,1% overeenkomt met het hSOD1 is men er wel zeker van dat er ook bij de honden meerdere mutaties mogelijk zijn (Crisp et al., 2013).

Een mutatie in het SOD1 gen zorgt ervoor dat het enzym minder stabiel is in zijn eiwitten en een onoplosbaar oligomeer gaat vormen met uiteindelijk aggregaatvorming. Dit kan zowel bij zieke als gezonde honden worden teruggevonden in het ruggenmerg, meer bepaald in de neuronen en de reactieve astrocyten (Nakamae et al., 2015). In het geval van DM zijn er echter 2 missense mutaties die zeer belangrijk zijn, namelijk de c.118G>A transitie in exon 2 en de c.52A>T transitie in exon 1. Deze mutaties leiden tot een E40K aminozuursubstitutie en een T18S aminozuursubstitutie. Deze laatste mutatie wordt enkel gezien bij de Berner Sennenhonden en opvallend is dat deze mutatie zorgt voor een tragere progressie van de ziekte (Wininger et al., 2011). De E40K mutatie komt voor bij de andere rassen en kruisingen. Honden die homozygoot zijn voor de mutatie kunnen DM ontwikkelen, maar het is ook beschreven dat heterozygote dieren DM kunnen ontwikkelen met SOD1-aggregaatvorming in de motorneuronen (Crisp et al., 2013; Nardone et al., 2016). Honden met DM hebben een spectaculaire toename van SOD1-aggregaten in het ruggenmerg welke toeneemt in verloop van de ziekte. Bij de gezonde honden zijn er minder aggregaten te vinden in het ruggenmerg dan bij honden die zich in stage 1 van DM bevinden. De graad van aggregatie is hoger in de E40K-mutatie dan in de T18S-mutatie. Bij de heterozygote dieren ligt het aantal SOD1-aggregaten echter lager dan bij de homozygote dieren (Crisp et al., 2013). Opvallend is dat de aggregaten bij de heterozygote dieren zich vooral bevinden in de grijze stof en dan met name in de astrocyten (Nakamae et al., 2015; Kobatake

et al., 2017). Dit kan een teken zijn voor het feit dat de accumulatie van de eiwitten in de astrocyten vooral in de vroege fase van de aandoening gebeurt en subklinisch kan blijven (Kobatake et al., 2017). De aggregaatvorming is in het algemeen voornamelijk terug te vinden in het thoracale ruggenmerg. Naargelang het verloop van de ziekte breiden de symptomen zich verder uit naar de voorpoten en het respiratoire stelsel. Er zijn echter nog geen aggregaten teruggevonden in de motorneuronen van het cervicale ruggenmerg. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat de aggregaten zich pas op het laatste moment vormen tegelijkertijd met de ontwikkeling van de respiratoire klachten. De meeste eigenaars kiezen echter al voor euthanasie vooraleer dit stadium van DM wordt bereikt (Katz et al., 2017).

Beide mutaties zorgen ervoor dat het hydrofobe oppervlak van het enzym meer tot uiting komt waardoor het sneller aggregaten kan vormen. Bovendien zorgen de mutaties ervoor dat het enzym een enzymatisch actief dimeer wordt. De dismutase-activiteit blijft dus behouden doordat de bindingsplaats van de metalen niet wordt aangetast. Door de aggregaatvorming krijgt het enzym echter een toxisch effect (Crisp et al., 2013). Het toxisch effect is nog niet volledig achterhaald maar de neurofilament-afhankelijke vertraging van het axonale transport speelt hier wel een zeer belangrijke rol in (Nardone et al., 2016). De mutatie zorgt dus voor neurodegeneratie doordat de onoplosbare aggregaten de intracellulaire werking van de spinale motorneuronen verstoren. Bovendien zorgt de enzymatische werking voor de vorming van toxische bijproducten (Coats en Wininger, 2010).

Honden die homozygoot zijn voor de SOD1 mutatie ontwikkelen niet altijd DM. Dit is het gevolg van het feit dat de overerving incompleet penetrerend en autosomaal recessief gebeurt. Bovendien is er bij de volwassen, recessieve vorm van humaan ALS gezien dat er een beschermend element kan overerven welke nauw gelinkt is aan het SOD1-gen. Dit element zou de toxiciteit van het gemuteerde allel verlagen waardoor beide allelen gemuteerd zouden moeten zijn voor de ontwikkeling van ALS (Awano et al., 2009; Morgan et al., 2013; Nardone et al., 2016).

3.2.2 Inflammatoir

In de pathogenese van ALS is inflammatie heel belangrijk. Lovett (2014) heeft dan ook onderzoek gedaan naar een mogelijke inflammatoire rol in de pathogenese van DM. Uit dit onderzoek is gebleken dat honden met DM een verhoogd gehalte aan heat shock protein 70 (hsp70) vertonen in de ependymale cellen die het centrale kanaal van het ruggenmerg aflijnen. De functie van hsp70 bestaat voornamelijk uit het assisteren bij de vorming van eiwitten en het voorkomen van de vorming van aggregaten. Het is dus een belangrijk eiwit voor de homeostase van een cel. Indien het echter intracellulair terechtkomt, fungeert het als een damage-associated molecular pattern (DAMP). Dit activeert een immuunrespons door interacties met toll-like receptoren (TLRs) en de vrijstelling van pro-inflammatoire cytokines zoals IL-1 β , TNF- α en INF- β . De aanwezigheid van hsp70 geeft dus aan dat er sprake is van een pro-inflammatoire toestand tijdens het verloop van de ziekte. Dit mechanisme is beschermend in het geval van een infectie in het centraal zenuwstelsel, maar bij een neurodegeneratief proces veroorzaakt het schade en dus is het mogelijk dat hier klinische symptomen uit voortkomen. Het vrijkomen van hsp70 kan te wijten zijn aan cellulaire stress. Op deze manier zou de mutatie in het SOD1-gen te linken kunnen zijn met de aanwezigheid van hsp70 aangezien deze mutatie leidt tot oxidatieve stress. Echter, de mutatie heeft vooral zijn effect op de neuronen en hsp70 wordt teruggevonden in de ependymale cellen.

Naast de toename van hsp70 is er bij honden met DM ook een toename te zien in de CD18⁺ macrofagen. Deze toename bevindt zich voornamelijk in de ependymale cellen en in de grijze stof van de dorsale en ventrale hoorn van het medio-thoracale ruggenmerg. Ook dit is een aanwijzing voor een algemeen pro-inflammatoir ontstekingsbeeld in het ruggenmerg.

3.2.3 Amyotrofische laterale sclerose

ALS is een humane aandoening die wordt gekenmerkt door een verlies van beweeglijkheid van de spieren, moeilijkheden met praten en slikken, spieratrofie, spierzwakte en uiteindelijk totale paralyse. De meeste patiënten sterven 3-5 jaar na het verschijnen van de eerste symptomen als gevolg van een verzwakking van de respiratoire spieren (Awano et al., 2009; Shelton et al., 2012; Crisp et al., 2013). Deze neurodegeneratieve aandoening kan worden veroorzaakt door mutaties in verschillende genen, waaronder het SOD1-gen. Er zijn meer dan 150 verschillende mutaties mogelijk in het SOD1-gen en deze mutaties zijn voor 20% van de genetisch overdraagbare vormen van familiale ALS de belangrijkste oorzaak (Nardone et al., 2014). Eén mutatie die wordt gezien in de SOD1-gemedieerde familiale vorm van ALS komt sterk overeen met de E40k mutatie die wordt gezien bij alle honden met DM, behalve bij de Berner Sennenhonden. Op deze manier kan DM een leidraad zijn voor het begrijpen van deze familiale vorm van ALS. Er zijn echter ook een aantal verschilpunten tussen DM en ALS. Typisch voor deze specifieke familiale vorm is bijvoorbeeld dat een mutatie in slechts 1 van de 2 SOD1 allelen al voldoende is voor de ontwikkeling van ALS. Normaal gezien gebeurt deze overerving autosomaal dominant maar een autosomaal recessieve overerving is ook al beschreven (Coats en Wininger, 2010). Dit houdt in dat de ziekte niet het resultaat is van een verlies van functie van het enzym maar eerder van het toxische effect dat voorkomt uit het gemuteerde allel (Katz et al., 2017). Bovendien heeft men nog geen aggregatie kunnen aantonen in de mutatie van het hSOD1, hetgeen wel zeer belangrijk is in de mutatie van het cSOD1 dat verantwoordelijk is voor DM (Crisp et al., 2013). Bovendien is ALS meer een motorische aandoening in tegenstelling tot DM waar ook de proprioceptieve banen en de banen van de hoger motor neuronen worden aangetast. Dit maakt dat voor ALS het verlies van neuronen het grootst is in de ventrale hoorn terwijl dit voor DM voornamelijk dorsaal wordt beschreven (Wininger et al., 2011). Nochtans is de gelijkenis groot en wordt DM gezien als een model voor ALS.

In de pathogenese van ALS speelt neuro-inflammatie een belangrijke rol. Deze inflammatie is het gevolg van de mutatie in het SOD1-gen. Zo heeft men kunnen aantonen dat het gemuteerde SOD1 caspase-1 en IL-1 β activeert in de microgliacellen. Dit kan dus zeer interessant zijn naar diagnose en therapie toe (Meissner et al., 2010). Zo is al gebleken dat de inhibitie van pro-inflammatoire cytokines leidt tot een verlengde levensduur in knaagdiermodellen van ALS (Lovett et al., 2014).

3.3 Klinische symptomen

De symptomen van DM zijn te wijten aan een progressieve degeneratie van het ruggenmerg dat begint op late leeftijd. Ze worden gekenmerkt door een progressieve, asymmetrische hoger motorneuron (HMN) paraparese, een veralgemeende proprioceptieve ataxie in de achterpoten en een gebrek aan paraspinale hyperesthesie. De klinische symptomen zijn op te delen in 2 stadia, zijnde het vroege stadium (stadium 1 en 2) en het late stadium (stadium 3 en 4). Deze stadia met bijbehorende symptomen worden samengevat weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. Een overzicht van de neurologische symptomen naargelang het stadium van DM. Naar: Katz. et al., 2017

Stadium	Neurologische symptomen
1	Asymmetrische, veralgemeende proprioceptieve ataxie en spastische parese in de achterpoten Spinale reflexen zijn intact
2	Non-ambulatoire paraparese, paraplegie Verzwakte – afwezige spinale reflexen in de achterpoten Spieratrofie in de achterpoten ± urinaire/fecale incontinentie
3	Zwakke paraplegie, parese van de voorpoten Spinale reflexen afwezig Ernstige spieratrofie in de achterpoten Urinaire/fecale incontinentie
4	Zwakke tetraplegie Afwezige spinale reflexen Ernstige, veralgemeende spieratrofie Urinaire/fecale incontinentie Dysfagie, dystonie, respiratoire moeilijkheden

3.3.1 Vroeg stadium

De symptomen in het vroege stadium zijn te wijten aan HMN-gelocaliseerde letsels welke gelegen zijn tussen de 3^e thoracaalwervel en de 3^e lumbaalwervel. Het gevolg hiervan is een veralgemeende proprioceptieve ataxie en een milde, spastische parese in de achterpoten. Op het klinisch onderzoek is dit te herkennen aan versleten nagels en mankheid in de achterpoten welke asymmetrisch kan zijn. De patellareflex is meestal normaal maar kan ook versterkt of verzwakt zijn. Een verzwakte patellareflex wordt echter vaker gezien bij oudere honden. De buigreflexen kunnen normaal zijn of zorgen voor een gekruiste extensie, hetgeen een teken kan zijn van een chronische HMN-dysfunctie (Coats en Wininger, 2010). Wanneer de dorsale wortels van de n. femoralis in het proces worden betrokken kunnen sensorische impulsen van de strekreceptoren in de m. quadriceps worden geïnhibeerd. Deze bevinding tezamen met een verzwakte patellareflex maakte dat DM eerst de term "chronische degeneratieve radiculomyelopathie" kreeg (Nardone et al., 2016). Grote hondenrassen zullen binnen 6 tot 9 maanden na het begin van de eerste symptomen non-ambulatoir paraparetisch worden. In dit stadium kiezen vele eigenaars voor euthanasie omdat de honden dan ondersteund moeten worden in het voortbewegen (Coats en Wininger, 2010). Aangezien kleine hondenrassen kunnen worden gedragen door de eigenaars, worden zij vaak in een later stadium geëuthanaseerd.

3.3.2 Laat stadium

In het late stadium zullen er naast HMN-symptomen ook lager motorneuron (LMN) symptomen volgen, waaronder paraplegie. De symptomen breiden zich ook uit naar de voorpoten en de parese wordt naargelang de vordering van de aandoening meer symmetrisch. Andere LMN symptomen die kunnen worden waargenomen zijn een verzwakte patellareflex en buigreflexen, zwakke paralyse en spieratrofie die begint in de achterpoten en zich uitbreidt naar de voorpoten. In het laatste stadium vertonen de dieren een zwakke tetraplegie en door aantasting van de craniale zenuwen kunnen moeilijkheden met slikken en braken volgen. Urinaire en fecale incontinentie wordt veelal gezien tezamen met paraplegie, dus vanaf stadium 3 (Coats en Wininger, 2010). De progressie van HMN-symptomen naar LMN-symptomen komt overeen met de progressie van de symptomen die zijn beschreven in de vorm van ALS welke ook begint met HMN-symptomen (Shelton et al., 2012; Nardone et al., 2016).

Volgens tabel 1 zijn er in stadium 4 ook respiratoire moeilijkheden mogelijk. De meeste dieren worden echter al geëuthanaseerd voordat deze symptomen zichtbaar worden dus men heeft hier niet veel onderzoek naar kunnen doen. Echter, doordat kleine hondenrassen voor de eigenaars gemakkelijker te verzorgen zijn tot in een later stadium van de ziekte, komt de gemiddelde overlevingsduur van een Pembroke Welsh Corgi (PWC) met DM eerder uit op 19 maanden in plaats van 6-9 maanden voor grote hondenrassen. Hierdoor is het mogelijk om onderzoek te doen naar latere stadia van de ziekte. Oyake (2016) heeft dan ook onderzoek gedaan naar respiratoire veranderingen in PWCs met DM. Hieruit werd geconcludeerd dat in stadium 3 en 4 meer abdominale ademhalingsbewegingen zijn waar te nemen. Dit is het gevolg van het feit dat er meer spieratrofie optreedt in de intercostale spieren waardoor de thorax minder goed kan uitzetten. Het resultaat van de spieratrofie is hypoventilatie en hypoxie wat door het diafragma wordt opgevangen door abdominale ademhalingsbewegingen in te zetten. De hypoxie werd bevestigd door middel van bloedgasanalyse waarop een lager partiële arteriële zuurstofspanning (PaO_2) en een hoger partiële arteriële koolstofdioxidespanning (paCO_2) te vinden was. Deze waarden waren voornamelijk significant verschillend in stadium 4 terwijl deze in stadium 1 en 2 normaal bleven. Dit onderzoek bevestigt een verslechtering van de werking van het respiratiestelsel in het late stadium van de ziekte.

3.4 Differentiaaldiagnose

Voor het stellen van de diagnose van DM ante-mortem is de differentiaaldiagnose heel belangrijk. Allereerst is het belangrijk om bij oude honden na te gaan of het probleem orthopedisch of neurologisch gerelateerd is. Dit verschil is gemakkelijk te maken met behulp van proprioceptieve testen. Er dient met de volgende aandoeningen rekening te worden gehouden (Coats en Wininger, 2010):

- Degeneratief lumbosacraal syndroom
- Aandoeningen van de intervertebrale discus. Chondrodystrofische rassen zoals bijvoorbeeld de PWCs zijn gepredisponeerd voor een Hansen type I aandoening van de intervertebrale discus. Grote hondenrassen zoals bijvoorbeeld de Berner Sennenhond of de Duitse herder zijn eerder gepredisponeerd voor intervertebrale protrusies.
- Neoplasie van het ruggenmerg
- Degeneratieve gewrichtsaandoeningen zoals bijvoorbeeld een voorste kruisbandruptuur of heupdysplasie

3.5 Diagnose

De definitieve diagnose van DM wordt post-mortem gesteld op basis van histopathologisch onderzoek. Ante-mortem is het vooral belangrijk om andere neurologische aandoeningen uit te sluiten. Er wordt echter veel onderzoek gedaan naar meerdere mogelijkheden om ante-mortem een correcte diagnose te kunnen stellen.

3.5.1 Ante-mortem

Ante-mortem berust het stellen van de diagnose op het signalement, de progressie van de klinische symptomen en het uitsluiten van andere neurologische oorzaken (Kathmann et al., 2006; Coats en Wininger, 2010). De uitsluiting gebeurt aan de hand van onderzoek op het cerebrospinaal vocht (CSV), elektro-diagnostische testen en het in beeld brengen van het ruggenmerg met behulp van medische beeldvorming. Computer tomografie (CT) is nuttig voor onderzoek naar een mogelijke stenose, atrofie van het ruggenmerg en focale vermindering van de subarachnoïdale ruimte. Het kan ook worden gebruikt voor het opsporen van een eventuele discus-gerelateerd probleem (Coats en Wininger, 2010). Magnetic resonance imaging (MRI) is een standaard techniek die wordt gebruikt voor het opsporen van intradurale ruggenmerglaesies, hetgeen bij dieren met DM ontbreekt. In een studie naar de sensitiviteit en de specificiteit van het gebruik van MRI werden honden met DM dan ook gebruikt als controlegroep. Hieruit bleek een zeer goede sensitiviteit en een gemiddelde specificiteit voor het onderscheiden van dieren met een intradurale ruggenmerglaesie van honden met DM. Onder sensitiviteit werd het correct detecteren van een intradurale laesie in honden verstaan die niet gediagnosticeerd waren met DM. Onder specificiteit viel de proportie honden die correct gediagnosticeerd waren als honden met DM en dus geen intradurale laesie hadden (Masciarelli et al., 2017).

Wegens het genetische aspect in de pathogenese zijn er ook genetische testen ontwikkeld. Op basis van deze genetische testen kan de hond gescreend worden als zijnde homozygoot voor de aandoening, heterozygoot of normaal homozygoot. Voor fokkers is dit zeer waardevol. Honden die homozygoot zijn voor de aandoening moeten namelijk geweerd worden van de fok omdat zij een gemuteerd allel overdragen naar hun nakomelingen. Deze nakomelingen worden op hun beurt dragers van het gemuteerde allel. Toch is enige voorzichtigheid geboden, zeker met het weren van heterozygote honden uit de fok. Het gemuteerde c.118G>A allel komt namelijk bij zeer veel rassen voor en selectie op dit allel kan ervoor zorgen dat andere aandoeningen frequenter gaan voorkomen. Bovendien kunnen bepaalde goede kwaliteiten van het ras door de selectie verdwijnen. Een fokker selecteert dus beter de homozygote honden die DM kunnen ontwikkelen uit zonder rekening te houden met de dragers (Coats en Wininger, 2010). Doordat deze genetische testen een grote impact hebben op de fokkers is de accuraatheid van de testen onderzocht. Turba (2016) heeft op deze manier kunnen bewijzen dat de dieren die homozygoot bleken uit de test eerder heterozygoot waren voor het gemuteerde allel. Dit kan te wijten zijn aan menselijke factoren, de kwaliteit van het genomen staal, verkeerd materiaal of verkeerde procedures, maar het kan ook liggen aan het DNA zelf. Zo is gebleken dat bepaalde variaties in de sequenties ervoor kunnen zorgen dat de variant van interesse wordt geflankeerd. Dit wordt ook wel het drop-out effect van het allel genoemd. Dit effect is tot nu toe enkel aangetoond bij de Hovawart, Standaard Poedel en de langharige Collie. Bovendien bleek uit de studie naar de mutatie bij Berner Sennenhonden dat de DNA-test de c.52A>T mutatie aangeeft als een mutatie in het wild-type G-allel van de c.118G>A mutatie. Dit duidt dus op een verandering in de genen die DM veroorzaken maar het kan niet worden gebruikt voor het stellen van de juiste diagnose (Wininger et al., 2011). Er is dus nood aan een test die door verschillende laboratoria wordt ontwikkeld en dit effect kan vermijden in de genotypering.

Naast het genetische aspect is er ook gekeken of de diagnose kan worden gesteld op basis van pro-inflammatoire markers. Tot nu toe is er enkel een toename van hsp70 opgemerkt in de ependymale cellen die het centrale kanaal van het ruggenmerg aflijnen. De concentraties van hsp70, IL-1 β en TNF- α waren normaal in het CSV. Hieruit kan geconcludeerd worden dat er geen abnormaliteiten te vinden zijn in het CSV bij honden met DM (Lovett et al., 2014). Echter, bij ALS patiënten wordt er naast de pro-inflammatoire markers ook onderzoek gedaan naar een gefosforyleerd neurofilament, zijnde pNF-H. Dit neurofilament is een structureiwit van de gemyeliniseerde motoraxonen en het komt vrij bij schade aan het zenuwstelsel of bij een aandoening daarvan. Bij ALS-patiënten wordt dit zowel in het bloed als in het CSV gemeten. De concentraties van dit eiwit stijgen naargelang de progressie van ALS en hebben bovendien ook een hoge diagnostische waarde. Bij de honden is gebleken dat de concentratie van pNF-H enkel is gestegen in het CSV van honden met DM in vergelijking met de controlegroep. Deze concentratie blijft min of meer gelijk naargelang het stadium van de aandoening. Op deze manier zou het CSV gebruikt kunnen worden voor het stellen van de diagnose van DM (Toedebusch et al., 2017). Verder onderzoek is echter nodig om na te gaan of de concentratie van dit eiwit niet bij meerdere aandoeningen van het zenuwstelsel is verhoogd.

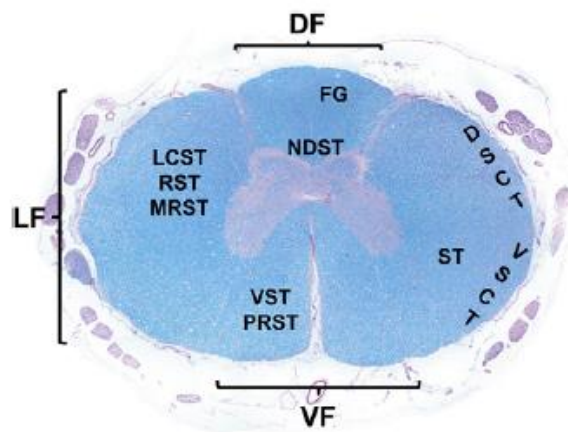
Er is niet veel beschreven over elektro-diagnostische testen in het kader van DM en bovendien is er ook niet veel over gekend naargelang het stadium van de aandoening. In het vroege stadium van DM wordt er geen spontane activiteit opgemerkt op elektromyografie (EMG) en de snelheden die worden gemeten bij de zenuwgeleiding vallen binnen de normale range. In het late stadium zijn er klinisch LMN-symptomen aanwezig en wordt op EMG spontane activiteit gemeten welke multifocaal in de distale musculatuur van het appendiculair skelet is gelegen. Er worden dan meer fibrillaties en scherpe golven gemeten. Stimulatie van de n. tibialis en n. ulnaris geeft ook een temporale spreiding en vermindering in amplitudes wanneer er wordt gekeken naar de actiepotentialen van de spieren. Bovendien zullen de snelheden van de proximale en distale motor zenuwgeleiding verminderen. De denervatie als gevolg van de axonopathie is te verklaren uit een verminderde amplitude van de gezamenlijke actiepotentiaal van de spieren. Het verminderen van de snelheden van de zenuwgeleiding is het gevolg van de demyelinisatie (Kathmann et al., 2006; Coats en Wininger, 2010; Nardone et al., 2016).

3.5.2 Post-mortem

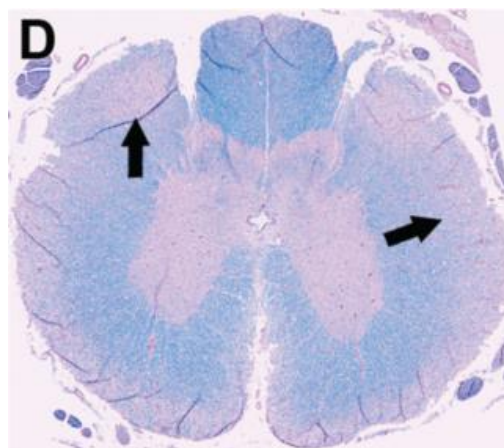
Post-mortem wordt de diagnose vooral gebaseerd op de pathologische bevindingen in het histopathologisch onderzoek. De pathologische veranderingen in het ruggenmerg worden gekarakteriseerd door axonale degeneratie met vacuolisatie en zwelling, demyelinisatie en proliferatie van astrocyten welke in proportie is met de graad van demyelinisatie (Shelton et al., 2012; Nardone et al., 2016). Het verlies van axonen is regionaal maar de distributie is vooral gelegen in het middelste tot caudale gedeelte van het thoracale ruggenmerg. Er kan sprake zijn van een compleet verlies van zowel axonen als myeline die worden vervangen door een grote hoeveelheid astrocyten. Op deze plaatsen kunnen ook macrofagen worden gevonden (Coats en Wininger, 2010). Deze macrofagen zijn de CD18⁺ macrofagen die de aandoening een pro-inflammatoir aspect geven (Lovett et al., 2014). Bij de kleine honderrassen is gebleken dat hoe verder de hond komt in het late stadium van de ziekte, hoe meer het verlies van axonen en myeline zich uitbreidt naar cervicaal en lumbaal. Bovendien zijn de laesies dan ook meer gedefinieerd in funiculare gebieden terwijl de distributie van de laesies bij bijvoorbeeld de Duitse Herder eerder discontinu is (Coats en Wininger, 2010).

De axonale degeneratie en het verlies van myeline kunnen overal in het ruggenmerg voorkomen. Opvallend voor DM is echter dat het zich voornamelijk concentreert in het dorsale deel van de laterale funiculus en in de dorsale funiculus van het middelste tot caudale thoracale ruggenmerg (Coats en Wininger, 2010; Nardone et al., 2016). In het dorsale deel van de laterale funiculus loopt de

ascenderende dorsale spinocerebellaire baan en de descenderende rubrospinale, medullaire reticulospinale en laterale corticospinale baan. De laesies in de dorsale funiculus lokaliseren zich voornamelijk mediaal in de fasciculus gracilis. Bovendien is daar tussen de 3^e thoracaalwervel en de 3^e lumbaalwervel ook een belangrijke kern gelegen voor de proprioceptie, zijnde de kern van de dorsale spinocerebellaire baan. Een overzicht van deze banen en kernen in het thoracale ruggenmerg wordt weergegeven in figuur 1. In figuur 2 wordt een overzicht gegeven van het ruggenmerg bij een hond met DM stadium 4. De degeneratie van de witte stof bij heterozygote dieren is mild en voornamelijk te vergelijken met een leeftijdsafhankelijke degeneratie. Dit suggereert dat de degeneratie vooral het gevolg is van de toxische effecten van de mutatie zonder dat dit klinisch zichtbaar is (Kobatake et al., 2017). De pathologie van de grijze stof is voorlopig nog onbekend (Nakamae et al., 2015).



Figuur 1. Transverse doorsnede van een normaal middelste thoracale ruggenmerg met een overzicht van de witte stof regio's (DF = dorsale funiculus, LF = laterale funiculus, VF = ventrale funiculus) en de verschillende ascenderende (FG = fasciculus gracilis, DSCT = dorsale spinocerebellaire baan, VSCT = ventrale spinocerebellaire baan, ST = spinothalamische baan, NDST = kern van de dorsale spinocerebellaire baan) en descenderende banen (LCST = laterale corticospinale baan, RST = rubrospinale baan, MRST = medullaire reticulospinale baan, VST = vestibulospinale baan, PRST = reticulospinale baan vanuit de pons). Uit: Coats en Winger, 2010.



Figuur 2. Transverse doorsnede van het thoracale ruggenmerg van een PWC met DM stadium 4. De pijlen in de afbeelding geven het verlies van axonen en de demyelinisatie in de perifeer gelegen witte stof weer. Uit: Morgan et al., 2013.

De fasciculus gracilis ontvangt impulsen vanuit de thoracale en lumbale regio voor de bewustwording van druk, aanraking en proprioceptie. De laesies in de laterale funiculus verklaren het verlies van algemene proprioceptie en paraparese. Wanneer de laesies in het thoracale ruggenmerg zich meer naar craniaal en cervicaal verspreiden zal dit zich klinisch uiten in tetraparese en ataxie. Fecale en urinaire incontinentie is het gevolg van de aantasting van de dorsale funiculus in de thoracolumbale en lumbosacrale regio (Coats en Wininger, 2010).

De mutatie die wordt gezien bij de Berner Sennenhonden verschilt deels van de c.118G>A mutatie doordat de laesies meer diffuus verspreid zijn en zich dus niet zozeer lokaliseren in de dorsale funiculus (Wininger et al., 2011). In de hersenen van honden met DM is er degeneratie en verlies van zenuwvezels op te merken in de rode kern, laterale vestibulaire kern en in de getande kern (Kathmann et al., 2006).

Naast het motorisch aspect blijken de sensorische vezels ook in de aandoening te worden betrokken (Nardone et al., 2016). De symptomen hiervan worden zelfs beschreven in ALS-patiënten, zijnde gevoelloosheid in de benen, een brandend gevoel in de voeten, een verminderd gevoel in de larynx en verminderd gevoel voor lichte aanrakingen en trillingen. Zowel bij de mens als bij de hond zijn er histopathologisch veranderingen te zien in de sensorische zenuwen en de dorsale wortels daarvan. Deze veranderingen gaan over een verlies van thoracale sensorische axonen en degeneratieve veranderingen in sensorische vezels van de ganglia van de dorsale wortels. Het is zelfs mogelijk dat de sensorische vezels eerst worden aangetast vooraleer de motorneuronen worden aangetast. Dit is bijvoorbeeld te verklaren met de aantasting van de intercostale spieren. De motorneuronen die deze spieren innervieren zijn voor hun werking namelijk afhankelijk van de thoracale sensorische neuron. Een primaire verandering aan deze vezels kan dus voor secundaire veranderingen zorgen in de werking van de motorneuronen. In andere neuromusculaire aandoeningen wordt ook gezien dat een stoornis in het sensorische systeem zorgt voor een motorische dysfunctie.

Typisch voor degeneratieve myelopathie is dat er geen sprake is van verlies van motorneuronen in het centraal zenuwstelsel. Er worden echter wel aggregaten gevormd in de motorneuronen. Aan de hand van een immunokleuring met antistoffen tegen het SOD1-eiwit zijn deze aggregaten te identificeren. De aggregaten worden gevormd ter hoogte van het thoracale ruggenmerg en naarmate het dier in een later stadium terechtkomt kunnen de aggregaten ook worden gevonden in het cervicale ruggenmerg (Katz et al., 2017).

De LMN symptomen in het klinisch verloop van de aandoening zijn te wijten aan de veranderingen in de perifere zenuwen en de spieren. Het verlies van zenuwvezels is het gevolg van axonale degeneratie, endoneuriale fibrose, te weinig myeline rond de axonen of secundaire demyelinisatie (Coats en Wininger, 2010). In het vroege stadium zijn er weinig pathologische veranderingen op te merken in zowel de zenuwen als de spieren. Occasioneel kunnen er atrofische vezels worden gevonden in de spieren van de achterste ledematen maar de zenuwen vertonen geen opvallend myelineverlies of axonale degeneratie. Dit in tegenstelling tot het late stadium waar de spiervezels variëren in grootte en grote groepen vezels atrofie vertonen. In de distale intramusculaire zenuwtakken wordt dan ook een verlies aan zenuwvezels en myeline waargenomen. Spieratrofie is een typisch klinisch kenmerk en progressief in het geval van ALS. Bovendien is dit ook aangetoond in SOD1 transgene muizen. Voor DM wordt verondersteld dat de spieratrofie het gevolg is van een neurogene pathologie, meer bepaald denervatie die leidt tot atrofie. Er wordt verondersteld dat de degeneratie van de motorneuronen hier aan de basis ligt. De SOD1-aggregaten interageren namelijk met de werking van de mitochondria waardoor het energiemetabolisme wordt verstoord alsook het eiwittransport en de bufferende

werking van calcium. Deze mitochondriale dysfunctie heeft als gevolg dat er defecten volgen in het axonale transport, de werking van het RNA en neurotropine (Nardone et al., 2016).

Uit onderzoek naar PWCs in alle stadia van de aandoening is echter gebleken dat de spinale zenuwwortels en de perifere zenuwen niet verloren gaan. Dit betekent dat de zenuwen niet terugtrekken naar de cellichamen van de lager motor/sensorische neuronen maar normaal contact blijven houden met de spieren (Morgan et al., 2013; Katz et al., 2017). Een afname in de motorische functie van de voorste en achterste ledematen is dus niet te wijten aan een denervatie door de lager motorneuronen. In tegenstelling tot het thoracale ruggenmerg zijn er in de lager motorneuronen van het cervicale ruggenmerg geen SOD1-aggregaten te vinden tot in het laatste stadium van de aandoening. Dit betekent dat de aggregaten pas worden gevormd op het moment dat de spieren die geïnnerveerd worden door deze lager motorneuronen van het cervicale ruggenmerg klinisch symptomen gaan geven. Bovendien is gebleken dat de spieren in het voorste lidmaat, meer bepaald de m. extensor carpi radialis, eerder histopathologische veranderingen vertonen dan de zenuwen die deze spieren innervieren. In het vroege stadium wordt er namelijk een switch gezien naar type 1 spiervezels en er is sprake van hypertrofie. Dit betekent dat veranderingen in de spier niet het gevolg zijn van de denervatie en dus niet te linken zijn aan een neurogene pathologie, hetgeen hierboven wel werd vermeld. Bovendien is er in SOD1 gemuteerde muizen als model voor ALS beschreven dat er al primaire pathologische veranderingen aanwezig zijn ter hoogte van de spieren nog voordat dit symptomatisch werd. Er is echter nog niet bekend hoe de genetische mutatie in het SOD1 gen verantwoordelijk zou kunnen zijn voor deze pathologische veranderingen. Een andere mogelijke verklaring voor de verandering in de m. extensor carpi radialis is het gebruik van de spier. Doordat er in het vroege stadium klinische symptomen ontwikkelen ter hoogte van de achterhand moet de hond zijn gewicht meer verplaatsen naar de voorhand. Dit kan samengaan met veranderingen in de opbouw van de spier. Uit deze mogelijke theorieën valt te concluderen dat de spieren een primaire target vormen en dus een mogelijk doel voor therapeutische interventie kunnen zijn (Katz et al., 2017).

3.6 Therapie

Voor wat betreft de therapie is het belangrijk om in te grijpen op het vroegste moment van pathologische veranderingen zodat de progressie van de aandoening kan worden vertraagd (Katz et al., 2017). Echter, het probleem van DM is dat er nog geen geschikte therapie voorhanden is. Hetzelfde geldt voor mensen met ALS. Er zijn al een aantal farmaca getest op efficiëntie, maar tot nu toe hebben deze nog weinig resultaat gegeven. Wegens het vermoeden eind jaren 80 dat DM een immuungemedieerde neurodegeneratieve aandoening is (Kathmann et al., 2006), zijn er studies geweest die corticosteroiden hebben gegeven aan honden met DM. Deze honden vertoonden echter geen veranderingen op lange termijn. Er is ook een studie geweest naar het effect van ϵ -aminocapronzuur in combinatie met N-acetylcysteïne en supplementen als vitamine B, C en E, maar ook in die studie zijn geen gunstige effecten opgemerkt. Deze farmacologische therapie werd gebaseerd op de resultaten uit een eerder onderzoek waarin werd aangetoond dat er in het verloop van DM sprake was van endotheliale celschade met perivasculair een afzetting van fibrine, aantrekking van ontstekingscellen, vrijstelling van prostaglandines en cytokines, activatie van weefselenzymen en de formatie van vrije zuurstofradicalen (Polizopoulou et al., 2008). Parenterale toediening van cobalamine of orale toediening van vitamine E hadden ook geen effect op de neurologische progressie. Humaan gezien is er echter wel een medicament geregistreerd dat de levenskwaliteit voor enkele maanden kan verbeteren, zijnde riluzol. Dit medicament is gebaseerd op het inhiberen van de afgifte van glutamaat zodat zenuwcelbeschadiging wordt voorkomen (Coats en Wininger, 2010). De verhoogde concentratie glutamaat is te wijten aan een accumulatie van het gemuteerde SOD1-eiwit in de astrocyten. Door deze accumulatie functioneren de astrocyten minder goed en is er minder

expressie van de glutamaat transporter 1 op de astrocyten. Dit leidt tot excitotoxische schade in de neuronen (Kobatake et al., 2017).

DM wordt momenteel dus voornamelijk behandeld door in te grijpen op het management. Zo kan de respiratoire functie worden ondersteund door te voorkomen dat de hond gaat hijgen. Dit is mogelijk door de hond in een koele ruimte te houden (Oyake et al., 2016). Bovendien worden de meeste honden geëuthanaseerd voordat ze in respiratoire moeilijkheden komen (Katz et al., 2017). In de humane geneeskunde is gebleken dat geassisteerde ventilatie en nutritionele ondersteuning relatief gezien 45% meer voordeel geeft op de overleving van ALS-patiënten (Coats en Wininger, 2010).

Naast het management wordt fysiotherapie tegenwoordig ook sterk aangeraden. Kathmann (2006) heeft namelijk aan kunnen tonen dat fysiotherapie de levensduur van honden met DM verhoogd. Honden die intensieve fysiotherapie kregen hadden een gemiddelde overlevingsduur van 255 dagen terwijl honden met gemiddelde fysiotherapie een gemiddelde overlevingsduur van 130 dagen hadden. Honden die geen fysiotherapie kregen overleefden gemiddeld maar 55 dagen vanaf het moment van diagnose. Het protocol bestond dagelijks uit actieve en passieve oefeningen, massages en hydrotherapie. Dit wordt weergegeven in tabel 2. In het geval van intensieve fysiotherapie deden de eigenaars 3-5 keer per dag actieve oefeningen met hun hond, 3x per dag passieve oefeningen en massages en ze deden ook dagelijks aan hydrotherapie. Naast het feit dat dit de gemiddelde overlevingsduur aanzienlijk verhoogt, is ook aangetoond dat deze ontwikkeling losstaat van de leeftijd of de graad van neurologische symptomen. Honden met ernstige neurologische klachten op het moment van diagnosticeren hadden gemiddeld dus een langere overlevingsduur met intensieve fysiotherapie dan honden met weinig neurologische klachten en geen fysiotherapie.

Tabel 2: Fysiotherapie protocol voor honden met DM. Naar: Kathmann et al., 2006

	Instructies	Duur en frequentie
Actieve oefeningen	<ul style="list-style-type: none"> ○ Langzaam wandelen ○ Indien nodig kan het slepen van de knokkels over de grond worden voorkomen door een band rond de poot te bevestigen en bij elke stap de poot naar voor te bewegen ○ Liefst frequent oefenen in plaats van lang te oefenen ○ De oefeningen moeten aangepast worden aan de conditie van de hond ○ Hond meerdere keren laten zitten en rechtekomen ○ Assisteren met een band als het nodig is ○ Het is belangrijk om na te gaan of de poten correct worden geplaatst ○ Gewicht verplaatsen terwijl de hond staat: laat de hond zijn gewicht eerst op links dragen en dan op rechts door zachtjes tegen de heup te duwen ○ Werk op verschillende ondergronden (gras, asfalt, zand) ○ Traplopen, heuvel op lopen 	5-10 minuten voor minstens 5x per dag

Passieve oefeningen	<ul style="list-style-type: none"> ○ Zacht en langzaam strekken en buigen van elk gewricht van beide achterpoten (distaal starten, elk gewricht apart manipuleren) ○ De fysiologische range van beweging van elk gewricht moet onderhouden worden ○ De achterpoot wordt proximaal van het gewricht gefixeerd en distaal bewogen 	3 keer per dag, 10 minuten per gewricht
Massage	<ul style="list-style-type: none"> ○ Beginnen en eindigen door het dier te aaien ○ De paravertebrale spieren en de achterpoten moeten zachtjes gemasseerd worden (knedes) van distaal naar proximaal 	3 keer per dag
Hydrotherapie	<ul style="list-style-type: none"> ○ Indien mogelijk wordt er gewerkt met een onderwaterloopband, anders moet de hond zwemmen of wandelen door het water ○ Rekening houden met het uithoudingsvermogen van de hond ○ Assisteren met een band indien nodig ○ Gewicht verplaatsen terwijl de hond in het water staat: laat de hond zijn gewicht eerst op links dragen en dan op rechts door zachtjes tegen de heup te duwen 	Minstens 1 keer per week voor 5-20 minuten
Bescherming van de poten	Bandage of een sok met schoenen	Tijdens wandeling

Ook in de humane geneeskunde is aangetoond dat fysiotherapie een gunstig effect heeft bij patiënten met degeneratieve cerebellaire en spinocerebellaire aandoeningen die resulteren in ataxie (Fonteyn et al., 2013; Synofzik en Ilg, 2014). Fysiotherapie is belangrijk in het management van dergelijke aandoeningen omdat er geen farmacologische therapie bestaat. Het resultaat van de fysiotherapie was een verbetering in de gang, sterkte van de spieren, mobiliteit en er werd ook een cardiovasculaire verbetering waargenomen. In tegenstelling tot honden met DM en fysiotherapie heeft men bij de mens statistisch gezien niet kunnen aantonen dat de hoeveelheid training een effect heeft op het resultaat (Fonteyn et al., 2013). In een studie naar degeneratieve spinocerebellaire aandoeningen is aangetoond dat fysiotherapie gecombineerd met ergotherapie ervoor zorgt dat de patiënten terug functioneel kunnen presteren voor één of meerdere jaren naargelang de progressie van de aandoening. Wanneer men coördinatieve fysiotherapie toepast is gebleken dat enkel continue therapie pas betere resultaten geeft na minstens één jaar. Indien blijven staan en wandelen zonder hulp niet meer mogelijk is, wordt er best gestart met training op een loopband zodat de capaciteit om te wandelen wordt verhoogd. Bovendien helpt dit ook voor de algemene conditie (Synofzik en Ilg, 2014). Fysiotherapie blijft dus een belangrijk onderdeel in de therapie, maar uit onderzoek is gebleken dat ervaring van de fysiotherapeut ook een grote rol speelt in de resultaten van de therapie. Doordat er nog weinig onderzoeken zijn gebeurd naar het belang van fysiotherapie bij ataxie zijn er nog weinig therapieën bekend. Bovendien is ataxie een progressieve aandoening en wanneer fysiotherapeuten hun therapie baseren op vooruitgang, kunnen de resultaten demotiverend werken. Uit onderzoek is dan ook gebleken dat het

beter is om gespecialiseerde ataxie-fysiotherapeuten te hebben die behandelingsplannen opstellen. Deze plannen kunnen dan worden uitgevoerd door de gewone fysiotherapeuten (Fonteyn et al., 2013).

Qua farmacologische therapie liggen er ook nog een aantal mogelijkheden open die eerst verder onderzocht moeten worden. Zo is er een pro-inflammatoire component aangetoond in de progressie van de aandoening, zijnde hsp70, en therapeutisch gezien is het zeer interessant om hierop in te kunnen grijpen (Lovett et al., 2014). In ALS-muizen is er ook een groot resultaat geboekt met de toediening van kleine moleculen met virale vectoren. Bovendien is aangetoond dat niet alle homozygote dieren en mensen voor de SOD1-mutatie de aandoeningen ontwikkelen. Bij de mens is aangetoond dat dit te verklaren kan zijn door de overerving van een beschermende factor. Naar therapie toe zou dit perspectieven kunnen bieden, zowel in het voorkomen als vertragen van de progressie van de aandoening (Morgan et al., 2013). Een andere mogelijkheid naar therapie toe is om in te spelen op de degradatie en het neurosecretoire systeem. Bepaalde studies hebben namelijk aangetoond dat het gemuteerde SOD1-eiwit wordt gedegradeerd door proteasen. Een inhibitie van deze proteasen zorgt voor de accumulatie van onoplosbare SOD1-eiwitten dus therapeutisch gezien kan dit een uitkomst bieden. Echter, doordat er zeer veel gemuteerde SOD1-eiwitten aanwezig zijn bij de E40k-homozygoten, treedt er een dysfunctie op in de proteasen met een verdere accumulatie tot gevolg. Het neurosecretoire systeem brengt de gemuteerde eiwitten door middel van actief transport vanuit de neuronen naar de extracellulaire ruimte. Dit is voornamelijk aangetoond in ALS-patiënten maar kan ook aanwezig zijn bij honden en verklaren waarom heterozygote dieren subklinisch blijven. Hier kan dus ook op worden ingespeeld (Kobatake et al., 2017). Verder zijn doelgerichte stamceltherapie en immunotherapie ook nog mogelijkheden die openliggen voor onderzoek bij de hond. Bij de mens liggen deze onderzoeken al wat verder. Tot nu toe is de prognose van DM over lange termijn dan ook niet zo goed (Coats en Wininger, 2010).

4 Discussie

Caniene degeneratieve myelopathie (DM) vormt een goed model voor de humane aandoening amyotrofische laterale sclerose (ALS). Dit is enerzijds het geval omdat de ras-afhankelijke mutatie in het superoxide dismutase 1-gen (SOD1) overeenkomt met de mutatie die wordt gezien bij 20% van de familiale vormen van ALS. Dit geldt voornamelijk voor de E40k-mutatie (Crisp et al., 2013). Anderzijds worden ook gelijkenissen gezien in de inflammatoire pathogenese, hetgeen ook perspectieven kan bieden naar de therapie toe. De inflammatie is vooral heel belangrijk in de pathogenese van ALS, de betrokkenheid daarvan in DM moet nog verder worden onderzocht (Coats en Wininger, 2010; Toedebusch et al., 2017). Verder worden honden in verschillende stadia van de aandoening geëuthanaseerd terwijl mensen sterven in het eindstadium. Op deze manier kan de hond het verloop van de aandoening in kaart brengen voor de humane vorm en kan er worden gezocht naar een goede manier voor het stellen van de diagnose en naar een goede therapie (Nardone et al., 2016).

Een nadeel van de studies die zijn gebeurd naar DM is de grootte van de groep. De groep dieren die werd onderzocht is veelal te klein waardoor de bevindingen vaak niet significant genoemd kunnen worden. In de discussies wordt dan ook steeds vermeld dat er nieuwe onderzoeken nodig zijn met grotere groepen van dieren om zeker te zijn dat de bevindingen juist zijn (Kathmann et al., 2006; Kohyama et al., 2017; Toedebusch et al., 2017). Er zijn ook studies die vermelden dat er meer honden nodig zijn die zich in verschillende stadia van de aandoening bevinden (Lovett et al., 2014). Dit maakt dat de meeste bevindingen tot nu toe eerder vermoedens zijn.

Honden met DM kunnen zowel heterozygoot als homozygoot zijn voor de mutatie in het SOD1-gen, maar de meeste dieren met histopathologisch bevestigde DM zijn homozygoot (Nardone et al., 2016). Heterozygote dieren kunnen bovendien ook gezond blijven. Er is echter nog geen genetische studie geweest die het verschil tussen een aangetast heterozygoot dier en een gezond heterozygoot dier heeft onderzocht. Awano (2009) heeft in een studie naar het genetische aspect van DM verondersteld dat de progressie van de pathologische veranderingen bij heterozygote dieren te traag gaat om klinisch te worden. In die studie zijn er namelijk bij 2 van de 5 heterozygote dieren beginnende veranderingen gevonden op histopathologisch onderzoek, maar deze dieren waren klinisch normaal. Naar leeftijd toe werden er ook geen klinische symptomen meer verwacht bij deze dieren. Voor de homozygote dieren geldt ook dat het mogelijk is dat de hond gezond blijft. Morgan (2013) heeft in een studie naar de pathologie in de intercostale spieren aan genotypering gedaan. Hieruit bleek dat 17,6% van de homozygote Pembroke Welsh Corgis (PWCs) gezond was en bij de Boxer was dit 16,7% van de dieren. Bij de mensen ligt dit aan een element dat wordt overgeërfd en beschermend zou werken tegen de mutatie, bij de honden is dit te verklaren door de incomplete overerving en het feit dat het autosomaal recessief wordt overgeërfd (Awano et al., 2009; Morgan et al., 2013; Toedebusch et al., 2013; Nardone et al., 2016). Naar diagnostiek toe zou het echter waardevolle informatie kunnen leveren als er bij de honden ook een beschermend element aanwezig zou zijn, dus studies hierover zouden zeker gewenst zijn. Ook naar de therapie toe kan dit mogelijkheden bieden.

Naar fokadvies toe zijn er ook nog enkele beperkingen. Een DNA-test is zeker gewenst voor DM, maar dit kan er ook toe leiden dat selectie op de SOD1-mutatie zorgt voor een serieuze achteruitgang van de populatie. Awano (2009) heeft namelijk aangetoond dat 87,3% van de onderzochte PWCs homozygoot waren voor de c.118G>A transitie. Ook voor de Boxer bleek dit percentage hoog te zijn. Doordat homozygote dieren echter klinisch gezond kunnen blijven kan selectie op homozygote dieren grote gevolgen hebben. Een ander nadeel van selectie op de mutatie is dat gewenste eigenschappen van het ras kunnen verdwijnen en andere ziektes naar de voorgrond kunnen komen (Coats en Wininger, 2010). Bovendien is er ook nog geen goede DNA-test voorhanden (Turba et al., 2016).

Lovett (2014) heeft in een studie naar de inflammatie bij honden met DM bewezen dat er wel degelijk een graad van inflammatie aanwezig is. Dit komt doordat de aanwezigheid van hsp70 kon worden aangetoond. Echter, er is geen goede link te vinden waarom nu daadwerkelijk dit eiwit aanwezig is. Hsp70 bevindt zich namelijk ter hoogte van de ependymale cellen en de aanwezigheid daarvan in functie met de aandoening zou enkel te verklaren zijn wanneer dit te vinden was bij de neuronen. Er zijn ook CD18+ macrofagen te vinden in de grijze stof en ter hoogte van de ependymale cellen, dus dit geeft ook een graad van inflammatie aan. De rol van de inflammatie zou dus nog verder onderzocht moeten worden. Dit maakt dat er in de therapie nog niet direct op kan worden ingespeeld. Bovendien is dit eiwit momenteel nog niet nuttig naar diagnostiek toe omdat de concentratie van hsp70 in het cerebrospinaal vocht (CSV) lager ligt dan de detectielimiet. Dit maakt de bevinding dus nog onbruikbaar. Toedebusch (2013) heeft echter kunnen bewijzen dat er wel degelijk iets te vinden is in het CSV bij honden met DM, namelijk de aanwezigheid van gefosforyleerd neurofilament (pNF-H). Echter, een grotere groep dieren is nodig voor een verdere studie naar het belang hiervan. Bovendien is het mogelijk dat dit eiwit bij meerdere neurologische aandoeningen in het CSV is verhoogd. Qua diagnose en therapie voor DM is er op vlak van inflammatie dus nog weinig mogelijk.

Naar de pathogenese toe is er ook nog enige onduidelijkheid. De pathologie van DM wordt namelijk beschreven aan de hand van de mutatie in het SOD1-gen met daarbij de betrokkenheid van de motorneuronen, maar histopathologisch gezien is er ook een aantasting van de sensorische neuronen aangetoond. Aangezien de motorneuronen voor hun werking afhankelijk zijn van sensorische input, zouden de veranderingen in de motorneuronen dus secundair kunnen zijn aan een probleem in de sensorische neuronen. Bovendien heeft histopathologisch onderzoek aangetoond dat de spieren ook een primaire target vormen. De rol van de SOD-1 mutatie is hierin nog niet aangetoond, maar het is wel duidelijk dat de veranderingen in de spieren niet te maken hebben met de veranderingen in de motorneuronen. Sterker nog, de veranderingen in de spieren worden zelfs gezien voordat er veranderingen in de motorneuronen aanwezig zijn. Katz (2017) vermeldt ook dat de spieren een primaire target kunnen vormen. Deze onduidelijkheden zouden dus een bron van informatie kunnen zijn voor een mogelijke therapie om de aandoening te vertragen. Tot nu toe is er namelijk vooral gefocust op de mutatie in het SOD-1 gen maar uit histopathologisch onderzoek blijkt dat er ook veranderingen in het sensorisch zenuwstelsel en in de spieren aan vooraf gaan. Deze histopathologische bevindingen zijn echter tegengesteld aan ALS omdat dit voornamelijk een aandoening is van de motorneuronen. Histopathologisch is er daar namelijk sprake van degeneratie en een verlies van de neuronale cellichamen in de ventrale hoorn (Wininger et al., 2011). Bij honden met DM is er echter geen verlies van motorneuronen in het centraal zenuwstelsel (Katz et al., 2017).

Qua onderzoek naar de therapie zijn de beste resultaten gevonden bij fysiotherapie, zowel humaan als bij de honden. Naar curatieve therapie toe is er in de humane geneeskunde een geregistreerd geneesmiddel voor mensen met ALS verkrijgbaar, genaamd riluzol. Dit medicament geeft enkele maanden een verbeterde levenskwaliteit omdat het de zenuwcelbeschadiging als gevolg van een verhoogde afgifte van glutamaat voorkomt. Deze hogere concentratie aan glutamaat is te wijten aan de mutatie in het SOD-1 eiwit (Kobatake et al., 2017). Bij honden is er echter nog geen studie geweest naar het gebruik van riluzol. Doordat het bij honden met DM ook gaat om een mutatie in het SOD-1 eiwit zou het ook daar kunnen leiden tot een verhoogde afgifte van glutamaat met zenuwcelbeschadiging tot gevolg. Dit zou riluzol dan ook bruikbaar moeten maken bij honden met DM zodat ook daar de levenskwaliteit kan worden verbeterd. Een studie hierover zou dus interessant kunnen zijn.

Er zijn dus zeker nog onderzoeken nodig om de aandoening DM zelf beter te kunnen verklaren en ook aan te kunnen pakken. De prevalentie van 0,19% maakt het er echter niet gemakkelijker op om deze onderzoeken ook effectief te kunnen doen. Naast de prevalentie is namelijk het akkoord van de eigenaars ook belangrijk. Een goede bron voor verdere onderzoeken naar DM zijn de onderzoeken die worden gedaan naar mensen met ALS. Een voorbeeld hiervan is dat er al onderzoek is geweest naar stamcel- en immunotherapie bij mensen met ALS. Bij honden is hier nog geen onderzoek naar geweest terwijl het toch een bron van informatie zou kunnen leveren voor de aandoening DM (Coats en Winger, 2010). Naast het feit dat DM als een goed model kan dienen voor ALS zou ALS dus ook een goed model kunnen vormen voor DM.

5 Referentielijst

- Awano T., Johnson G.S., Wade C.M., Katz M.L., Johnson G.C., Taylor J.F., Perloski M., Biagi T., Baranowska I., Long S., March P.A., Olby N.J., Shelton G.D., Khan S., O'Brien D.P., Lindblad-Toh K., Coates J.R., 2009. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* 106, 2794-2799.
- Coats J.R., Winingar F.A., 2010. Canine degenerative myelopathy. *Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice* 40, 929 – 950.
- Crisp M.J., Beckett J., Coates J.R., Miller T.M., 2013. Canine degenerative myelopathy: Biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Experimental neurology* 248, 1-9.
- Fonteyn E.M.R., Keus S.H.J., Verstappen C.C.P., van de Warrenburg B.P.C., 2013. Physiotherapy in Degenerative Cerebellar Ataxias: Utilisation, Patient Satisfaction, and Professional Expertise. *Cerebellum* 12, 841-847.
- Kathmann I., Cizinauskas S., Doherr M.G., Steffen F., Jaggy A., 2006. Daily Controlled Physiotherapy Increases Survival Time in Dogs with Suspected Degenerative Myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 927-932.
- Katz M.L., Jensen C.A., Student J.T., Johnson G.C., Coates J.R., 2017. Cervical spinal cord and motor unit pathology in a canine model of SOD1-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 378, 193-203.
- Kobatake Y., Sakai H., Tsukui T., Yamato O., Kohyama M., Sasaki J., Kato S., Urushitani M., Maeda S., Kamishina H., 2017. Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: implications for non-cell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy. *Journal of the Neurological Sciences* 372, 369-378.
- Kohyama M., Kitagawa M., Kamishina H., Kobatake Y., Yabuki A., Sawa M., Kakita S., Yamato O., 2017. Degenerative myelopathy in the Collie breed: a retrospective immunohistochemical analysis of superoxide dismutase 1 in an affected Rough Collie, and a molecular epidemiological survey of the SOD1:c.118G>A mutation in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79, 375-379.
- Lovett M.C., Coates J.R., Shu Y., Oglesbee M.J., Fenner W., Moore S.A., 2014. Quantitative assessment of hsp70, IL-1 β and TNF- α in the spinal cord of dogs with E40K SOD-associated degenerative myelopathy. *The Veterinary Journal* 200, 312-317.
- Masciarelli A.E., Griffin IV J.F., Fosgate G.T., Hecht S., Mankin J.M., Holmes S.P., Platt S.R., Kent M., Pancotto T.E., Chen A.V., Levine J.M., 2017. Evaluation of magnetic resonance imaging for the differentiation of inflammatory, neoplastic and vascular intradural spinal cord diseases in the dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 58, 444-453.
- Meissner F., Molawi K., Zychlinsky A., 2010. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1 β accelerates ALS pathogenesis. *PNAS* 107, 13046-13050.
- Morgan B.R., Coates J.R., Johnson G.C., Bujnak A.C. and Katz M.L., 2013. Characterization of intercostal muscle pathology in canine degenerative myelopathy: a disease model for amyotrophic lateral sclerosis. *NIH Public Access* 91, 1639-1650.

- Nakamae S., Kobatake Y., Suzuki R., Tsukui T., Kato S., Yamato O., Sakai H., Urushitani M., Maeda S. and Kamishina H., 2015. Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscienc* 303, 229-240.
- Nardone R., Höller Y., Taylor A.C., Lochner P., Tezzon F., Golaszewski S., Brigo F. and Trinka E., 2016. Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology* 119, 64 – 73.
- Oyake K., Kobatake Y., Shibata S., Sakai H., Saito M., Yamato O., Kushida K., Maeda S., Kamishina H., 2016. Changes in respiratory function in Pembroke Welsh Corgi dogs with degenerative myelopathy. *The Journal of Veterinary Medical Science* 78, 1323-1327.
- Polizopoulou Z.S., Koutinas A.F., Patsikas M.N., Soubasis N., 2008. Evaluation of a proposed therapeutic protocol in 12 dogs with tentative degenerative myelopathy. *Acta Veterinaria Hungarica* 56, 293-301.
- Shelton G.D., Johnson G.C., O'Brien D.P., Katz M.L., Pesayco J.P., Chang B.J., Mizisin A.P. and Coates J.R., 2012. Degenerative myelopathy associated with a missense mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke Welsh Corgis and Boxers. *Journal of the Neurological Sciences* 318, 55-64.
- Synofzik M., Ilg W., 2014. Motor Training in Degenerative Spinocerebellar Disease: Ataxia-Specific Improvement by Intensive Physiotherapy and Exergames. *BioMed Research International* 2014, 1-11.
- Toedebusch C.M., Bachrach M.D., Garcia V.B., Johnson G.C., Katz M.L., Shaw G., Coates J.R. and Garcia M.L., 2017. Cerebrospinal fluid levels of phosphorylated neurofilament heavy as a diagnostic marker of canine degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31, 513-520.
- Turba M.E., Loechel R., Rombolà E., Gandini G., Gentilini F., 2016. Evidence of a genomic insertion in intron 2 of SOD1 causing allelic drop-out during routine diagnostic testing for canine degenerative myelopathy. *Animal genetics* 48, 365-368.
- Wininger F.A., Zeng R., Johnson G.S., Katz M.L., Johnson G.C., Bush W.W., Jarboe J.M., Coates J.R., 2011. Degenerative Myelopathy in a Bernese Mountain Dog with a Novel SOD1 Missense Mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 1166-1170.