

Aus dem Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie  
Zentrum für Experimentelle Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

**Validierung eines Stresstestes  
an wachen Mäusen  
für die Induktion von ventrikulären Arrhythmien  
im Mauslinienvergleich**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

Ann-Christin Katharina Limbrock  
aus Münster

Hamburg, 2014

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.05.2015

Veröffentlichung mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Rainer Kozlik-Feldmann



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Physiologische Grundlagen des Herzrhythmus.....	1
1.1.1	Herzfrequenzmodulation .....	2
1.2	Ventrikuläre Rhythmusstörungen beim Menschen .....	3
1.2.1	Die Rolle des Ca <sup>2+</sup> .....	4
1.2.2	Mechanismen der Arrhythmieentstehung.....	4
1.2.3	Bedeutung der ventrikulären Arrhythmien.....	6
1.3	Mausmodelle in der kardiologischen Forschung.....	7
1.4	Die Maus in der Arrhythmieforschung.....	7
1.5	Messmethoden für die Bestimmung kardiovaskulärer Parameter bei Mäusen .....	8
1.5.1	<i>Ex vivo</i> Methoden.....	8
1.5.2	<i>In vivo</i> Methoden.....	9
1.5.3	Indirekte Methoden .....	9
1.5.4	Direkte Methoden.....	10
1.6	Induktion kardialer Arrhythmien durch Stress .....	12
1.7	Methoden für die Induktion von Arrhythmien über eine akute kardialen Stressreaktion bei der Maus.....	13
1.7.1	Programmierte elektrische Stimulation (PES) und "Burst".....	13
1.7.2	Körperlicher und mentaler Stress .....	13
1.7.3	Pharmakologische Intervention.....	15
1.8	Verschiedene Stresstestmodelle und deren Ergebnisse am Beispiel der murinen Herzfrequenz .....	17
1.9	Genetische Unterschiede zwischen Mauslinien .....	19
1.9.1	Genetischer Hintergrund von Mäusen.....	19
1.9.2	Einfluss der Mauslinie.....	20
1.10	Zusammenfassung und Hypothesen .....	22
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1	Versuchstiere .....	24
2.2	Implantation der Telemetriesender.....	24
2.3	Validierung eines physiologischen Stresstestes bei wachen Mäusen.....	26
2.3.1	Auswahl der Stresstestmethode.....	27

2.3.2	Herstellung der Isoproteronol-Lösung .....	27
2.3.3	Zeitlicher Ablauf des Stresstestes.....	28
2.4	Anwendung des validierten Stresstestes an drei murinen Linien.....	29
2.5	Auswertung der Arrhythmien.....	29
2.5.1	Ventrikuläre Arrhythmien im murinen EKG .....	30
2.6	Auswertung von Herzfrequenz und Aktivität.....	34
2.7	Graphische Darstellung und Statistik .....	34
2.8	Versuchstiereuthanasie .....	36
2.9	Pharmaka .....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Validierung eines physiologischen Stresstestes an der wachen Maus .....	37
3.1.1	Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung .....	37
3.1.2	Ergebnisse der Arrhythmieauswertung .....	40
3.2	Anwendung der validierten Stresstestmethode an 3 Mauslinien.....	43
3.2.1	Ergebnisse der 24 h Baselinemessungen.....	43
3.2.2	Ergebnisse des Stresstests mit Isoproteronol.....	47
3.2.3	Ergebnisse des Stresstestes mit NaCl.....	55
3.2.4	Vergleich von Isoproteronol und NaCl während des Stresstests .....	62
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>70</b>
4.1	Validierung eines physiologischen Stresstestes an der wachen Maus für die Induktion von ventrikulären Arrhythmien.....	70
4.1.1	Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung .....	70
4.1.2	Ergebnisse der Arrhythmieauswertung .....	75
4.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Stresstestvalidierung.....	77
4.2	Anwendung der validierten Stresstestmethode bei drei Mauslinien .....	78
4.2.1	Linienabhängige Herzfrequenz und Aktivität während der 24 h Baseline .....	78
4.2.2	Linienabhängige Antwort von Herzfrequenz und Aktivität auf eine $\beta$ - adrenerge Stimulation mit Isoproteronol.....	82
4.2.3	Linienabhängige Arrhythmogenität während des Stresstestes mit Isoproteronol .....	86
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse des Stresstestes im Linienvergleich .....	89
4.2.5	Vergleich der basalen Herzfrequenz sowie der Herzfrequenz unter $\beta$ - adrenerger Stimulation mit anderen Arbeiten .....	91
4.3	Diskussion der Methodik.....	96

4.3.1	Implantation und Verwendung von Telemetriesendern .....	96
4.3.2	Stresstest mit Isoproteronol vs. Fön .....	97
4.3.3	Verbesserungsmöglichkeiten des etablierten Stresstestmodells.....	98
4.4	Relevanz der Arbeit.....	98
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>100</b>
6.1	Abkürzungen .....	100
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	101
6.3	Tabellenverzeichnis.....	103
6.4	Publikation.....	104
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>113</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>114</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

Herzrhythmusstörungen faszinieren Ärzte und Wissenschaftler seit Jahrhunderten. Kaum ein anderer Aspekt der Medizin gab so viel Anlass zur Spekulation wie der unregelmäßige Puls. Aufzeichnungen aus dem 5. Jahrhundert vor Christi erwähnen das erste Mal die Pulsdiagnostik, die bis in das Mittelalter viele Anhänger fand. Doch nicht nur die berühmten griechischen Philosophen und Ärzte wie Aristoteles und Hippokrates nutzten den Puls als diagnostisches Mittel, auch die traditionellen Chinesischen Medizin kennt 28 verschiedene pathologische Pulsarten und verwendet diese Art der Diagnostik noch heute. Erst im letzten Jahrhundert gelang der Medizin der entscheidende Durchbruch in Diagnostik und Therapie kardialer Rhythmusstörungen (Lüderitz 1993).

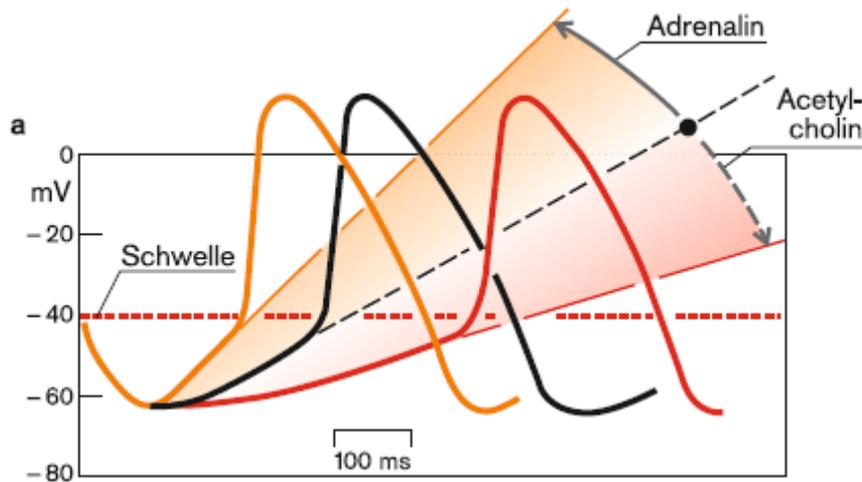
## 1.1 Physiologische Grundlagen des Herzrhythmus

Der Herzrhythmus ist eine wiederholte Abfolge elektrischer Aktivität und der daraus resultierenden mechanischen Herzaktion. Dabei generieren die im Sinusknoten gelegenen Schrittmacherzellen den Sinusrhythmus, welcher frequenzbestimmend ist. Im kardialen Erregungsleitungssystem drei Schrittmacher lokalisiert, deren Eigenfrequenz entlang ihrer Ordnungszahl abnimmt. Der primäre Schrittmacher ist der Sinusknoten. Jede Gruppe von Schrittmacherzellen hat eine eigene Frequenz und unterliegt der Steuerung durch das autonome Nervensystem. Unregelmäßigkeiten in der Frequenz bzw. in der Abfolge der Herzaktionen werden als Herzrhythmusstörungen bezeichnet. Das Aktionspotenzial der autonomen Schrittmacherzellen benötigt im Gegensatz zum Aktionspotenzial der kardialen Myozyten keinen externen Reiz. Durch das Fehlen einer stabilisierenden Kaliumleitfähigkeit in der Membran der Schrittmacherzellen, kann hier kein stabiles Ruhepotenzial aufgebaut werden. Dies ermöglicht die Generierung spontaner Depolarisationen über welche die Erregung des Myokards gesteuert wird. Jeder Erregung folgt eine Repolarisation. Wird das maximale diastolische Potenzial von -50 mV erreicht, erfolgt eine erneute Depolarisation. Über HCN-Kanäle gelangt  $\text{Na}^+$  von extra nach intrazellulär. Durch diesen Vorgang wird das Membranpotenzial der Zelle angehoben bis die Depolarisationsschwelle von ca. -40 mV erreicht ist. Ab hier öffnen sich spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und bewirken somit ein Aktionspotenzial. Am Herzen werden von den vier bekannten HCN-Kanälen HNC2 und HNC4 exprimiert. Diese beiden Kanäle sind über den Transmitter cAMP  $\beta$ -adrenerg steuerbar und unterliegen dem Einfluss des vegetativen Nervensystems. Im Unterschied zum

Arbeitsmyokard gibt es in den Schrittmacherzellen keine schnellen Natriumkanäle. Der Aufstrich des Aktionspotenzials ist somit deutlich langsamer und wird durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erzeugt. Die Frequenz des Sinusknotens wird folglich über die Anstiegssteilheit dieses Aufstriches bestimmt. Über diesen Mechanismus nimmt das autonome Nervensystem Einfluss auf die Herzfrequenz (DiFrancesco and Tortora 1991).

### **1.1.1 Herzfrequenzmodulation**

Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die Herzfrequenz dem Einfluss des vegetativen Nervensystems in Form von Sympathikus und Parasympathikus, welche über die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin Einfluss nehmen (Guimaraes and Moura 2001). Diese Hormone entfalten ihre Wirkung über Adrenorezeptoren, welche unter anderem auf den Zellen des kardiovaskulären Systems exprimiert werden. Sie wurden das erste Mal beschrieben von Raymond P. Ahlquist (Ahlquist 1948). Der Sympathikus innerviert das Herz gleichmäßig, wohingegen der Parasympathikus vorwiegend den primären und sekundären Schrittmacher versorgt. Die Herzfrequenz resultiert aus einer Balance zwischen Parasympathikus und Sympathikus, wobei das Herz in Ruhe unter dem Einfluss des Parasympathikus steht, was als Vagotonus bezeichnet wird. Ohne den dämpfenden Vagotonus würde die Herzfrequenz nicht zwischen 60 und 80 bpm, sondern bei 110 bis 120 bpm, der Eigenfrequenz des Sinusknotens, liegen. Der Sympathikus wirkt am Herz positiv chronotrope, bathmotrope, lusitrope und inotrop. Der Parasympathikus hingegen zeigt eine negativ chronotrope Wirkung. In Abbildung 1 ist die Wirkung des vegetativen Nervensystems auf das Schrittmacherpotenzial und damit auf die Herzfrequenz gezeigt.



**Abbildung 1: Einfluss von Sympathikus und Parasympathikus auf das Schrittmacherpotenzial**

modifiziert aus: Pape, Kurtz, Silbernagl, Physiologie, 7. Auflage 2014, Thieme Verlag (Pape, Kurtz et al. 2014). Die Abbildung verdeutlicht die chronotrope Wirkung des autonomen Nervensystems. Der Sympathikus wirkt über Adrenalin positiv chronotrop in dem er die diastolische Depolarisation beschleunigt und das Schwellenpotenzial früher erreicht wird. Der Parasympathikus hingegen wirkt über Acetylcholin negativ chronotrop und verlangsamt die diastolische Depolarisation.

## 1.2 Ventrikuläre Rhythmusstörungen beim Menschen

Der plötzliche Herztod auf Grund einer ventrikulären Arrhythmie ist einer der häufigsten Todesursachen der industriellen Welt. Ventrikuläre Arrhythmien haben eine hohe Inzidenz und Prävalenz (Killeen, Thomas et al. 2008). Die häufigsten Ursachen für eine Arrhythmie sind kardiale Erkrankungen wie ein stattgehabter Myokardinfarkt, Kardiomyopathien, eine hämodynamische Belastung des Herzens aber auch extrakardiale Veränderungen wie Elektrolytstörungen und Medikamente können ursächlich sein. Arrhythmien können nach ihrem Entstehungsort in supraventrikuläre und ventrikuläre Rhythmusstörungen unterteilt werden, nach Geschwindigkeit der resultierenden Frequenz in brady- oder tachykard oder es kann zwischen erworbenen und angeborenen Störungen differenziert werden. Im EKG wird graphisch die Erregungsausbreitung- und Rückbildung dargestellt und Arrhythmien zeigen sich als Veränderungen von Morphologie und Rhythmus (Herold 2011). Auf Grund der hohen Morbidität und Mortalität durch ventrikuläre Rhythmusstörungen sind diese für die Forschung und auch in der vorliegenden Arbeit von großem Interesse. Zu den ventrikulären Arrhythmien wird die ventrikuläre Extrasystolen, Bigeminus und Trigeminus, sowie die ventrikuläre Tachykardie und das Kammerflattern- bzw. flimmern gezählt.

### 1.2.1 Die Rolle des $\text{Ca}^{2+}$

$\text{Ca}^{2+}$  ist das Bindeglied zwischen dem elektrischen Vorgang des Aktionspotenzials und dem mechanischem Prozess der Myokardkontraktion, was zusammen als elektromechanische Kopplung bezeichnet wird. Das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  ist in der Lage die Membranpermeabilität zu beeinflussen und vermittelt unter anderem die Aktivität des autonomen Nervensystems (Clusin, Spray et al. 1975). Für eine Kontraktion werden dabei zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellen benötigt. Zum einen gelangt  $\text{Ca}^{2+}$  über L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren) in die Zelle, wo es die Freisetzung einer wesentlich größeren Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über die Ryanodinrezeptoren (RyR2) triggert. Dieser Effekt wird als  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bezeichnet (Fabiato 1985). Dabei kommt es zu einer räumlichen und zeitlichen Summation lokaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen, auch als " $\text{Ca}^{2+}$  sparks" bezeichnet. Die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt dabei das Ausmaß der Aktivierung des kontraktile Apparates und somit die Inotropie des Herzens. Diese Aktion wird durch die Wiederaufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR über die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) wieder beendet, was als Relaxation bezeichnet wird. Die Aktivität der SERCA wird dabei sowohl über das  $\text{Ca}^{2+}$  wie auch das Protein Phospholamban bestimmt, welches in einem unphosphorylierten Zustand die SERCA inaktiviert. Während einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation wird das Phospholamban phosphoryliert und die SERCA damit aktiviert (Tada and Katz 1982). Dieser Mechanismus wird für den positiven inotropen Effekt durch eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation verantwortlich gemacht (Shan, Kushnir et al. 2010). Über die  $\beta_1$ -Rezeptoren wird letztendlich durch eine Phosphorylierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Ausschüttung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR. Steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, so steigt ebenso die Kontraktionskraft des Myokards. Eine spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR kann zu einer in den physiologischen Rhythmus einfallenden Kontraktion führen, welche sich im EKG als ventrikuläre Extrasystole darstellt (Thandroyen, Morris et al. 1991).

### 1.2.2 Mechanismen der Arrhythmieentstehung

Herzrhythmusstörungen werden durch verschiedene elektrophysiologische Mechanismen ausgelöst. Sie können unterteilt werden in Störungen der Erregungsbildung, der Erregungsleitung sowie der Erregungsrückbildung. Ein Beispiel für eine Störung der Erregungsbildung ist die ektope oder gesteigerte Automatie. Bei der ektope Automatie wird auf Grund einer Veränderung oder des Verlustes der Schrittmacherfunktion im Sinusknoten die Frequenz des Sinusknotens ersetzt. Bei der gesteigerten Automatie übersteigen ektope

Schrittmacher die Frequenz des Sinusknotens, wie es beispielsweise bei einer Aktivitätssteigerung des Sympathikus der Fall sein kann. Bei beiden Formen wird über eine Anhebung des Membranpotenzials eine spontane diastolische Depolarisation ausgelöst (Imanishi and Surawicz 1976; Wit and Cranefield 1977). Störungen der Erregungsleitung stellen beispielsweise durch Narben blockierte Abschnitte des Leitungssystems dar. Aber auch der so genannte Reentry-Mechanismus, bei dem eine Erregung in das umgebene Gewebe wieder eintritt, wenn dieses nicht mehr refraktär ist, führt zu einer kreisenden Kammererregung und schnell in ein Kammerflimmern. Zu den Störungen der Erregungsrückbildung zählt die getriggerte Aktivität. Bei dieser Form der Erregungsstörung spielen die kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine entscheidende Rolle. Hierunter versteht man durch Extrasystolen potenzierte Nachpotenziale. Man unterscheidet dabei zwischen frühen und späten Nachdepolarisationen. Frühe Nachdepolarisationen (EAD) entstehen während pathologisch verlängerten Aktionspotenziale, in denen die spannungs-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wieder in einen aktiven Zustand gelangen. Das erneut einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer Membranstabilität, weshalb ein zusätzlich einfallendes Aktionspotenzial eine Arrhythmie induzieren kann, wie es bei der Torsade de pointes der Fall ist (Levine, Spear et al. 1985). Späte Nachdepolarisationen (DAD) entstehen durch eine Digitalisintoxikation oder durch eine katecholaminerge Aktion. Durch die resultierende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung wird eine vorzeitige diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR ausgelöst, welche wiederum eine Nachkontraktion induziert (Lederer and Tsien 1976). Erreicht diese dann die Reizschwelle so kann sie eine getriggerte Arrhythmie auslösen (Ferrier, Saunders et al. 1973). Ein weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Mechanismus ist die ventrikuläre Extrasystole. Eine einzelne, frühzeitig in den Rhythmus einfallende, ventrikuläre Extrasystole kann durch das so genannte R-auf-T-Phänomen eine kreisende Erregung des Myokards bewirken. Während der T-Welle im EKG befinden sich zunehmend mehr Ionenkanäle in einem geschlossenen, aber aktivierbaren Zustand. Dieser Zeitpunkt wird auch als vulnerable Phase bezeichnet. Eine Extrasystole kann durch eine spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR oder durch erhöhte extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen hervorgerufen werden (Thandroyen, Morris et al. 1991). Es konnte gezeigt werden, dass der second Messenger NAADP eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  spielt. NAADP führt über eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation zu einer spontanen diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in isolierten kardialen Myozyten und somit bei Mäusen zu ventrikuläre Arrhythmien (Nebel, Schworer et al. 2013). Ein weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Mechanismus ist die katecholamin-induzierte Arrhythmie bei familiärer Mutation des Ryanodin-Rezeptors, abgekürzt mit CPVT (Marks 2002).

### 1.2.3 Bedeutung der ventrikulären Arrhythmien

Die arrhythmieinduzierte Herzfrequenzerhöhung führt zu einer unregelmäßigen Ventrikelregung, wodurch eine koordinierte Pumpleistung des Herzens nicht mehr gewährleistet werden kann. Die resultierende Ischämie führt schnell zu einer Schädigung von hypoxiesensibler Organe wie Herz und Gehirn. Länger andauernde Arrhythmien enden auf Grund eines sistierenden Kreislaufes meist tödlich. Ventrikuläre Rhythmusstörungen betreffen dabei nicht nur ältere Patienten, sondern über verschiedene Mutationen von Ionenkanäle und Rezeptoren auch junge Patienten. Beispiele hierfür sind das Long-QT-Syndrom, das Brugada-Syndrom und die katecholaminerge polymorphe Kammertachykardie (CPVT). Bei der CVPT führt eine autosomal-dominante Mutation des Ryanodin-Rezeptors (RyR2) bei strukturell normalen Herzen unter körperlicher oder emotionaler Belastung zu Synkopen und einem plötzlichen Herztod (Leenhardt, Lucet et al. 1995; Priori, Napolitano et al. 2002). Genetische Mutationen lassen sich ideal in einem Tiermodell exprimieren und weiter erforschen. Ein etabliertes Modell ist dabei die Maus. Beispielsweise zeigen Mäuse mit einer RyR2-Missense-Mutation unter vermehrtem physiologischen Stress ähnliche Symptome wie der humane Phänotyp der CVPT (Lehnart, Mongillo et al. 2008).

Kardiale Rhythmusstörungen sind unter anderem mit Betablockern therapierbar. Der erste  $\beta$ -Blocker wurde von Sir James Whyte Black im Jahr 1960 entwickelt (Lüderitz 1993; Stapleton 1997). Die Therapie mit  $\beta$ -Blockern zeigte von Beginn an interindividuelle Unterschiede und führte wiederholt zu unerwünschten oder gar fehlenden Wirkungen (Gottlieb, McCarter et al. 1998; Cushman, Reda et al. 2000; Materson 2004; Zineh, Beitelshees et al. 2004). Es war zunächst unklar, ob Umweltfaktoren wie Lebensstil und Ernährung ursächlich sein könnten oder ob diese Unterschiede genetisch bedingt sind (Douglas, Bakris et al. 2003; Materson 2004). Heute ist bekannt, dass unter anderem ein Polymorphismus des CYP2D6, einem wichtigen Enzym für die Metabolisierung von Metoprolol (Kurnik, Li et al. 2008) sowie ein Polymorphismus des ADRB1, ein Gen des  $\beta_1$ -Rezeptors, für die interindividuellen Unterschiede auf die Behandlung mit Metoprolol bei Menschen verantwortlich sind (Liu, Liu et al. 2006; Bijl, Visser et al. 2009; Rau, Wuttke et al. 2009; Liu, Xing et al. 2013). Diese Erkenntnisse konnten vor allem mit Hilfe von Mausmodellen gewonnen werden.

### 1.3 Mausmodelle in der kardiologischen Forschung

Der Einsatz von Tiermodellen in der Forschung ist aus der modernen Humanmedizin nicht mehr wegzudenken. Die Pathophysiologie einer kardialen Erkrankung ist ein komplexes Netz aus miteinander Verknüpften Faktoren wie Genetik, Umwelteinflüssen und Lebensgewohnheiten. In diesem Netz einen exakten Mechanismus zu erkennen und damit eine Behandlungsmöglichkeit zu schaffen, stellt eine große Herausforderung dar. Die Geschichte der Tierexperimente reicht weit zurück bis in das antike Griechenland zu Aristoteles. Früher wurden Tierexperimente durchgeführt um die Grundlagen von Anatomie und Physiologie zu erforschen. Heutzutage liegt der Schwerpunkt von Tiermodellen auf der Erforschung molekularer bzw. genetischer Ursachen einer Erkrankung, sowie der Entwicklung und Erprobung von medikamentösen Therapien (Cohn 2010). Die Fortschritte der letzten Jahre in der genetischen Forschung eröffnen der Wissenschaft gänzlich neue Möglichkeiten. Neue technische Entwicklungen ermöglichen die Herstellung wesentlich kleinerer Instrumente und Versuchsaufbauten, die zuvor nur an größeren Tieren angewendet werden konnten. Dadurch ist die Maus als Modell für kardiale Pathologien einsetzbar und Erkrankungen können auf molekularer Ebene untersucht werden. Es ist nun möglich ein zuvor isoliertes Gen durch Züchtung und Rekombination in einer großen Anzahl an Tieren zu exprimieren. Die Manipulation muriner embryonaler Stammzellen ist zuverlässig durchführbar (Doetschman, Eistetter et al. 1985; Thomas and Capecchi 1987) und der Phänotyp steht auf Grund des wesentlich kürzeren Reproduktionszyklus schneller zur Verfügung. Es können relevante kardiale Parameter einer Maus bestimmt (Berthonneche, Peter et al. 2009), kardiovaskuläre Erkrankungen durch minimal invasive Eingriffe an der Maus nachempfunden und somit der Forschung zugänglich gemacht werden (An, Davies et al. 1996).

### 1.4 Die Maus in der Arrhythmieforschung

Die Maus ist nicht zuletzt auf Grund ihrer vielen Vorteile ein relevantes Tiermodell für die kardiale Arrhythmieforschung. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts ging man davon aus, dass Mäuse auf Grund ihrer geringen Herzgröße keine Arrhythmien entwickeln könnten (Garrey 1914). Später gelang es dann Vaidya et al. durch ein burst-pacing Stimulationsprotokoll an ein *ex vivo* Langendorff-Herz polymorphe ventrikuläre Arrhythmien bei Mäusen zu induzieren (Vaidya, Morley et al. 1999). Seit dem konnten durch Mausmodelle immer detailliertere Erkenntnisse zu genetischen Ursachen von Arrhythmien beim Menschen gewonnen werden. Es existieren mittlerweile unzählige Mausmodelle für kongenitale,

genetisch bedingte kardiale Arrhythmien, wie für das Long-QT-Syndrom (London, Jeron et al. 1998; Jeron, Mitchell et al. 2000; Fabritz, Damke et al. 2010), für die katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (Cerrone, Colombi et al. 2005; Werdich, Baudenbacher et al. 2007; Broun, Asghari et al. 2012; Faggioni, Hwang et al. 2013), für das Brugada-Syndrom (Stokoe, Balasubramaniam et al. 2007) oder für die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (Kirchhof, Fabritz et al. 2004). Andere imitieren erworbene Arrhythmiesyndrome, wie beispielsweise eine Hypokaliämie (Sabir, Fraser et al. 2007). Weiterhin wurden viele Methoden für die Erhebung kardiovaskulärer Parameter an Mäusen etabliert von denen in diesem Zusammenhang die wichtigsten vorgestellt werden.

## **1.5 Messmethoden für die Bestimmung kardiovaskulärer Parameter bei Mäusen**

Für kardiovaskuläre und pharmakologische Untersuchungen ist eine exakte Parametererhebung relevant. Die Messung empfindlicher und störanfälliger Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität kann mitunter aufwendig sein. Wird das Tier dabei fixiert oder anästhesiert, sollten die Daten mit Vorsicht interpretiert werden (Gross and Luft 2003; Cesarovic, Nicholls et al. 2010). In der Literatur wird zwischen direkten und indirekten, sowie zwischen *ex vivo* und *in vivo* Bestimmungsmethoden unterschieden. Alle Methoden bieten dabei Vor- und Nachteile, welche sowohl bei der Entscheidung für die Methode als auch bei der Bewertung der Ergebnisse bedacht werden sollten. Die Herzfrequenz, das EKG und der arterielle Blutdruck sind dabei die zugänglichsten kardiovaskulären Parameter der Maus (Doevendans, Daemen et al. 1998).

### **1.5.1 *Ex vivo* Methoden**

Zu den *ex vivo* Methoden gehören das Langendorff-Herz und die Methode des isoliert schlagenden Herzens. Das Herz wird dabei unter Anästhesie entnommen und für die Langendorff-Methode retrograd mit einer oxygenierten Lösung perfundiert. Über die Pulmonalvenen wird ein Katheter in den linken Vorhof und durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt. So lassen sich eine Vielzahl von kardiovaskulären Parametern bestimmen, wie beispielsweise Herzfrequenz und arterieller Blutdruck. Zusätzlich bietet das isolierte Herz die Möglichkeit die Reaktion des Herzens auf die Applikation von beispielsweise  $\beta$ -adrenergen Substanzen zu testen. Die Apparatur lässt sich durch eine anterograde Perfusion in die Methode des isoliert arbeitenden Herzens umwandeln. Diese ist komplizierter, da das Herz nun in der Lage ist eigenständig zu kontrahieren, bietet jedoch den

Vorteil kardiale Parameter in Echtzeit am schlagenden Herzen messen zu können (Grupp, Subramaniam et al. 1993). Weiterhin können neben ganzen Organen auch Teile eines Organs, wie beispielsweise Slices einer Ventrikelwand angefertigt werden (Brandenburger, Wenzel et al. 2012). Die Beobachtung zellulärer Vorgänge ermöglicht die Patch-Clamp Methode. Als Patch wird ein kleiner Abschnitt der Membran bezeichnet, welcher sich unter der Patch-Pipette befindet. Die Pipette dient zugleich als Messelektrode. Über die Pipette wird ein gewünschtes Membranpotenzial gehalten und so können Ionenströme über der Membran gemessen werden (Hamill, Marty et al. 1981). Die Standardisierung dieser Methoden stellt einen wesentlichen Vorteil dar. Nachteilig ist jedoch, dass diese genannten Methoden nur an einem zuvor explantierten Organ durchgeführt werden können, die Maus dies nicht überlebt und damit wichtige Einflussfaktoren wie Stoffwechsel, Blutfluss und das autonome Nervensystem entfallen. Zusätzlich besteht auf Grund der oft hämoglobinfreien Perfusionslösung sowohl wesentlich höhere arterielle Oxygenierung (Friedman, Grinberg et al. 1997) wie auch eine erhöhte koronare Perfusionsrate (Bergmann, Clark et al. 1979). Folglich sind *ex vivo* Modelle nicht für die Darstellung physiologischer Vorgänge in einem lebenden Tier geeignet. (Thireau, Zhang et al. 2008).

### **1.5.2 *In vivo* Methoden**

*In vivo* Bestimmungsmethoden werden in direkte und indirekte Methoden unterschieden. Die Messungen werden am lebenden Tier vorgenommen und bieten somit den Vorteil die Reaktion des gesamten Organismus beobachten zu können. *In vivo* Messmethoden am murinen Herz gestalteten sich auf Grund dessen geringer Größe wesentlich komplizierter und technisch aufwendiger. 1995 wurde eine Methode für Versuche am offenen Herzen entwickelt auf die dann 1997 eine Methode am geschlossenen Thorax folgte (Lorenz and Robbins 1997).

### **1.5.3 Indirekte Methoden**

#### **1.5.3.1 Epikutaner EKG**

1876 wurde von E.J. Marey das erste EKG eines Tieres mittels kapillarer Elektrometer aufgezeichnet (Lüderitz 1993). Das erste vollständige EKG einer Maus wurde 1968 von Goldbarg et al. über subkutan abgebrachte Elektroden bei anästhesierten Mäusen aufgezeichnet (Goldbarg, Hellerstein et al. 1968). 1996 zeichneten Berul et al. zusätzlich ein epikutaner EKG auf. Es zeigte sich, dass die hohe Herzfrequenz eine exakte Bestimmung der einzelnen Abschnitte des EKG deutlich erschwerte (Berul, Aronovitz et al. 1996). Später war eine Messung an wachen, jedoch fixierten Mäusen möglich (Wang, Swirp et al. 2000). Chu et

al. entwickelten kurz darauf eine Messung an nicht-fixierten Tieren. Sie zeichneten das EKG über die Füße der Tiere auf, welche auf mit EKG-Elektroden versehenen Platte standen. (Chu, Otero et al. 2001).

### **1.5.3.2 Tail-Cuff Methode**

Eine weitere Messmethode für Herzfrequenz, Blutdruck und EKG ist die "tail-cuff plethysmographie" (Van Vliet, Chafe et al. 2000; Berthonneche, Peter et al. 2009). Über eine am Schwanz der Maus angebrachte Manschette kann durch ein angeschlossenes Manometer gemessen werden. Dafür bläht sich die Manschette auf und durch das Wiedereinsetzen des arteriellen Blutflusses bei Deflation der Manschette wird der Blutdruck erfasst (Van Vliet, Chafe et al. 2000). Vorteilhaft an dieser Methode ist, dass sie nicht invasiv und kostengünstig ist. Nachteilhaft ist jedoch der größere Aufwand durch die notwendige Fixierung der Maus. Dies führt trotz einer vorherigen Gewöhnung der Tiere unweigerlich zu einem gewissen Stress. Hierdurch kann keine sichere Aussage darüber getätigt werden, ob die aufgezeichneten Parameter ein physiologisches Level von Blutdruck und Herzfrequenz der Tiere wiedergeben oder ob diese Parameter stressbedingt erhöht sind (Van Vliet, Chafe et al. 2000). Denn auch Ratten zeigen unter Fixierung einen deutlich höheren Blutdruck (Norman, Coleman et al. 1981). Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass den Tieren in der Regel Wärme zugeführt wird, um die Durchblutung in den Schwanzgefäßen zu verbessern. Die Messergebnisse können somit durch Fixierung und Wärmezufuhr erheblich verfälscht werden (Van Vliet, Chafe et al. 2000). Diese Messmethode bietet zwar die Möglichkeit mit lebenden Tieren zu arbeiten ohne sie verletzen zu müssen, ist jedoch nicht für Langzeitmessungen geeignet. Weiterhin sollte sie nur über kurze Zeiträume und an zuvor anästhesierten Tieren angewandt werden (Brooks, Horner et al. 1996). Jedoch ist zu bedenken, dass Anästhetika einen erheblichen Einfluss auf Atmung und Herzfrequenz, sowie auf den Sinusrhythmus und die atrioventrikuläre Überleitungszeit haben (Galletly, Westenberg et al. 1994). Für Langzeitmessungen an wachen und sich frei bewegenden Mäusen ist diese Methode somit nicht geeignet.

### **1.5.4 Direkte Methoden**

Bei direkten Methoden werden die gewünschten Parameter invasiv erhoben. Für die Platzierung der Messinstrumente ist dabei eine Operation des Tieres notwendig.

#### **1.5.4.1 Flüssigkeitsgefüllter Katheter**

Bei dieser Methode wird ein Katheter intravasal in z.B. die A. carotis eingebracht und extern mit einem Druckmesser und Druckverstärker verbunden. Dieses System liefert stabile und zuverlässige Werte vom systolischen und diastolischen Blutdruck, dem mittleren arteriellen Druck und der Pulsfrequenz. Es bieten die Möglichkeit Langzeitmessungen ohne eine vollständige Fixierung der Tieren vorzunehmen (Brooks, Horner et al. 1996). Dadurch können die Mäuse auch einem körperlichen Stresstest auf dem Laufband unterzogen werden (Desai, Sato et al. 1997). Die Tiere sind zwar nicht fixiert, jedoch durch den Katheter in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Dies könnte eine stressbedingte Verfälschung der Ergebnisse hervorrufen (Brooks, Horner et al. 1996; Van Vliet, Chafe et al. 2000). Weiterhin entsteht durch die Operation und den einliegenden Katheter ein hohes Infektionsrisiko. Weiterhin besteht ein erhöhtes Blutungsrisiko, da das System kontinuierlich mit heparinierter Flüssigkeit durchspült werden muss um die Entstehung von Thromben zu verhindern (Van Vliet, Chafe et al. 2000).

#### **1.5.4.2 Telemetrie**

Die Telemetrie ist eine weitere invasive Methode, welche ein kabelloses Monitoring über ein Fernmesssystem ermöglicht. In Allgemeinanästhesie wird der Maus ein Sender subkutan auf die Bauchwand oder den Rücken implantiert. Zwei Elektrodenkabel werden entsprechend der Einthoven II- Ableitung auf Schulter- und Pectoralismuskulatur der Tiere aufgenäht. Die Informationen des Senders gelangen über einen Receiver in Form einer Platte unterhalb des Käfigs zum Computer (Kramer, van Acker et al. 1993; Fabritz, Damke et al. 2010). Durch diese Methode lassen sich EKG, Herzfrequenz, Aktivität und Körpertemperatur kabellos an frei laufenden Mäusen aufzeichnen. Dies ist nur ein Vorteil der Telemetrie. Die Daten können über einen uneingeschränkten Zeitraum aufgezeichnet werden und zeigen eine wesentlich bessere EKG-Qualität im Vergleich zu einer Oberflächenableitung (Mills, Huettman et al. 2000). Diese Methode ist effizienter, zuverlässiger und für das Tier besser verträglich als die tail-cuff Methode (Brooks, Horner et al. 1996; Mills, Huettman et al. 2000; Van Vliet, Chafe et al. 2000). Es muss jedoch auch bedacht werden, dass der Eingriff sowie das Tragen des Senders einen Stressfaktor für die Tiere darstellt. Kramer et al. beschrieben bereits bei der ersten an Mäusen durchgeführten Telemetriesenderimplantation einen deutlichen Gewichtsverlust postoperativ, welcher sich nach 14 bis 20 Tagen wieder normalisierte (Kramer, van Acker et al. 1993). Aus diesem Grund begannen sie erst 14 Tage nach Implantation der Sender mit den Versuchen (Kramer, van de Weerd et al. 2004). Diese

Vorgehensweise soll einen durch postoperative Schmerzen bedingten Stress als unerwünschten Einflussfaktor Versuchsergebnisse verhindern. Der entscheidende Vorteil dieser Messmethode ist, dass die Mäuse für die Messungen keinen menschlichen Kontakt haben. Thireau et al. bezeichnen die Telemetrie sogar als einzige physiologische Messmethode (Thireau, Zhang et al. 2008). Die Implantation ist zunächst invasiv, nach Ende der Erholungsphase kann diese Methode aber am wachen und frei beweglichen Tier sowohl für Interventionen als auch für Langzeitmessungen verwendet werden. Die Messung stellt keinen zusätzlichen Stressor für das Tier dar und ist in der Lage physiologische Vorgänge in einem intakten Organismus aufzuzeichnen.

## **1.6 Induktion kardialer Arrhythmien durch Stress**

Stress hat in der Medizin viele Bedeutungen. Er kann sowohl psychisch als auch physisch, positiv wie auch negativ sein. Eine Stressreaktion stellt eine evolutionsgeformte schnelle Anpassungsmöglichkeit und Reaktion des Körpers an das Auftreten plötzlicher Gefahren dar. In der Medizin bezeichnet der Begriff dabei ursprünglich einen Belastungstest. Heutzutage werden unterschiedliche Stresstests für verschiedene Organe verwendet, beispielsweise ein renaler Stresstest (Sandeep Mahajan 2002). Im kardiovaskulären System nimmt Stress Einfluss auf die Herzfrequenz und den Blutdruck. Ein externer Reiz wie Angst, körperliche Anstrengung oder auch Medikamente bewirken eine Aktivitätssteigerung des Sympathikus, wohingegen die Aktivität des Parasympathikus gesenkt wird. Das aus der Nebennierenrinde ausgeschüttete Adrenalin und Noradrenalin sowie der direkte kardiale Einfluss des vegetativen Nervensystems bewirken unter anderem eine Frequenzsteigerung. Über die positive inotrope Wirkung des Sympathikus wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR ebenso wie die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle am SR erhöht. Beide Mechanismen resultieren in einer verstärkten Kontraktilität des Herzmuskels. Kommt es aber zu einer spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Entladung aus dem SR können Arrhythmien induziert werden. Schon früh hatte man beobachtet, dass unter körperlichem Stress vermehrt kardiale Arrhythmien entstehen (Jelinek and Lown 1974). Bislang konnte jedoch nicht geklärt werden, warum bei gesunden Menschen einige verstärkt ventrikuläre Arrhythmien entwickeln, welche potenziell letal sind. Aus diesem Grund sind Stresstestmodelle bei Mäusen eine etablierte Methode für die Induktion von Arrhythmien. Dabei werden unterschiedliche Methoden angewandt, welche auf körperlichem (Desai, Sato et al. 1997; Cerrone, Colombi et al. 2005; Fabritz, Damke et al. 2010), mentalem (Knollmann, Kirchhof et al. 2003; Fabritz, Damke et al. 2010) wie auch auf pharmakologischem Stress beruhen.

## **1.7 Methoden für die Induktion von Arrhythmien über eine akute kardialen Stressreaktion bei der Maus**

### **1.7.1 Programmierte elektrische Stimulation (PES) und "Burst"**

Die programmierte elektrische Stimulation bietet die Möglichkeit kardiale Arrhythmien zu induzieren und terminieren. Über verschiedene Stimulationsprotokolle können bei Mäusen Arrhythmien ausgelöst werden oder auch potenziell arrhythmogene, wie auch antiarrhythmische Substanzen getestet werden. Eine elektrische Stimulation des Herzens ist sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* durchführbar. Für die *ex vivo* Methode am Langendorff-Herz wird das Herz der Maus explantiert und an eine Perfusionsapparatur angeschlossen. Für die Stimulation werden Elektroden epikardial biventrikulär platziert. Diese Elektroden können sowohl stimulieren als auch aufzeichnen (Balasubramaniam, Grace et al. 2003). Eine *in vivo* Methode stellt die Einbringung eines Katheters über die V. jugularis dar. Über die Vene gelangt der Katheter in den rechten Vorhof und Ventrikel und kann dort Arrhythmien auslösen (Li and Wehrens 2010). Über einen so genannten Burst können ebenfalls Arrhythmien ausgelöst werden. Es handelt sich dabei um eine exzessive und hochfrequente Stimulation. Über einen automatischen Stimulator können diese Bursts mit einer Zykluslänge von zunächst 40 ms ausgelöst werden. Bei jedem weiteren Burst wird die Zykluslänge um 2 ms bis auf 20 ms reduziert (Verheule, Sato et al. 2004). Lujan et al. entwickelten eine Methode, durch welche anhaltende ventrikuläre Tachyarrhythmien über eine externe elektrische kardiale Stimulation am wachen und frei laufenden Tier induziert werden können. Diese Methode reduziert den Einfluss von Anästhesie und Schmerz auf das Ergebnis, da die Tiere nicht mehr operiert werden müssen (Lujan and DiCarlo 2014). Nachteilig ist jedoch, dass die Methode ausschließlich kardial wirkt und der Einfluss des autonomen Nervensystems nicht gezeigt werden kann.

### **1.7.2 Körperlicher und mentaler Stress**

#### **1.7.2.1 Laufband**

Das Laufband eignet sich sowohl für eine physiologische Herzfrequenzsteigerung (Desai, Sato et al. 1997; James, Hewett et al. 1998; Cerrone, Colombi et al. 2005), als auch für das Erreichen eines Trainingseffektes bei Mäusen (Hoit, Kiatchoosakun et al. 2002; Han 2013). Die Tiere laufen hierbei auf einem speziell gefertigten Gerät, bei dem sowohl die Geschwindigkeit als auch die Steigung variabel sind (James, Hewett et al. 1998).

### **1.7.2.2 Schwimmen**

Das Schwimmen bietet ebenso wie das Laufband die Möglichkeit einer physiologischen Herzfrequenzsteigerung. Diese Möglichkeit wird häufig für die Beobachtung von kardialen Anpassungsprozessen bei kontinuierlichem Training der Mäuse verwendet (Kaplan, Cheslow et al. 1994). Die Tiere schwimmen hierbei über einen definierten Zeitraum in einem Wassertank. Dieser Stress ist sowohl physisch wie auch psychisch, da Mäuse äußerst ungern schwimmen und dies potenziell Todesangst bei den Tieren auslöst (Kirchhof, Fabritz et al. 2006; Fabritz, Damke et al. 2010).

### **1.7.2.3 Air jet**

Das Fönen mit warmer Luft stellt einen mentalen Stress für die Mäuse dar. Dabei werden die Tiere mit einem handelsüblichen Fön über einen definierten Zeitraum direkt auf den Kopf gefönt. Als Reaktion und Zeichen des Stresses beginnen sich die Mäuse zu putzen (Johansson, Vennstrom et al. 1998; Knollmann, Kirchhof et al. 2003; Kirchhof, Fabritz et al. 2006; Kirchhof, Klimas et al. 2007; Fabritz, Damke et al. 2010).

### **1.7.2.4 Handling und Fixierung**

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein Handling der Mäuse (Kramer, van de Weerd et al. 2004; McDougall, Lawrence et al. 2005) das Anheben und Halten am Schwanz (Meijer, Spruijt et al. 2006), eine Fixierung der Tiere (Dhingra and Chhillar 2012) oder eine Einschränkung ihrer Bewegungsfreiheit (McDougall, Paull et al. 2000; Schmechel, Grimm et al. 2009) eine akute Stressreaktion hervorruft. Diese führt zu einer Aktivierung des autonomen Nervensystems und somit zu einem Anstieg der Herzfrequenz (Kramer, van Acker et al. 1993).

### **1.7.2.5 Vor- und Nachteile**

Der Vorteil der auf körperlicher Belastung beruhenden Stressmethoden liegt darin, dass sie am lebenden Tier und nicht invasiv durchgeführt werden können sowie eine physiologische Herzfrequenzerhöhung induzieren. Auch eignen sie sich für die Induktion eines Trainingseffektes, wie einer kardialen Hypertrophie. Der Vorteil des Laufbands gegenüber dem Schwimmen besteht in der Möglichkeit die Belastungsintensität über Geschwindigkeit und Steigung des Laufbands zu variieren und somit für jedes Tier identisch einstellen zu können (James, Hewett et al. 1998). Nachteilig an beiden Methoden ist unter anderem, dass die Tiere zuvor trainiert werden müssen um sie an das Laufband zu gewöhnen und um sicher stellen zu können, dass sie einer längeren Belastung gewachsen sind bzw. während des

Versuches nicht ertrinken (Kirchhof, Fabritz et al. 2006; Fabritz, Damke et al. 2010). Weiterhin induziert der körperliche Stresstest nur eine kurzzeitige Frequenzerhöhung, welche nach Belastungsende schnell wieder absinkt (Desai, Sato et al. 1997). Auch die Induktion eines Trainingseffektes wirkt sich, sollte dies unerwünscht sein, negativ aus. So müssten bei Protokollen, die eine wiederholte Stressung über einen längeren Zeitraum vorsehen, die Tiere immer länger belastet werden. Es wäre ebenso denkbar, dass sie nach einer gewissen Zeit nicht mehr die gleichen Spitzenwerte erreichen wie zu Beginn. Dies erschwert den Vergleich der Daten. Weiterhin muss bei der Verwendung eines Laufbands bedacht werden, dass Mäuse freiwillig bereits bis zu 6 km pro Tag zurücklegen (de Waard, van der Velden et al. 2007). Zuletzt könnte die ständige Bewegung der Tiere Artefakte im EKG verursachen und so die Auswertung potenzieller Arrhythmien erschweren. Die Vorteile des Fönens oder Handlings der Maus liegen nicht nur in einer standardisierten und reproduzierbaren Durchführung, sondern auch in der Induktion eines mentalen Stresses. Dadurch kann ein physischer Trainingseffekt vermieden werden. Die Intensität des Stresses kann über die Dauer des Fönens, bzw. die Länge der Fixierung reguliert werden. Nachteilig am Handling ist, dass die Tiere nach einer gewissen Zeit eine psychische Adaptation an diese Stressform zeigen und damit die Methode auf wenige Wochen limitiert wäre (Kramer, van de Weerd et al. 2004). Dies konnte beim Fönen bislang noch nicht gezeigt werden. Aus den oben genannten Methoden erweist sich somit das Fönen als die am besten geeignete Methode für eine Aktivitätssteigerung des Sympathikus während einer Langzeitmessung.

### **1.7.3 Pharmakologische Intervention**

#### **1.7.3.1 Dobutamin**

Dobutamin ist ein  $\beta$ -adrenerger Agonist mit einer höheren Affinität zu kardialen  $\beta_1$ -Rezeptoren. Durch eine systemische Applikation erhöht Dobutamin die kardiale Inotropie und bei höherer Dosierung die Chronotropie. Hierdurch ist es möglich einen pathologischen Rhythmus zu demaskieren und Arrhythmien auszulösen. Für eine wesentliche Steigerung der Herzfrequenz ist bei Mäusen eine hohe Dosis (1,5 – 20 mg/kg i.p.) Dobutamin nötig (Calligaris, Ricca et al. 2013). Dobutamin wird bei Mäusen bzw. Ratten vor allem für eine Stressechokardiographie verwendet (Plante, Lachance et al. 2005; Huntgeburth, Tiemann et al. 2011).

### 1.7.3.2 Rolipram

Rolipram ist ein Phosphodiesterase-4-Hemmer und reduziert den Abbau von intrazellulärem cAMP. Im Myokard resultiert eine Erhöhung der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Diese wirkt sich positiv ino- und chronotrop auf das Herz aus. Als Nebenwirkung können Arrhythmien entstehen. So zeigten sich bei Knock-out Mäusen mit einer Inaktivität der Phosphodiesterase 4 wesentlich mehr kardiale Arrhythmien im Vergleich zum Wildtypen (Lehnart, Wehrens et al. 2005). Die Applikation von Rolipram eignet sich bei einem kardialen Stresstest an Wildtyp Mäusen für die Induktion von Arrhythmien (Galindo-Tovar and Kaumann 2008).

### 1.7.3.3 Isoproteronol

Isoproteronol, ein synthetisches Noradrenalin-Derivat, ist ein nicht-selektiver  $\beta$ -adrenerger Agonist dessen molekulare Struktur und Wirkung dem Adrenalin ähnlich sind. Isoproteronol führt durch Agonismus am  $\beta_2$ -Rezeptor zu einer ausgeprägten Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes und damit zu einem Abfall des diastolischen Blutdruckes. Weiterhin nehmen durch den Agonismus am  $\beta_1$ -Rezeptor die Herzfrequenz und die Kontraktilität stark zu. Die Herzfrequenzsteigerung ist unter Isoproteronol größer als unter Adrenalin (Karow 2011). In der Humanmedizin wird Isoproteronol für die Behandlung von Bradykardien und Bronchospasmen, sowie als Reservemittel der Notfallmedizin verwendet (Gillies, Bellomo et al. 2005; Prenner 2008). Als Nebenwirkung kann es zu tachykarden Rhythmusstörungen sowie Extrasystolen kommen (Karow 2011). In Mausmodellen wird Isoproteronol genutzt, um über eine Herzfrequenzsteigerung kardiale Arrhythmien auszulösen (Berul, McConnell et al. 2001; Kirchhof, Klimas et al. 2007; Fabritz, Damke et al. 2010). Die frequenzsteigernde Wirkung von Isoproteronol ist dabei dosisabhängig (Desai, Sato et al. 1997). Neben einer intraperitonealen Injektion von Isoproteronol (Fabritz, Damke et al. 2010) gibt es die Möglichkeit einer intravenösen Injektion (Berul, McConnell et al. 2001). Auch ist die Applikation über eine implantierbare Minipumpe, welche regelmäßig eine definierte Menge über einen längeren Zeitraum abgibt, möglich (Yuan, Fan et al. 2007; Berthonneche, Peter et al. 2009). Eine Langzeitgabe von Isoproteronol induziert eine linksventrikuläre Hypertrophie (Faulx, Ernsberger et al. 2005; Osadchii 2007).

### 1.7.3.4 Vor- und Nachteile

Die Verwendung von kardial wirksamen Pharmaka bietet einige Vorteile. Die genannten Studien konnten zeigen, dass diese Methoden effektiv tachykarde Arrhythmien bei Mäusen induzieren. Es kann eine definierte Menge injiziert werden und bietet den Vorteil einer sehr

guten Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Erhält jedes Tier eine gewichtsadaptierte Dosis, reduziert dies Einflussgrößen wie die individuelle körperliche Fitness, Größe und Gewicht des Tieres. Es ist möglich, die verabreichte Menge so zu wählen, dass eine bestimmte Frequenzsteigerung erreicht wird (Berul, McConnell et al. 2001). Weiterhin müssen die Tiere für diese Methode nicht trainiert werden. Isoproterenol ist dem körpereigenen Adrenalin chemisch sehr viel ähnlicher als Dobutamin und bewirkt damit eine physiologischere Frequenzantwort. Rolipram hingegen ist eine synthetische Substanz und erzeugt im Körper zwar eine arrhythmogene Wirkung, stellt jedoch keinen physiologischen sondern rein pharmakologischen Stresstest dar. Für alle Pharmaka gilt, dass ihr Effekt durch physiologische Reaktionen bewirkt wird, jedoch die Vorgehensweise im Vergleich zu den körperlichen und mentalen Stresstests unphysiologisch ist. Jedoch bieten sie den großen Vorteil, dass sie, in ausreichender Dosis appliziert, sicher zu einer Herzfrequenzsteigerung führen. Die gezeigten Methoden stellen alle einen mehr oder weniger physiologischen Stress für die Tiere dar und bieten den großen Vorteil, dass sie nicht invasiv sind sowie, abgesehen vom Handling/ Fixieren, an sich frei bewegenden Tieren durchgeführt werden können. Die Arbeit von Fabritz et al. zeigt zum einen, dass körperlicher Stress zu einem größeren Frequenzanstieg führt, als dies beim Fönen der Fall ist. Zum anderen erwies sich die pharmakologische Intervention mit Isoproterenol als wirksamste Methode im Vergleich zum Fönen und Schwimmen. Fabritz et al. verglichen bei Mäusen die Reaktion der Herzfrequenz auf Schwimmen, Fönen und Isoproterenol 2 mg/kg i.p. Hierbei zeigte sich, dass die Herzfrequenz während des Schwimmens auf  $705 \pm 35$  bpm anstieg, während des Fönens auf  $678 \pm 35$  bpm und unter Isoproterenol auf  $725 \pm 41$  bpm (Fabritz, Damke et al. 2010). Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, ob eine Kombination von Isoproterenol und einem Fönen der Tiere einen additiven Effekt in Form einer zusätzlichen Herzfrequenzsteigerung durch das Fönen induziert.

## **1.8 Verschiedene Stresstestmodelle und deren Ergebnisse am Beispiel der murinen Herzfrequenz**

Die vorangegangenen Kapitel zeigen, wie vielfältig die Möglichkeiten kardiovaskulärer Bestimmungsmethoden und eine Arrhythmieinduktion durch Stresstests bei Mäusen sind. Jede Methode bietet Vor- und Nachteile, die abhängig von der Fragestellung der Arbeit, für die Auswahl und Interpretation der Ergebnisse bedacht werden müssen. Ein Ergebnisvergleich ist auf Grund der unterschiedlichen Methoden nicht ohne Weiteres möglich. Betrachtet man die Ruhefrequenz von Mäusen, so zeigen sich teilweise sehr große

Differenzen zwischen den Methoden. Die physiologische Regulation der Herzfrequenz wird durch Sympathikus und Parasympathikus am Sinusknoten kontrolliert. Die Herzfrequenz bzw. die Herzfrequenzvariabilität wird in vielen Arbeiten als Indikator für die Aktivität des autonomen Nervensystems verwendet und beschreibt die gegenwärtige Aktivität der Gegenspieler Sympathikus und Parasympathikus. Die Herzfrequenz wird bei einer Aktivitätssteigerung des Sympathikus beschleunigt. Diese Kenntnisse dienen als Grundlage für die Annahme der Herzfrequenzsteigerung als indirektes Maß einer Zunahme der Sympathikusaktivität, sowie für die Annahme der basalen Herzfrequenz als indirektes Maß des Grundsympathikotonus (Shusterman, Usiene et al. 2002; Howden, Liu et al. 2008; Berthonneche, Peter et al. 2009; Nunn, Feetham et al. 2013; Cheng, Kuo et al. 2014).

Baseline HR (bpm)	Methodik	Dauer/ Tageszeit der Messung	Referenz
441	Telemetrie unter Anästhesie	Messung zwischen 14 und 17 Uhr	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
724	Telemetrie	Messung zwischen 9 und 15 für 30-60 min	(Gehrmann, Hammer et al. 2000)
620	Telemetrie	Messung für 5 min alle 3 h über 24 h	(Shah, Siedlecka et al. 2010)
609 ± 22	Telemetrie	24 h Baseline	(Shusterman, Usiene et al. 2002)
582 ± 29	Telemetrie	2 min alle 1 h	(Xiao, Fuchs et al. 2004)
~ 580	Telemetrie	Zwischen 9 und 11 Uhr für 20 min	(Howden, Liu et al. 2008)
637	Tail-Cuff an wachen Mäusen	Zwischen 14 und 17 Uhr	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
317	Anästhesie	./.	(Berul, Aronovitz et al. 1996)
433 ± 55	Echokardiographie unter Anästhesie	./.	(Hoit, Kiatchoosakun et al. 2002)
501 ± 14	Intravasaler Katheter	30 min	(Desai, Sato et al. 1997)

**Tabelle 1: Murine basale Herzfrequenz im Stressmodellvergleich unterschiedlicher Arbeiten**

In Tabelle 1 sind diese Unterschiede für die basale Herzfrequenz von C57BL/6J Mäusen nicht nur zwischen den einzelnen Methoden, wie beispielsweise der Telemetrie und dem Tail-cuff, sondern auch innerhalb einer Methode in Abhängigkeit von dem Protokoll sehr unterschiedlich. Weiterhin sind nicht in allen aufgeführten Arbeiten genaue Angaben für die Datenaquirierung zu finden. Dabei handelt es sich bei allen Tieren um Mäuse derselben Linie,

eine bis auf geringe Abweichungen ähnliche basale Herzfrequenz wäre somit zu erwarten. Hieraus ergibt sich die Frage warum es zu den gezeigten Unterschieden kommt und ob möglicherweise die Methode hierfür verantwortlich ist. In der murinen Forschung gibt es, wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, einige standardisierte Methoden für die Erhebung kardiovaskulärer Parameter, jedoch verdeutlicht die gezeigte Tabelle, dass selbst bei der einheitlichen Verwendung eines Telemetriesenders bei allen Versuchen die Ergebnisse auf Grund verschiedener Ursachen, wie beispielsweise dem Versuchsprotokoll, deutlich differieren. Eine einheitliche Methodik sowie vergleichbare Protokolle für einen bestimmten Parameter wären eine denkbare Lösung dieses Problems. Im klinischen Alltag hat sich zum Beispiel der INR-Wert etabliert, eine Standardisierung des Quick-Wertes, wodurch ein Vergleich der Messwerte zwischen verschiedenen Laboren möglich ist (Luxembourg B. 2007).

## **1.9 Genetische Unterschiede zwischen Mauslinien**

### **1.9.1 Genetischer Hintergrund von Mäusen**

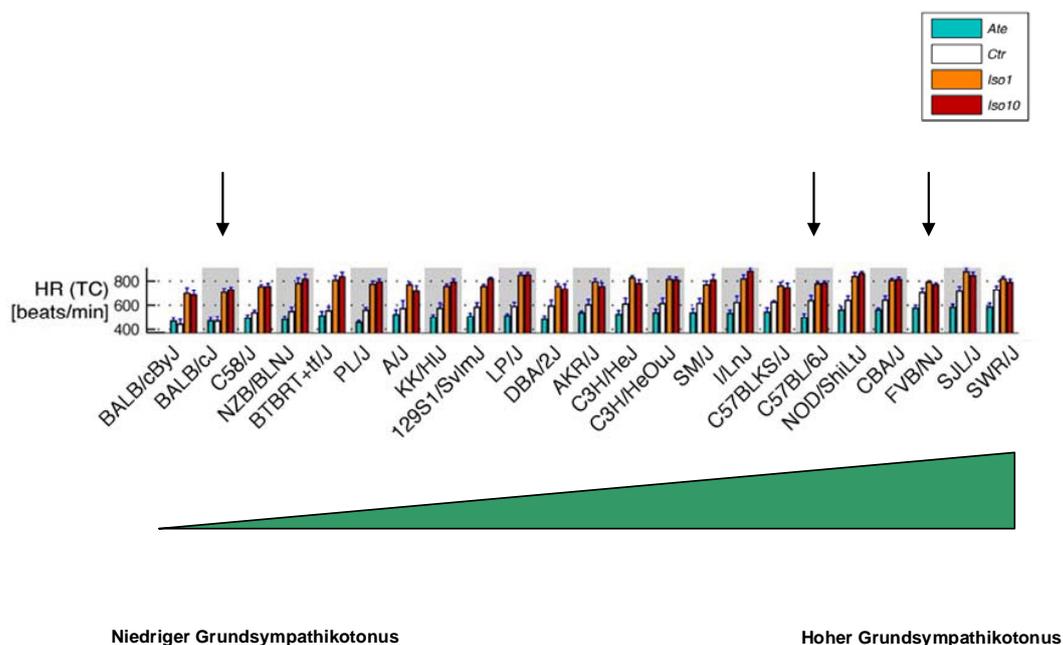
Die Maus als Tiermodell bietet der Forschung viele Möglichkeiten einer genetischen Manipulation. Durch Inzucht, der Verpaarung eines Tieres mit einem Geschwister- oder Elternteil über mehr als 20 Generationen, wurden genannten Grundlinien herangezüchtet. Dazu zählen auch die in dieser Arbeit verwendeten Linien C57BL/J6, FVB/NJ und BALB/cJ (Mouse Phenome Data Base 2003; Grubb, Bult et al. 2014). Diese Mauslinien sind genetisch nicht modifiziert und bilden die Grundlagen für genetische Manipulationen. In diversen Datenbibliotheken können genaue Details über die jeweilige Linie in Erfahrung gebracht werden. Um die Funktion eines einzelnen Gens zu erforschen, können genetisch veränderte Mäuse über einen knock-in oder knock-out erzeugt werden. Dabei wird die Inaktivierung eines Gens als knock-out bezeichnet. Analog bedeutet knock-in das Hinzufügen eines Genes in das Genom. Die aus diesem Erbgang hervorgehenden Tiere sind entweder homozygote oder heterozygote Träger des Allels bzw. homozygote Wildtypen. Als Wildtyp wird dabei ein genetisch nicht-manipuliertes Tier bezeichnet. Diesem kommt als Kontrolle für das genetisch veränderte eine wichtige Rolle zu. Idealerweise sollte das Kontrolltier genetisch identisch mit dem genetisch veränderten Tier sein, da so der Einfluss anderer Gene auf den Phänotypen vermieden wird. Ein Vergleich eines genetisch manipulierten Tieres mit einem Tier aus einer anderen Linie beispielsweise könnte zu völlig anderen Ergebnissen führen. Diese wären durch einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Tieren nicht mit absoluter Sicherheit auf

das Vorkommen oder Fehlen eines bestimmten Genes zurückzuführen. Somit wird als Kontrolle häufig der Wildtyp einer Generation, also ein homozygotes genetisch nicht-manipuliertes Geschwistertier verwendet (Eickhoff 2000).

### 1.9.2 Einfluss der Mauslinie

Eine große genetische Vielfalt stellt die Forschung vor einige Probleme. Es zeigte sich, dass es linienspezifische Einflüsse auf das Ergebnis einer Versuchsreihe an verschiedenen Organsystemen gibt. So zeigten sich bei einigen Studien mit Inzucht-Linien, in denen auch die Linien FVB/NJ, BALB/cJ und C57BL/6J verwendet wurden, dass die BALB/cJ Mäuse deutlich ängstlicher waren (O'Leary, Gunn et al. 2013). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Wahlsten et al. Sie beschrieben, dass BALB/cJ Mäuse deutlich weniger wild und waren einfacher im Handling waren als FVB/NJ und C57BL/6J (Wahlsten, Metten et al. 2003). Auch in Bezug auf die Aktivität zeigten sich Unterschiede: So legten C57BL/6J im Laufrad bis zu 7 km am Tag zurück, wohingegen FVB/NJ und BALB/cJ mit 5 km deutlich weniger aktiv waren (Lightfoot, Leamy et al. 2010). In groß angelegten Studien konnten Unterschiede zwischen einzelnen Linien in Bezug auf ihre kardiovaskulären Parameter gezeigt werden (Schlager 1966; Blizard and Welty 1971; Desai, Sato et al. 1997; London, Jeron et al. 1998; Gehrman, Hammer et al. 2000; Berul, McConnell et al. 2001; Hoit, Kiatchosakun et al. 2002; Shusterman, Usiene et al. 2002; Xiao, Fuchs et al. 2004; Stull, Hiranandani et al. 2006; Howden, Liu et al. 2008; Berthonneche, Peter et al. 2009; Reichelt, Willems et al. 2009; Shah, Siedlecka et al. 2010). Die Kenntnis von diesen Unterschieden könnte entscheidend sein, denn es wäre denkbar, dass eine bestimmte Linie wesentlich besser für eine Fragestellung oder Methodik geeignet ist. Berthonneche et al. verglichen bei 23 murine Linien 27 kardiovaskuläre Parameter. Sie konnten zeigen, dass es einige bedeutende Differenzen bei kardiovaskulären Parametern zwischen den Linien gibt. Dabei zeigte sich für die basale Herzfrequenz eine interindividuelle Diskrepanz, welche auf einen unterschiedlichen basalen Sympathikotonus der Linien hinweisen könnte. Es wäre denkbar, dass es einen liniengebundenen Grundsypathikotonus gibt, der nicht nur die basale Herzfrequenz determiniert, sondern auch die kardiovaskuläre Reaktion der Mäuse auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation bedingt. Wie bereits erwähnt, bestimmt die Balance zwischen Sympathikus und Parasympathikus die resultierende Frequenz. Daraus ließe sich folgern, dass eine Linie mit einem geringen Sympathikotonus unter einem erhöhten parasymphathischen Einfluss steht. Reduziert sich dieser dämpfende Einfluss durch eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation, so resultiert möglicherweise eine wesentlich höhere Herzfrequenz, als dies bei einem Tier der Fall wäre,

dessen Grundtonus deutlich höher liegt. Weiterhin wurde bislang noch kein Zusammenhang zwischen einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation und einer möglicherweise ebenfalls liniengebundener ventrikulärer Arrhythmogenität von Mäusen hergestellt. Auch wurde noch nicht gezeigt, ob Arrhythmien eine positive oder negative Korrelation mit dem Grundsympathikotonus zeigt. Vorstellbar wäre, dass eine Linie mit einem geringen Sympathikotonus eine größere Arrhythmogenität zeigt, da sie möglicherweise nicht ausreichend auf eine maximal gesteigerte Herzfrequenz reagieren kann. Umgekehrt wäre möglich, dass eine Linie mit einem höheren Sympathikotonus weniger Arrhythmien entwickelt, da sie besser an die höheren Frequenzen adaptiert ist. Eine mögliche zelluläre Ursache könnte sein, dass die Tiere mit einem höheren Grundsympathikotonus wesentlich geringere stressinduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks aus dem SR zeigen, als Tiere, welche wesentlich intensiver auf einen externen Stress reagieren und damit potenziell häufiger oder auch früher  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks entwickeln, welche dann durch einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuss Arrhythmien induzieren.



**Abbildung 2: Auswahl der Linien anhand des basalen Sympathikotonus**

Modifiziert aus: Berthonneche, C., B. Peter, et al. (2009). "Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains." *PLoS One* 4(8): e6610

Die in Abbildung 2 mit Pfeilen gekennzeichneten Linien sind die in der vorliegenden Arbeit ausgewählten Linien. Die Auswahl fand anhand zweier Kriterien statt. Zum einen zeigen die Linien eine große Differenz der basalen Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen und zum

anderen zeigen sie eine große Differenz in Bezug auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, existieren viele Methoden und Modelle für die Induktion von Arrhythmien bei Mäusen. Bisher hat noch keine Arbeit zeigen können, ob auch ein liniengebundener Unterschied in Bezug die Arrhythmogenität bei Mäusen existiert.

## 1.10 Zusammenfassung und Hypothesen

Ventrikuläre Rhythmusstörungen sind auf Grund ihres potenziell letalen Verlaufs von großem Interesse in der klinischen Forschung. Neben genetisch bedingten Erkrankungen spielt auch die Aktivität bzw. die Balance des autonomen Nervensystems eine entscheidende Rolle bei der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien. Es existieren verschiedenste Mechanismen der Arrhythmieentstehung und auf zellulärer Ebene ist das  $\text{Ca}^{2+}$  als Bindeglied der elektromechanischen Kopplung ein entscheidender Faktor. Die Maus ist auf Grund ihrer zuverlässigen genetischen Manipulation und Rekombination, wie auch des kurzen Reproduktionszyklus das am häufigsten verwendete Tiermodell in der kardialen Forschung. Arrhythmien werden oft durch Stress hervorgerufen. Diese Situation versuchen Stresstestmodelle bei Mäusen zu imitieren. Dabei kann Stress sowohl physisch, psychisch wie auch medikamentös ausgelöst werden. In den meisten Arbeiten werden kardiale Stresstests an genetisch manipulierten Mäusen angewendet, welchen den Phänotypen einer kardialen Erkrankung ausbilden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch kein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivitätssteigerung des Sympathikus und der Entwicklung ventrikulärer Arrhythmien hergestellt. Für die Darstellung der Wirkung des Sympathikus auf kardiale Arrhythmien ist ein annähernd physiologischer Stresstest wünschenswert. Dem Forscher stehen große Datenmengen muriner kardiovaskulärer Parameter aus vielen Arbeiten zur Verfügung, jedoch wird ein Vergleich der Daten auf Grund unterschiedlicher Methoden merklich erschwert. Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine einheitliche Methodik für die Durchführung eines physiologischen Stresstestes an der wachen Maus.

Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Validierung eines physiologischen Stresstests an der wachen Maus. Es wurde die Hypothese getestet, dass die Verwendung einer  $\beta$ -adrenerg wirksamen Substanz (Isoproterenol) im Gegensatz zu einem natürlichen bzw. äußerlichen Stressor (z.B. Föhnen oder einem Handling der Tiere) über eine Aktivitätssteigerung des Sympathikus zu signifikant mehr ventrikulären Arrhythmien führt. Dabei wurde die basale Herzfrequenz als indirektes Maß für den Grundsympathikotonus und die Herzfrequenzsteigerung als indirektes Maß für die Aktivitätssteigerung des Sympathikus verwendet.

Es wurden folgende Fragen für den ersten Teil formuliert:

1. Führt die Applikation von Isoproteronol im Gegensatz zur Injektion von NaCl zu einer signifikanten Steigerung der Sympathikusaktivität in Form einer Herzfrequenzsteigerung?
2. Führt die Applikation von Isoproteronol im Gegensatz zur Injektion von NaCl zu signifikant mehr ventrikulären Arrhythmien?
3. Führt ein zusätzliches Fönen zu einer additiven Steigerung der Arrhythmiezahlen?

Die Verwendung von Mäusen als Tiermodell in der kardiovaskulären Forschung hat eine Vielzahl an Mauslinien und genetisch manipulierten Genotypen hervorgebracht. Aus diesem Grund begann man verschiedene Mauslinien in Bezug auf ihre kardiovaskulären Eigenschaften zu vergleichen. Dabei zeigten sich zum Teil gravierende Unterschiede. Unter anderem wurde ein unterschiedlicher basaler Sympathikotonus proklamiert. Jedoch wurde bis jetzt noch kein Unterschied in Bezug auf die Arrhythmogenität verschiedener Linien gezeigt oder ein Zusammenhang mit dem basalen Sympathikotonus der Tiere hergestellt.

Basierend auf Vorarbeiten wurden für den zweiten Teil der Arbeit 3 Mauslinien mit einem unterschiedlichen basalen Sympathikotonus ausgewählt und dem zuvor im ersten Teil validierten Stresstest unterzogen. Dabei wurde die Hypothese getestet, dass der genetische Hintergrund einer Mauslinie einen Einfluss auf die Arrhythmogenität unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation hat.

Es wurden folgende Fragen für den zweiten Teil formuliert:

1. Ist der zuvor im ersten Teil der vorliegenden Arbeit validierte Stresstest dazu geeignet um eine linienabhängige Arrhythmogenität von Mäusen nachzuweisen?
2. Besteht ein liniengebundener Unterschied in Bezug auf die basale Herzfrequenz als indirektes Maß für den Grundsympathikotonus und determiniert dieser die Reaktion einer Linie auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation?
3. Determiniert die basale Herzfrequenz, als indirektes Maß für den Grundsympathikotonus, die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien?
4. Ist für die Induktion von ventrikulären Arrhythmien die absolute Höhe der Herzfrequenzsteigerung oder die Dauer der maximalen Frequenzerhöhung entscheidend?

## 2 Material und Methoden

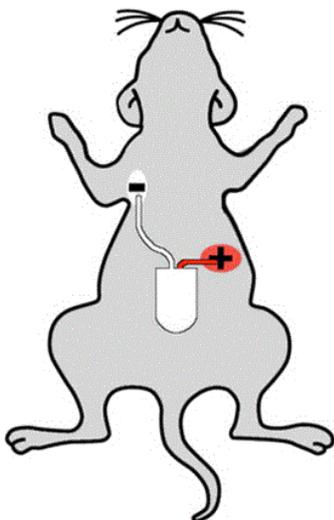
### 2.1 Versuchstiere

Die Etablierung eines physiologischen Stressmodells bei wachen Mäusen wurde an 11 männlichen Tieren der Linie C57BL/6J von Jackson,  $24,88 \pm 1,7$  g durchgeführt. Für den Linienvergleich wurden jeweils 6 Tiere der Linien BALB/cJ und FVB/NJ in den Versuch hinzugenommen. Die Tiere kamen im Alter von 7 Wochen aus der Tierhaltung des UKE in unser Institut und wurden hier in getrennte Käfige gesetzt, welche sich im selben Raum befanden. Den Tieren wurde ausreichend Zeit für die Eingewöhnung gegeben. Die Tiere wurden während des gesamten Versuchszeitraumes in Einzelhaltung bei einer Raumtemperatur von  $20 \pm 2$  °C und einer Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 5$  % gehalten. Darüber hinaus verfügte der Raum über eine automatische Lichtsteuerung, die das Licht um 07:00 Uhr an und um 19:00 Uhr ausschaltete. Die Haltung erfolgte artgerecht in Standardkäfigen und die Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu Nahrung und Wasser. Die durchgeführten Arbeiten an Mäusen wurden vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt. Die Arbeiten und das Töten der Tiere erfolgten gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen.

### 2.2 Implantation der Telemetriesender

Für die radiotelemetrische EKG-Messung wurden Telemetriesender der Firma Data Sciences International (DSI®, St. Pul, MN USA) implantiert. Die hier beschriebene Vorgehensweise war bei allen Mäusen identisch. Die Implantation der Telemetriesender wurde nach sieben Ruhetagen für die Mäuse vorgenommen. Vor der Implantation wurden die Tiere gewogen. Das Gewicht wurde als Parameter für die Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere verwendet. So mussten die Tiere ihr präoperatives Gewicht vor Beginn der Versuchsreihe wieder erreicht haben. Bei den ersten 6 Tieren wurde der Sendertyp DSI TA10ETA-F20 mit einem Gewicht von 4 g verwendet. Bei allen folgenden Tieren wurde der Sender DSI TA11ETA-F10 implantiert. Dieser Sender wog 2 g und war wesentlich kleiner. Die Implantation der EKG-Sender ermöglichte die Messung von Herzfrequenz, EKG und Aktivität über einen unbegrenzten Zeitraum, sowie eine kabellose Übertragung und Speicherung der Daten. Die Aktivierung des Senders erfolgte über einen Magneten, die Steuerung der Datenaufzeichnung durch den PC. Für die Operation wurden die Tiere aus

ihrem Käfig entnommen und als erstes in einen Plexiglasbehälter gesetzt. In diesen Behälter wurde als inhalatives Narkotikum Isofluran 5% in einem Druckluftgemisch in atmosphärischer Luftkonzentration geleitet. Die Flussrate betrug bedarfsadaptiert zwischen 600-900 ml/ min. Sobald das Tier auf Schmerzreize keine Reaktion mehr zeigte, wurde es aus dem Behälter entnommen und mit dem Rücken auf eine Korkplatte gelegt. Eine darunter liegende, auf 35 °C erwärmte, Heizplatte verhinderte ein Auskühlen der Tiere. Mit Klebestreifen wurden alle vier Extremitäten auf der Korkplatte befestigt und die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe benetzt. Die intraoperative Narkose erfolgte über eine Maske mit Isofluran 3% und einer Flussrate von 400-500 ml/min. Es wurde auf eine stabile und ausreichend tiefe Narkose bei durchgehender Spontanatmung geachtet. Anschließend erfolgte die Injektion von Rimadyl® 0,05 ml/ 30 mg Körpergewicht und Baytril® 0,06 ml/ 30 mg Körpergewicht, jeweils in einer 1:10 Verdünnung mit Natriumchlorid. Dann wurde das OP-Gebiet mit Veet Enthaarungscreme am Bauch und an der linken Thoraxwand enthaart und mit Cutasept® desinfiziert. Die Operation begann mit einem vertikal verlaufenden Hautschnitt über der linken Bauchwand sowie einem horizontaler verlaufenden Schnitt über der rechten Schulter. Bei den ersten 6 Tieren wurde der Sender subkutan auf die muskuläre Bauchwand implantiert. Bei allen anderen Tieren wurde stumpf ein subkutaner Tunnel von der Bauchwand seitlich auf den Rücken präpariert und der Sender dann hierüber auf dem Rücken der Maus platziert.



**Abbildung 3: Skizze der Telemetriesenderplatzierung bei der Maus**

Modifiziert aus: McCauley, M. D. and X. H. Wehrens (2010). "Ambulatory ECG recording in mice." J Vis Exp(39).

Für die Positionierung der Elektroden wurde anschließend stumpf ein subkutaner Tunnel an der Brustwand entlang zur Medioklavikularlinie präpariert. Es folgte die Nahtfixierung der ersten Elektrode entlang der Klavikula auf der muskulären Thoraxwand. Die zweite Elektrode wurde, respektive zur Eindhoven II Ableitung, auf der linksseitigen Bauchmuskulatur aufgenäht. Der in das PC-Programm von DSI eingepflegte Sender wurde mit einem Magneten eingeschaltet und ein Probe-EKG aufgezeichnet. Nach erfolgreichem Test des Senders wurde die Haut mit einem 5-0 nicht resorbierbaren Vicrylfaden in Einzelknopftechnik verschlossen. Zusätzlich wurden eine dünne Schicht Hautkleber und 3-5 Hautklammern verwendet. Die Tiere lagen bis zum Erwachen auf der warmen Korkplatte. Danach wurden sie in ihren Käfig zurückgesetzt, in dem ihnen ausreichend Wasser und Futter in Plastikschaalen zur Verfügung stand. In der ersten postoperativen Woche erfolgte eine tägliche Kontrolle der Nähte sowie der Gewichtes. Bei einer Wunddehiszenz wurde die Naht unter inhalativer Narkose revidiert. Zeigten die Tiere einen zu großen Gewichtsverlust wurden sie mit einer i.p. Injektion von 0,5 ml Natriumchlorid substituiert.

### 2.3 Validierung eines physiologischen Stresstestes bei wachen Mäusen

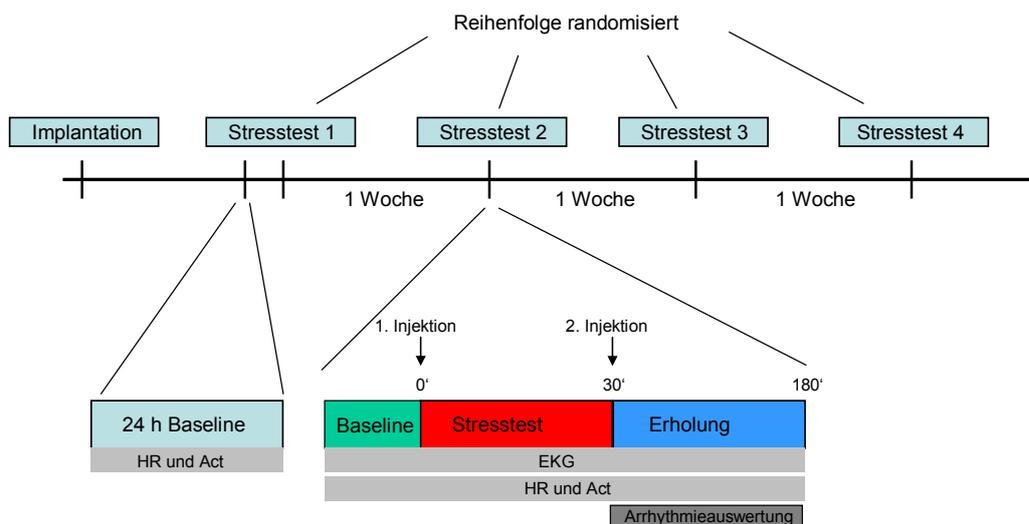


Abbildung 4: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Vorversuche

Abbildung 4 zeigt eine Übersicht des ersten Abschnittes der Arbeit. Dabei wurde ein Stresstest validiert, welcher dann im zweiten Teil der Arbeit im Linienvergleich verwendet wurde. Zunächst wurde bei allen Tieren zwei Wochen nach der Telemetriesenderimplantation eine 24 h Baselinemessung von Herzfrequenz und Aktivität mit einer Abtastfrequenz von 1000/s vorgenommen.

### 2.3.1 Auswahl der Stresstestmethode

Verwendet wurden eine intraperitonealen Injektion von Isoproteronol sowie zusätzlich ein Fön. Die Placebokontrolle erfolgte durch die intraperitoneale Injektion mit Natriumchlorid. Hieraus ergaben sich 4 mögliche Stressmethoden.

1. Injektion von Isoproteronol (Iso)
2. Injektion von Natriumchlorid als Placebo (NaCl)
3. Kombination Isoproteronol und Fön (Iso + Fön)
4. Kombination Natriumchlorid und Fön (NaCl + Fön)

Gruppe 1	Iso	Iso + Fön	NaCl	NaCl + Fön
1. Woche	Maus 1 + 2	Maus 3 + 4		
2. Woche	Maus 3 + 4	Maus 1 + 2		
3. Woche			Maus 1 + 2	Maus 3 + 4
4. Woche			Maus 3 + 4	Maus 1 + 2

**Tabelle 2: Randomisierte Zuteilung der Mäuse für jede der 4 Stresstestvarianten**

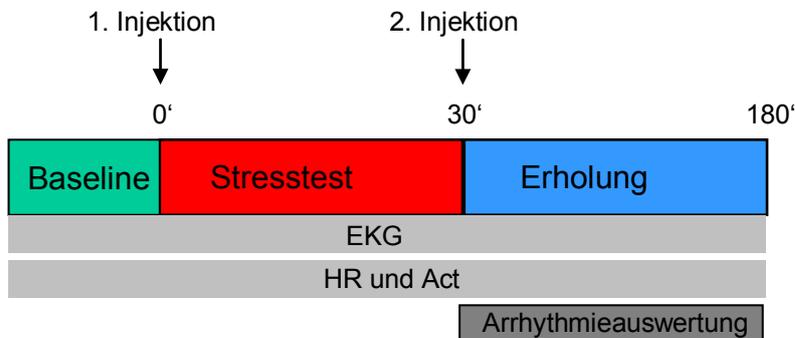
Jede Maus wurde randomisiert allen Varianten unterzogen. Es wurden jeweils 4 Mäuse pro Tag einem Stresstest unterzogen. Der Stresstest fanden zwischen 09:00 Uhr und 11:00 Uhr morgens statt. Zwischen jedem Stresstest lagen 7 Tage.

### 2.3.2 Herstellung der Isoproteronol-Lösung

Am Tag vor dem Versuchsbeginn wurden die Mäuse gewogen für eine gewichtsadaptierte Dosis Isoproteronol. Dann wurden die Mäuse in einen neuen Käfig ohne Einstreu gesetzt, die Telemetriesender mit Hilfe eines Magneten eingeschaltet und auf Funktionsfähigkeit überprüft. Die Aufzeichnungsfrequenz wurde auf 1 Wert/min umgestellt. Vor Beginn des Versuchs wurde am selben Tag die benötigte Isoproteronol-Lösung hergestellt. Hierfür wurden 10 mg Isoproteronol abgewogen und zusammen mit 10 ml Aqua dest. für die Stocksolution vermischt. Aus dieser Stocksolution wurden 5 ml entnommen und mit 45 ml Natriumchlorid zusammen in ein separates Gefäß gegeben. Dies ergab 50 ml einer Lösung

mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml Isoproterenol. Hiervon erhielten die Mäuse im Stresstest zweimal eine Dosis von je 2 mg Isoproterenol / kg Körpergewicht.

### 2.3.3 Zeitlicher Ablauf des Stresstestes



**Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf des Stresstestes**

Der zeitliche Verlauf des Stresstestes ist in Abbildung 5 zu sehen. Am Morgen des Stresstests wurde ein 30-minütiges Baseline-EKG geschrieben, bevor der eigentliche Versuch durchgeführt wurde. Dann erfolgte die Vorbereitung der Injektionen. Jeweils 2 Tiere erhielten eine gewichtsadaptierte Dosis von 2mg/kg Isoproterenol pro Spritze, die anderen 2 Tiere erhielten ebenfalls gewichtsadaptiert 2mg/kg NaCL in 2 Spritzen. Die Spritzen wurden vor dem Versuchsraum deponiert. Nach der Aufzeichnung der Baseline erfolgten im Abstand von 30 min die beiden Injektionen mit Isoproterenol oder Natriumchlorid. Die Mäuse, welche gefönt werden sollten, erhielten ihre Dosis als erstes. Nach den beiden Injektionen wurden die Mäuse entweder in Ruhe gelassen, oder sie wurden, dem Protokoll entsprechend, über einen Zeitraum von 30 min für jeweils 1 min im Wechsel gefönt. Während des gesamten Versuches war auf dem PC das EKG sichtbar. Die Qualität der Aufnahme sowie die Zeitpunkte der Injektionen wurden protokolliert. Nach Abschluss der Stresstestphase wurden die Mäuse für mindestens 5 h in ihrem Käfig gelassen um das Absinken der Herzfrequenz zu gewährleisten. Sie hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Nach dem Ablauf der 5 h wurde die EKG-Messung beendet, die Sender abgeschaltet und die Mäuse zurück in den ursprünglichen Käfig zurück gesetzt. Zwischen den einzelnen Versuchen lagen 7 Tage.

## 2.4 Anwendung des validierten Stresstestes an drei murinen Linien

Die Vorbereitung der Tiere sowie die Implantation der Sender erfolgte identisch zum ersten Teil der Arbeit. Im zweiten Teil der Arbeit wurde durch den zuvor validierten Stresstest die Hypothese getestet, ob es einen linienspezifischen Unterschied in Bezug auf die Arrhythmogenität bei Mäusen gibt. Bei allen Tieren wurde zunächst die 24 h Baselinemessung von Herzfrequenz und Aktivität vorgenommen. Nach 7 Tagen wurde dann an 4 Tieren einer Linie, aufgeteilt in Verum- und Placebogruppe, der Stresstest durchgeführt. Der Aufbau des Stresstests entspricht dem in Abbildung 5 gezeigten Ablauf. Auch hier lagen zwischen den beiden Versuchen 7 Tage. für jedes Tier

## 2.5 Auswertung der Arrhythmien

Die Arrhythmieauswertung erfolgte für beide Teile dieser Arbeit analog. Während des Stresstests wurde das EKG kontinuierlich bei einer Aufzeichnungsrate von 1 kHz durch das Programm Dataquest A.R.T. (Version 4.0, Data Science International) aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte halb-automatisch mit der Software ecgAuto® (Version 2.5.1.18, emka Technologies, Paris, Frankreich). Für die Auswertung wurde eine tier-spezifische waveform Bibliothek sowie eine automatische Analyse der RR-Intervalle genutzt.

Die als Rohdaten vorliegenden EKG-Daten wurden durch das Programm ecgAUTO® konvertiert. Hiernach erfolgte die Definition des Analysezeitraumes. Die Auswertung begann unmittelbar nach der zweiten Injektion über einen Zeitraum von 120 min. Für exakte Zeitpunktbestimmung der zweiten Injektion war eine genaue Protokollierung während der Aufzeichnung nötig. Im Anschluss wurden die EKG-Parameter festgelegt. Über die Einstellung "max. inter beat artefact" und "R to other amplitude ratio" war eine Optimierung der nach dem ersten Durchlauf möglich. Die Auswertung erfolgte über 2 Wege, über eine Gapanalyse und über die Analyse der RR-Intervalle. Beide Möglichkeiten markierten potenzielle Arrhythmien im EKG als so genannte Gaps. An die Analyse der Gaps schloss sich die Analyse der RR-Intervalle an. Diese beruhte auf der Möglichkeit des EKG-Programms über einen im Vorfeld festgelegten RR-Abstand die 1% größten und kleinsten RR-Intervalle herauszufiltern und darzustellen. Als Gaps wurden dann diejenigen Abschnitte dargestellt, die das Programm nicht als QRS-Komplex identifizierte. Es war möglich diese Abschnitte isoliert darzustellen, auszuwerten, kennzeichnen und dann als einzelne Datei speichern zu können. Zusammen mit der Arrhythmieform wurden auch der Zeitpunkt und die Dauer der Arrhythmie gespeichert. Diese wurden dann in einer separat angelegten Exceltabelle für jede

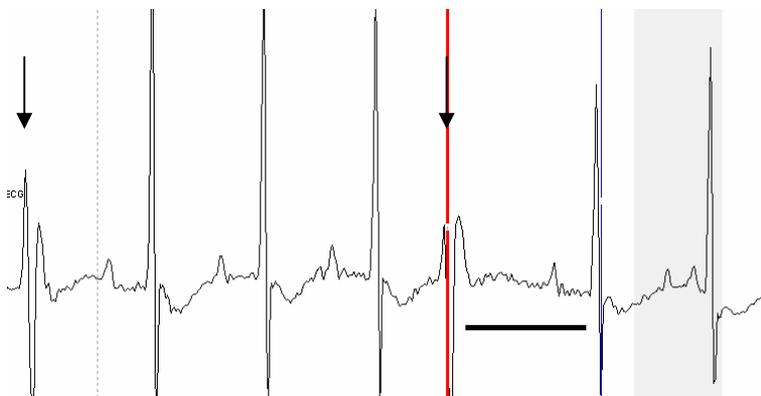
Maus gespeichert. Es erfolgte eine vergleichende Darstellung aller identifizierten Arrhythmieformen für jede Stresstestversion mit dem Programm Graph Pad Prism® (Version 5, GraphPad Software, Inc., USA). Für den zweiten Teil der Arbeit wurde die Gesamtzahl aller Arrhythmien zwischen den 3 Linien verglichen. Weiter wurden die Zeitpunkte an denen die Arrhythmien zu sehen waren verwendet. In Form eines Histogramms wurde die Häufigkeit der Ereignisse in Prozent über den Versuchszeitraum gezeigt. Zusätzlich wurde eine Abbildung erstellt, welche die Verteilung der Arrhythmien über den gesamten Versuchszeitraum für jede Maus darstellte.

### 2.5.1 Ventrikuläre Arrhythmien im murinen EKG

Die ventrikulären Arrhythmien dieser Arbeit wurden anhand der "The Lambeth Conventions" (Walker, Curtis et al. 1988) sowie die "The Lambeth Conventions II" (Curtis, Hancox et al. 2013) klassifiziert.

#### Ventrikuläre Extrasystolen und Sonderformen

Eine ventrikuläre Extrasystole, abgekürzt als VES, ist definiert als eine einzelne, verfrüht und außerhalb des Grundrhythmus auftretende Herzaktion, die sich ohne vorhergegangene P-Welle an den letzten QRS-Komplex anschließt. Wichtig ist, dass vor und nach der VES der grundlegende Sinusrhythmus für mindestens 4 Schläge erhalten bleibt. Charakterisiert wird eine VES durch einen verbreiterten und verformten QRS-Komplex, dem bei höheren Frequenzen eine kompensatorische Pause folgt. Oft ist auch die Amplitude der R-Zacke verringert.

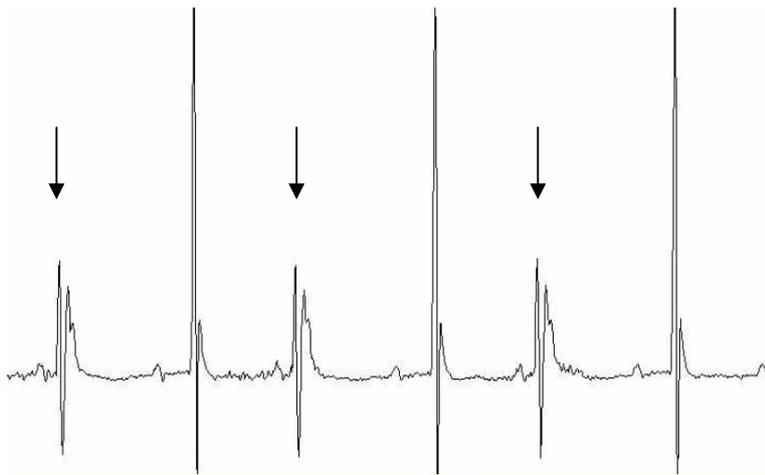


**Abbildung 6: Ventrikuläre Extrasystole im murinen EKG**

Die Pfeile markieren die VES, der Balken zeigt die kompensatorische Pause.

## Bigeminus

Als Bigeminus wird eine wiederholte direkte Kopplung einer VES an einen regulären Schlag bezeichnet. Über mehrere Schläge hinweg wechselt sich ein regulärer QRS-Komplex gefolgt von einer VES ab. Um einen Bigeminus von einer einzelnen VES abzugrenzen, wurde Mindestzahl von 2 Wiederholungen dieser 1:1 Kopplung festgelegt.

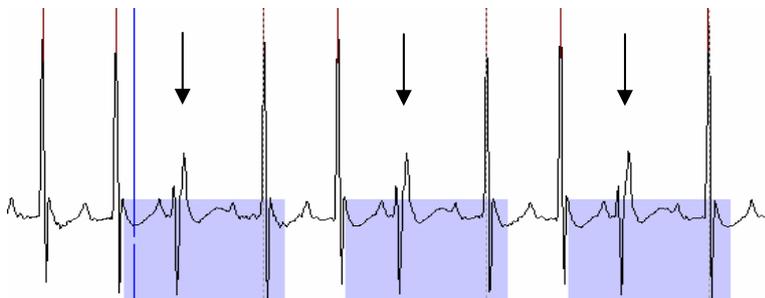


**Abbildung 7: Bigeminus im murinen EKG**

Die Pfeile markieren die VES, welche sich abwechselnd zu den physiologischen QRS-Komplexen zeigen.

## Trigeminus

Ein Trigeminus ist durch eine 1:2 Kopplung einer VES an 2 reguläre Schläge gekennzeichnet. Auch hier muss die Aktion mindestens 2 aufeinander folgende Aktionen beinhalten.

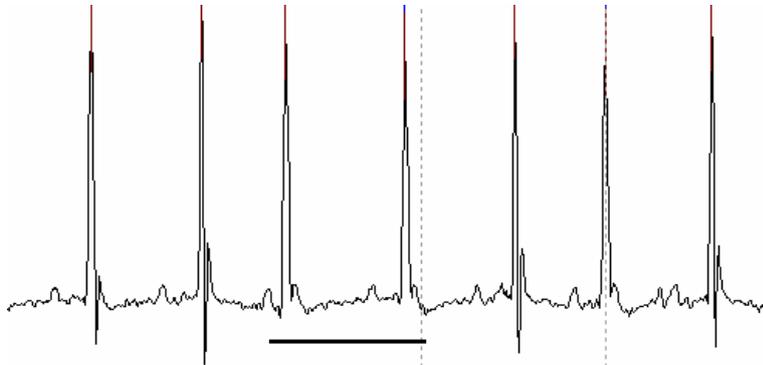


**Abbildung 8: Trigeminus im murinen EKG**

Die Pfeile markieren die VES auf welche jeweils 2 physiologische QRS-Komplexe folgen. Die violett unterlegten Bereich zeigen die von dem Programm ecgAuto® gekennzeichneten Gaps.

## Couplet

Als Couplet werden zwei gekoppelte VES bezeichnet. Dabei muss vor und nach dem Couplet ein regulärer QRS-Komplex liegen.

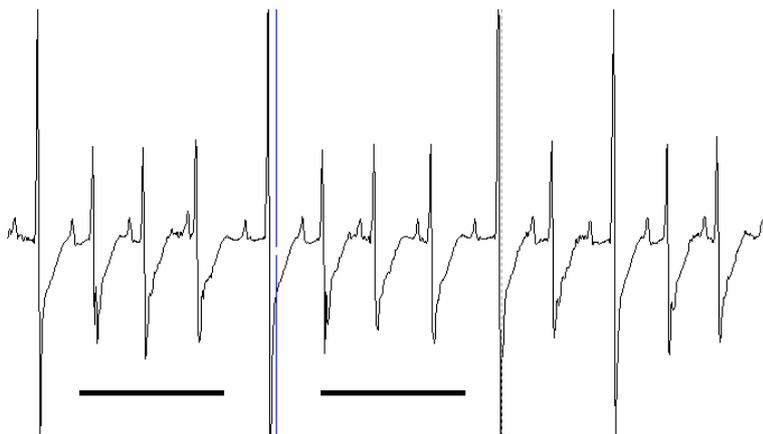


**Abbildung 9: Couplet im murinen EKG**

Der Balken markiert zwei gekoppelte VES.

## Triplet/ Salve

Als Triplet oder auch Salve wird ein Komplex von drei aufeinander folgenden VES bezeichnet. Auch hier muss vorher und nachher mindestens 1 regulärer QRS-Komplex liegen.

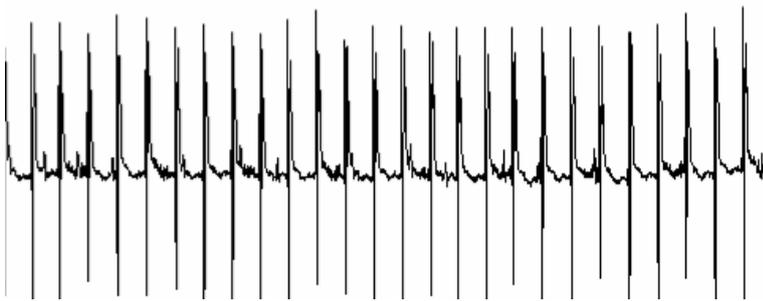


**Abbildung 10: Salve im murinen EKG**

Die Balken markieren die 3 aufeinander folgenden VES, welches als Triplet oder auch Salve bezeichnet wird.

### Ventrikuläre Tachykardie

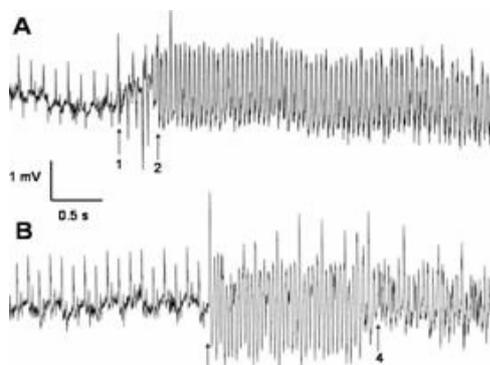
Als Ventrikuläre Tachykardie, abgekürzt VT, ist durch eine Abfolge vom mindestens 4 VES definiert. Es kann zwischen einer mono- oder polymorphen VT unterschieden werden. Während sich die Kammerkomplexe einer monomorphen VT gleichen, verändert sich der Kammerkomplex unter einer polymorphen VT von Schlag zu Schlag. Während einer VT liegt eine Dissoziation von Kammer- und Vorhofaktion vor. Dies ist erkennbar an den P-Wellen, die vom QRS-Komplex abgekoppelt. Das PQ-Intervall ist somit nicht mehr konstant. Auch ist die Frequenz deutlich erhöht. In Abbildung 11 ist die VT im EKG einer Maus zu sehen.



**Abbildung 11: Monomorphe Ventrikuläre Tachykardie im murinen EKG**

### Ventrikuläre Fibrillation

Eine Ventrikuläre Fibrillation oder Kammerflimmern, abgekürzt VF, zeichnet sich durch eine völlige Aufhebung des regulären Rhythmus aus. Hier ist weder ein QRS-Komplex noch eine P-Welle abgrenzbar und der Rhythmus tachykard und unregelmäßig. In Abbildung 11 ist eine solche VF zu sehen. Gut zu erkennen ist der Übergang von einer Tachykardie mit noch sichtbaren R-Zacken in das Kammerflimmern.



**Abbildung 12: Ventrikuläre Fibrillation im murinen EKG**

Modifiziert aus Walker, M. J., M. J. Curtis, et al. (1988). "The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion." *Cardiovasc Res* **22**(7): 447-455.

## 2.6 Auswertung von Herzfrequenz und Aktivität

Die Auswertung von Herzfrequenz und Aktivität erfolgte durch die Programme Analysis (Fa. DSI Dataquest A.R.T. Analysis, Version 4.3) und Microsoft Office Excel® 2003. Die Parameter wurden im Stresstest mit einer Rate von 1 kHz erhoben, während der Baseline mit einer Frequenz von 1 Wert/5 min über Dataquest A.R.T. (Version 4.3, Data Sciences International) aufgezeichnet und durch Analysis in Microsoft Office Excel® 2003 übertragen. In Microsoft Office Excel® 2003 erfolgten dann die Berechnungen der Mittel- und Maximalwerte, sowie der Differenzen. Bei der Auswertung der Baseline wurden. Auf Grund der Aufzeichnungslänge und des zirkadianen Rhythmus der Mäuse, Tag und Nacht einzeln ausgewertet. Die Berechnungen der auf die Aktivität normten Herzfrequenz wurden mit Hilfe eines Makros durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Rohdaten durch Analysis konvertiert und die Daten in Exceldateien gesammelt. Durch die Berechnungen über das Makro wurden folgende Daten ermittelt: virtueller 24 h Rhythmus, ANZ-Klassen und Herzfrequenz normiert auf Aktivität. Diese Auswertungen wurden analog für den Stresstest und die Baseline vorgenommen. Einzig die Auswertungen der Area under the curve und der Histogramm wurden mit Graph Pad Prism® 5 getätigt.

## 2.7 Graphische Darstellung und Statistik

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Graph Pad Prism® 5. Im Folgenden sind die verwendeten Statistiken und die dazu gehörenden Auswertungen aufgeführt.

### **One-Way ANOVA mit Newman-Keuls als post test**

Angewendet wurde die One-Way ANOVA bei folgenden Auswertungen:

- Vergleichende Darstellung des zeitlichen Verlaufen von Herzfrequenz und Aktivität
- Vergleich der Differenzen zwischen Minimal- und Maximalwerten bei Aktivität und Herzfrequenz
- Auswertung der Arrhythmien im ersten Teil der Arbeit
- Vergleich der Gesamtzahl aller Arrhythmien unter Isoproteronol und NaCl
- Vergleich der Area under the curve für alle Versuchsteile
- Darstellung des Effektes von Isoproteronol für die Auswertung der Differenz zwischen Mittel- und Maximalwerte bei Herzfrequenz bzw. Aktivität. Diese Auswertung wurde in Tag und Nacht unterteilt.

## Two-Way ANOVA mit Bonferroni als post test

Angewendet wurde die Two-Way ANOVA bei folgenden Auswertungen:

- Vergleich der Mittelwerte der ersten 25 min vor der ersten Injektion mit dem Maximalwerten nach der zweiten Injektion für die Parameter Herzfrequenz und Aktivität
- Vergleich der Mittelwerte von Herzfrequenz und Aktivität unter Isoproteronol und NaCl für die 25 min Baseline vor der ersten Injektion
- Vergleich der Maximalwerte von Herzfrequenz und Aktivität unter Isoproteronol und NaCl, während des Zeitraumes nach der zweiten Injektion bis zum Ende der Aufzeichnung
- Vergleich der Mittelwerte von Herzfrequenz und Aktivität bei Tag und Nacht während der Baseline.
- Darstellung des Effektes von Isoproteronol für die Auswertung der mittleren und maximalen Herzfrequenz und Aktivität. Diese Auswertung wurde in Tag und Nacht unterteilt.

## Erstellung eines Histogramms

- Create: Frequency distribution
- Tabulate: Relatives frequencies as percent
- Bin range:
  - Herzfrequenz: 120 bis 1000 für die Auswertung von Isoproterol und NaCl
  - Herzfrequenz: 0 bis 1000 für die Auswertung der Baseline
  - Aktivität: 0 bis 100 bei allen Auswertungen
- Bin with: Herzfrequenz: 40 Aktivität: 5,0
- Replicates: Bin each replicate

Angewendet wurde das Histogramm für die Auswertung und Darstellung der Häufigkeitsverteilungen von Herzfrequenz und Aktivität während der Versuchsabläufe. Dies gilt sowohl für den Stresstest, als auch für die Auswertung der Baseline.

**Area under the curve (AUC)**

- Baseline: Mean of the first 25
- Minimum peak height: Less than 10 % of the distance from minimum to maximum y
- Peak direction: By definition, all peaks must go above the baseline

Angewendet für die AUC für die Berechnung und Darstellung der Fläche unterhalb der Verlaufskurven von Herzfrequenz und Aktivität.

**2.8 Versuchstiereuthanasie**

Nach abgeschlossener Versuchsreihe wurden die Tiere in einen Plexiglasbehälter gesetzt und durch Zuleitung eines inhalativen Narkotikums in deutlich erhöhter Dosis euthanasiert. Sobald die Atmung sistierte wurden die dem Behälter entnommen und durch die Fixierung des Kopfes mit einer im Nacken platzierten Schere und anschließendem Zug am Schwanz getötet.

**2.9 Pharmaka**

Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9% (B. Braun, Melsungen AG, Deutschland)

Bepanthen® Augensalbe (Dexpanthenol, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)

Rimadyl® (Carprofen, Pfizer, Deutschland)

Baytril® (Enrofloxacin, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)

Isofluran (Abbot, Wiesbaden, Deutschland)

Isoproteronol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

## 3 Ergebnisse

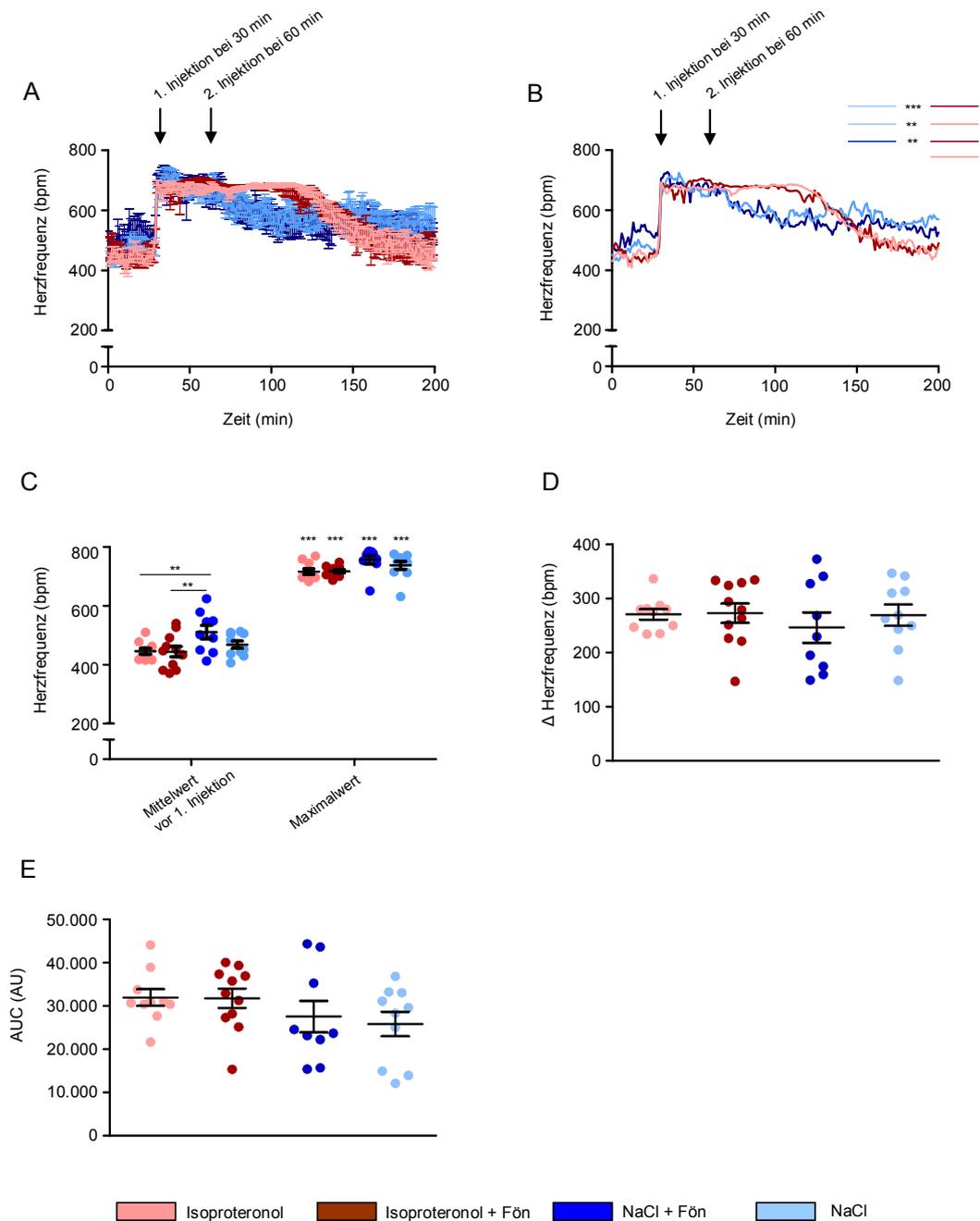
### 3.1 Validierung eines physiologischen Stresstestes an der wachen Maus

Im ersten Teil der Arbeit wurden alle Tiere der Linie C57BL/6J jedem der vier Stresstestvarianten (Isoproteronol, Isoproteronol + Fön, NaCl, NaCl + Fön) unterzogen. Die 11 Tiere wurden zuvor in 4 Gruppen unterteilt und randomisiert mit jeweils 7 Tage Abstand jeder Variante unterzogen. Die Abbildungen 13 bis 15 stellen die Ergebnisse des ersten Versuchsteiles dar.

#### 3.1.1 Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung

In A und B aus Abbildung 13 sind die Herzfrequenzverläufe während der 4 Stresstestvarianten im Vergleich dargestellt. Zu Beginn zeigten die Tiere bei allen vier Varianten eine ähnliche Ruhefrequenz von 450 bis 550 bpm. Die erste Injektion führte bei allen Varianten zu einem deutlichen Anstieg der Herzfrequenz auf einen Maximalwert von 700 bis 730 bpm, wobei der Frequenzanstieg unter NaCl etwas größer ausfiel. Vergleicht man die Herzfrequenzverläufe, so zeigte sich für den gesamten Verlauf keine signifikante Differenz zwischen den Varianten mit oder ohne Fön. Jedoch war ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Hauptgruppen Isoproteronol bzw. NaCl erkennbar. Der größte Unterschied zwischen der Verwendung von Isoproteronol und NaCl war nach der 2. Injektion zu beobachten. Unter der Wirkung von Isoproteronol schloss sich an die 2. Injektion eine Plateauphase an. Hierbei lag die Herzfrequenz weiterhin bei Werten um 700 bpm. Ab dem Zeitpunkt 100 min fiel dann die Herzfrequenz stetig ab, bis zwischen 150 und 180 min wieder das Ausgangsniveau von 450 bpm erreicht wurde. Erhielten die Mäuse jedoch NaCl, so begann der Frequenzabfall unmittelbar nach der Injektion. Am deutlichsten war dies nach der zweiten Injektion zu erkennen. Zum Zeitpunkt 100 min stagnierte die Frequenz bei 520 bis 600 bpm, wobei diese unter der zusätzlichen Verwendung eines Fönes geringgradig niedriger war. Während also die Herzfrequenz nach einer zweimaligen NaCl-Injektion schnell wieder abfiel, konnte durch die Injektion von Isoproteronol eine längere andauernde Frequenzerhöhung erreicht werden. Diese Beobachtungen spiegelten sich ebenso in der Statistik wieder. So zeigte der Vergleich zwischen Isoproteronol und Isoproteronol + Fön, bzw. NaCl und NaCl + Fön keinen signifikanten Unterschied. Das zusätzliche Fönen der Tiere hatte somit auf die Herzfrequenz keinen zusätzlichen Effekt. Jedoch zeigte sich ein Vergleich der Frequenzverläufe zwischen den Varianten ohne Fön für die ersten 150 min des

Stresstestes signifikant. Der Vergleich von NaCl und Isoproteronol + Fön war mit  $p < 0,001$  hoch signifikant unterschiedlich und auch der Vergleich von NaCl und Isoproteronol, NaCl + Fön und Isoproteronol + Fön, sowie NaCl + Fön und Isoproteronol zeigte sich mit  $p < 0,01$  statistisch signifikant unterschiedlich. In C ist zu sehen, was sich schon in A und B zeigte. Durch die Injektion, unabhängig von deren Inhalt, steigerte sich die Herzfrequenz mit  $p < 0,001$  statistisch signifikant bei allen 4 Varianten. Darüber hinaus zeigte sich ein signifikanter Unterschied vom  $p < 0,01$  zwischen Isoproteronol und NaCl + Fön, sowie zwischen Isoproteronol + Fön und NaCl + Fön für die Mittelwerte der ersten 25 min. Die in D dargestellte Fläche unter der Kurve (AUC) zeigt, dass zwar die Gesamtfläche der Versuche unter Isoproteronol größer war im Gegensatz zum Placeboversuch, es jedoch statistisch keinen signifikanten Unterschied zwischen den vier Versuchsvarianten gab. Ebenso zeigte sich vor allem für die Placeboversuche eine größere Streubreite der Einzelwerte.



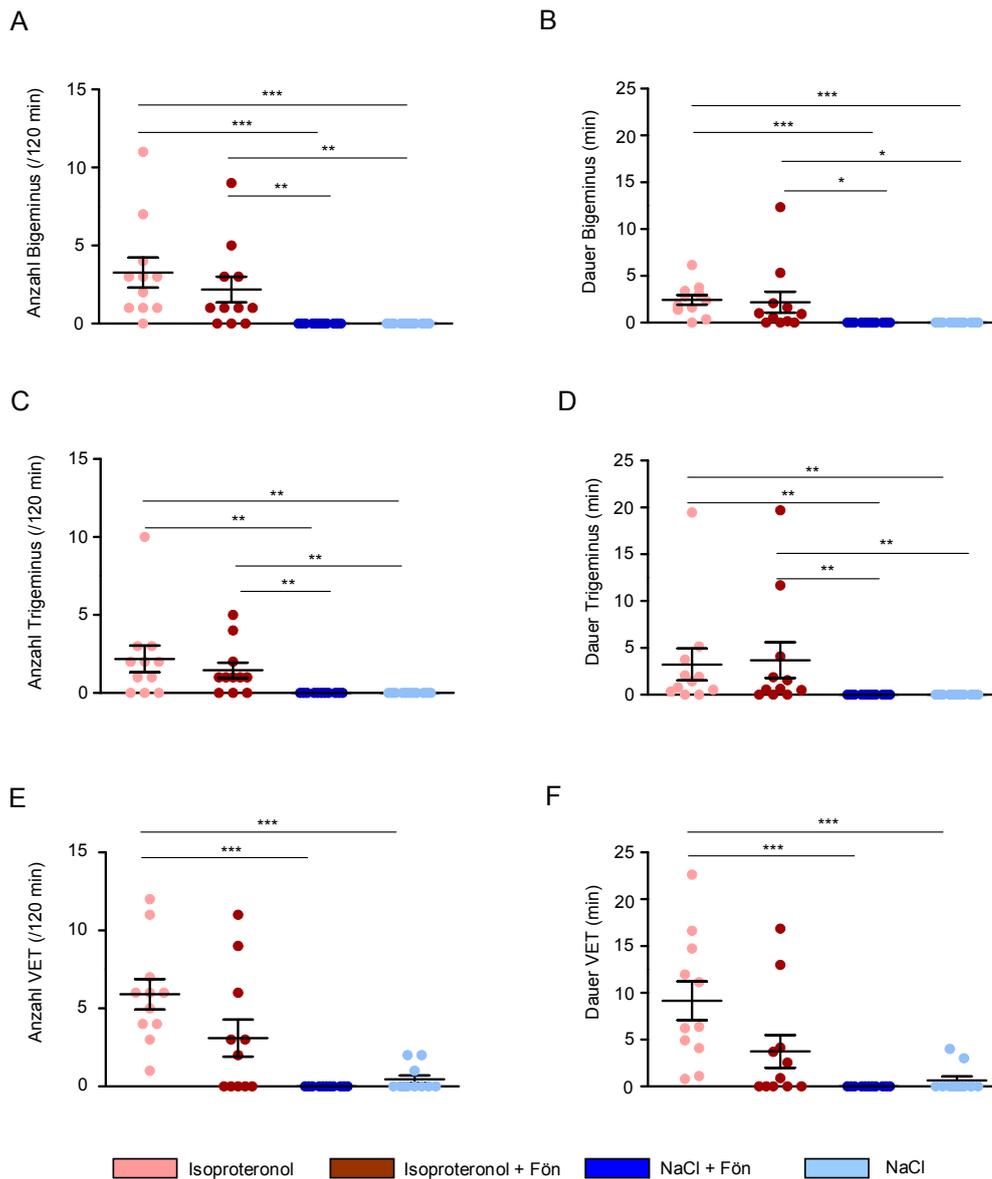
### Abbildung 13: Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung für die Stresstestvalidierung

Vergleichend dargestellt sind die Ergebnisse der 4 Stresstestvarianten. Jede Variante wurde an allen 11 Mäusen des Genotypen C57BL/6J durchgeführt. (A) Herzfrequenzverlauf vergleichend für jede Stressmethode während des Versuchsablaufes mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und als Mittelwerte (B). (C) Vergleichende Darstellung der mittleren Herzfrequenz aller Stressmethoden vor der 1. Injektion und dem Maximalwert nach der 1. Injektion mit entweder Isoproterenol oder Natriumchlorid. (D) Fläche unterhalb der Kurve (AUC) der in A abgebildeten Verlaufskurven. Als Baseline wurde der Mittelwert der ersten 25 min verwendet. (E) Differenz der Herzfrequenz der in B gezeigten Werte für die jeweilige Stresstestvariante.

(n = 11, \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05)

### **3.1.2 Ergebnisse der Arrhythmieauswertung**

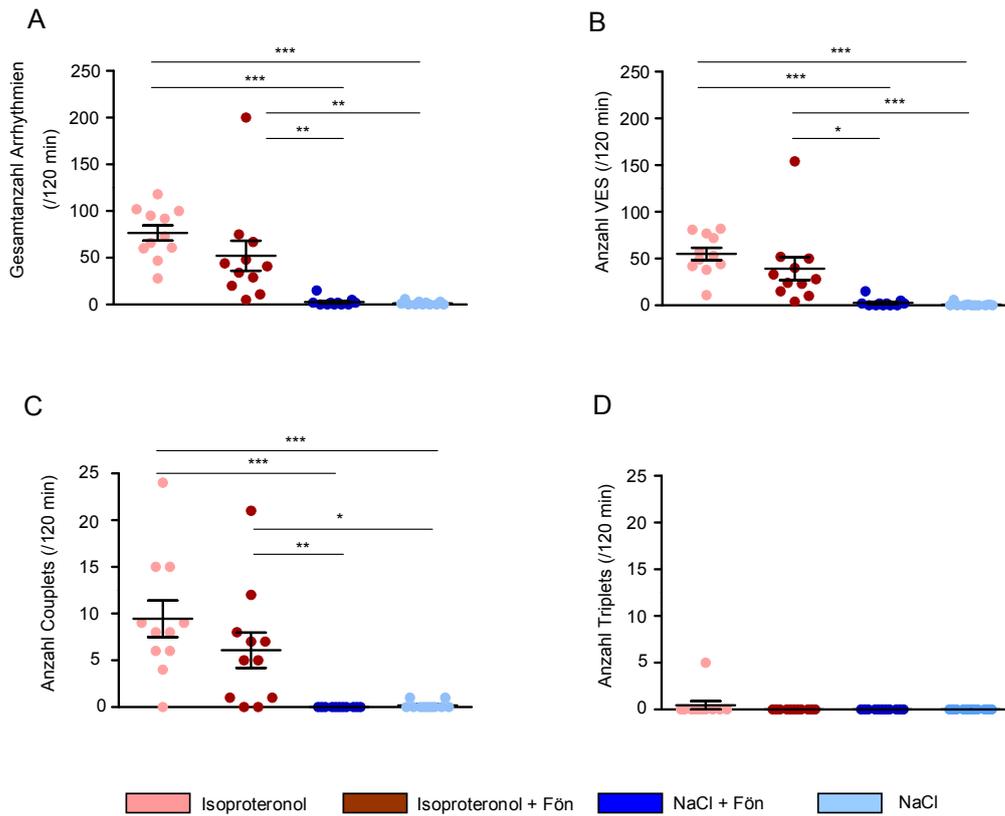
In Abbildung 14 und 15 ist ein deutlicher Unterschied der Arrhythmiezahl zwischen den Isoproteronol- und Placeboversuchen erkennbar. In der gesamten Auswertung auf beiden Abbildungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied für alle Arrhythmieformen zwischen Isoproteronol und NaCl. Unter NaCl konnten auch durch ein zusätzliches Fönen keine signifikante Anzahl von ventrikulären Arrhythmien induziert werden. Weiterhin zeigte sich im Vergleich der Stressvarianten ohne und mit Fön, dass diese keine zusätzlichen Arrhythmien induzierten konnte. Insgesamt zeigten sich bei allen Auswertungen unter Isoproteronol die signifikant meisten Arrhythmien.



**Abbildung 14: Ergebnisse der Arrhythmieauswertung für die Stresstestvalidierung Teil I**

Vergleichend dargestellt sind Anzahl und Dauer in min der jeweiligen Arrhythmieform während der ersten 120 min der 4 verschiedenen Stresstestmethoden. Auch hier wurden alle 11 Mäuse den Genotypen C57BL/6J jedem Stresstest unterzogen. (A) Anzahl und (B) Dauer der verzeichneten Bigemini pro 120 min Stresstest. (C) Anzahl und (D) die Dauer der pro 120 min Stresstest aufgezeichneten Trigemini. (E) Anzahl des aufgetretenen Ventrikulären Tachykardien (VT) und (F) Dauer der ventrikulären Tachykardien (VT) in 120 min.

(n = 11, \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05)



### Abbildung 15: Ergebnisse der Arrhythmieauswertung für die Stresstestvalidierung Teil II

Vergleichend dargestellt ist die Anzahl der jeweiligen Arrhythmieform während der ersten 120 min der 4 verschiedenen Stresstestmethoden. Auch hier wurden alle 11 Mäuse den Genotypen C57BL/6J jedem Stresstest unterzogen. (A) Gesamtanzahl aller Events während der jeweiligen Stressmethode. (B) Anzahl aller ventrikulären Extrasystolen (VES). (C) Anzahl aller Couplets und (D) Anzahl aller Triplets.

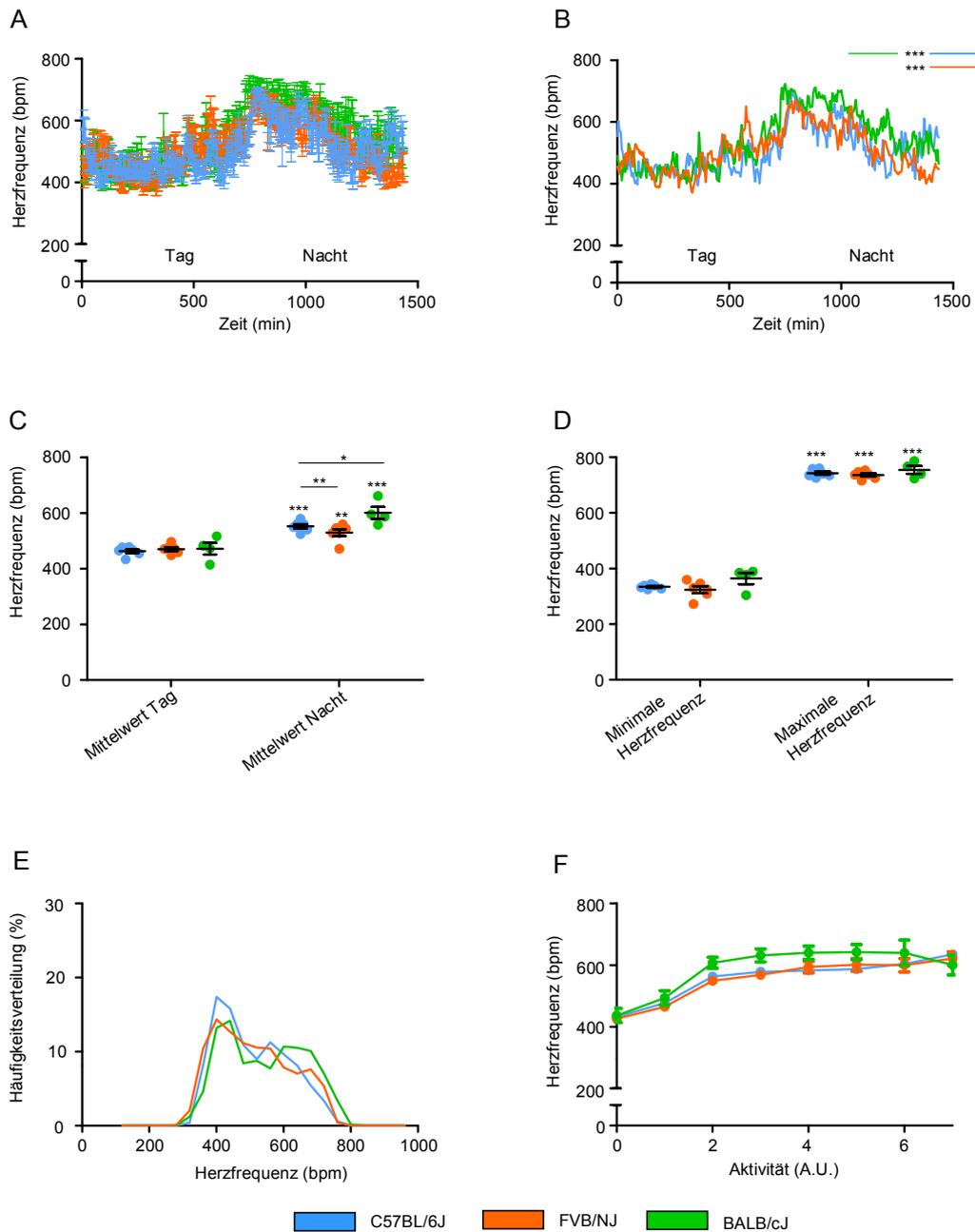
(n = 11, \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05)

## 3.2 Anwendung der validierten Stresstestmethode an 3 Mauslinien

### 3.2.1 Ergebnisse der 24 h Baselinemessungen

#### 3.2.1.1 Herzfrequenz der 24 h Baselinemessung

Die Auswertungen der Herzfrequenzverläufe während der Baselinemessungen sind in Abbildung 16 dargestellt. Bei allen 3 Linien zeigte die Herzfrequenz zwischen Tag und Nacht einen deutlichen Unterschied. Während des Tages lag die Frequenz bei 400 bis 500 bpm während in der Nacht ein deutlicher Frequenzanstieg auf 600 bis 700 bpm zu beobachten war. Beim Übergang von Nacht zu Tag sank die Frequenz wieder ab. Während der gesamten Aufzeichnung zeigten sich zum Teil ausgeprägte Schwankungen. BALB/cJ zeigte während der gesamten 24 h eine höhere Herzfrequenz, welches sich in der statischen Auswertung mit einem signifikanten Unterschied von  $p < 0,001$  zu den anderen 3 Linien widerspiegelte. Der Vergleich der mittleren Herzfrequenz von Tag und Nacht in C zeigte einen signifikanten nächtlichen Frequenzanstieg bei allen Linien. Der Vergleich zwischen den Linien zeigte dabei einen signifikanten Unterschied zwischen BALB/cJ und den anderen 2 Linien für den nächtlichen Mittelwert. Bild D verdeutlicht die minimale und maximale Herzfrequenz für den Gesamtzeitraum. Zu sehen ist eine signifikante Differenz zwischen Tag und Nacht, welche bereits in A und B erkennbar war. Die Tiere zeigten eine minimale Herzfrequenz von ungefähr 360 bpm tagsüber und einen Maximalwert von 750 bis 800 bpm nachts. Die in E dargestellte Häufigkeitsverteilung zeigt, dass die Verteilung der Herzfrequenz bei allen Linien ähnlich ausfiel und die Mäuse über die meiste Zeit eine Frequenz von 400 bpm aufwiesen. Frequenzen unterhalb von 200 bpm und oberhalb von 800 bpm wurden bei keiner Linie verzeichnet. In F ist die Normierung der Aktivität auf die Herzfrequenz zu sehen. Hier zeigte sich zunächst bei allen Linien die zunehmende Steigerung der Herzfrequenz bei gleichzeitig steigender Aktivität. Es fiel auf, dass BALB/cJ über den gesamten Kurvenverlauf oberhalb des Niveaus der anderen Tiere verlief. FVB/NJ und C57BL/6J zeigten einen fast identischen Kurvenverlauf.



**Abbildung 16: Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung für die 24 h Baselinemessung**

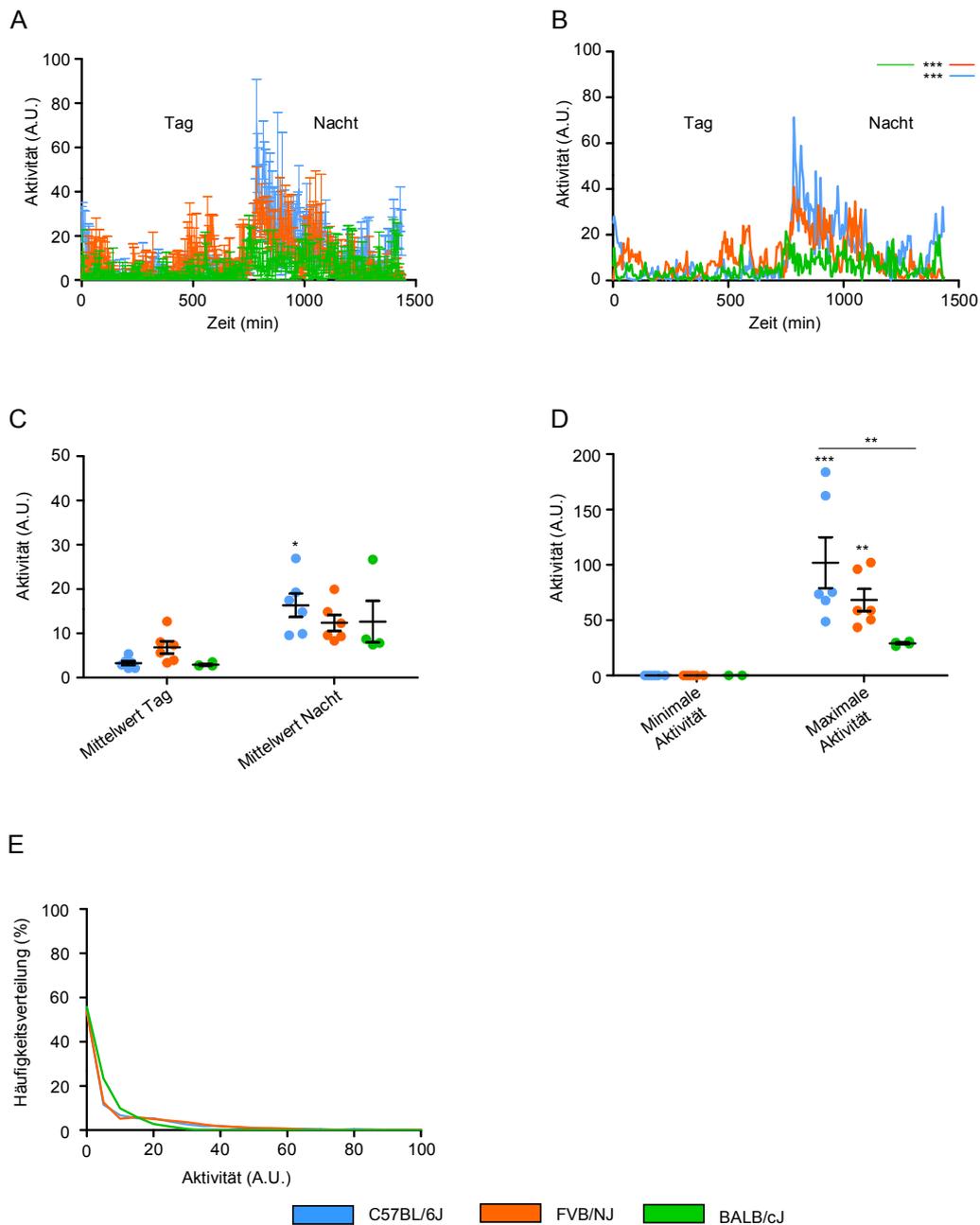
Vergleichend dargestellt ist die Auswertung der Herzfrequenz während einer 24 h Aufzeichnung der Baseline zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Herzfrequenzverlauf über 24 h mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (B) ohne den Standardfehler. (C) Vergleich der Mittelwerte zwischen den Linien für die Messung am Tag und in der Nacht. (D) Vergleich der Maximalwerte bzw. Minimalwerte zwischen den Linien während der 24 h Messung. (E) Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Prozent für die Herzfrequenz während der 24 h Messung. (F) Vergleich der aktivitätsnormierten Herzfrequenz zwischen den Linien während der 24 h Messung.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*) p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05)

### 3.2.1.2 Aktivität der 24 h Baselinemessung

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der 24 h Baselinemessung der Aktivität aller 3 Linien im Vergleich. Tagsüber zeigten alle Linien eine, mit wenigen Ausnahmen, geringe Aktivität. Das Aktivitätsniveau der Mäuse bewegte sich im Bereich zwischen 0 und maximal 20 A.U. Erkennbar ist in A und B ein deutlicher Unterschied der nächtlichen Aktivität zwischen den Linien. Während die Aktivität der BALB/cJ Mäuse in nur geringem Maße anstieg, verbleibt die Aktivität von FVB/NJ und C57BL/6J bei 40 bis 60 A.U. zwischen diesen beiden Extremen. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen BALB/cJ und den anderen Linien.

Vergleicht man die in C dargestellte mittlere Aktivität bei Tag und Nacht, so zeigte sich bei allen Linien die bereits in B beschriebene nächtliche Aktivitätssteigerung. Bei C57BL/6J war dieser Anstieg statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Auch der in D dargestellte Vergleich der minimalen und maximalen Aktivität während der gesamten Aufzeichnung verdeutlicht die Unterschiede zwischen Tag und Nacht bei den Mäusen. Alle Linien zeigten eine Aktivität von 0 A.U. während des Schlafes. Mit Ausnahme der BALB/cJ Tiere zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der minimalen und maximalen Aktivität bei sowohl bei C57BL/6J mit  $p < 0,001$  als auch bei FVB/NJ mit  $p < 0,01$ . Der Vergleich der maximalen Aktivität zeigte einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,01$  zwischen den Linien C57BL/6J und BALB/cJ. Hier zeigt sich auch, wie bereits in A und B zu erkennen war, dass die BALB/cJ Mäuse die geringste Aktivitätssteigerung zeigten. Die in E dargestellte Häufigkeitsverteilung der Aktivität verdeutlicht, dass alle 3 Linien die meiste Zeit der 24 h eine nur geringe Aktivität zwischen 0 und 20 A.U. aufwiesen und nur äußerst selten hohe Aktivitätsbereiche oberhalb von 40 A.U. zeigten.



### Abbildung 17: Ergebnisse der Aktivitätsauswertung für die 24 h Baselinemessung

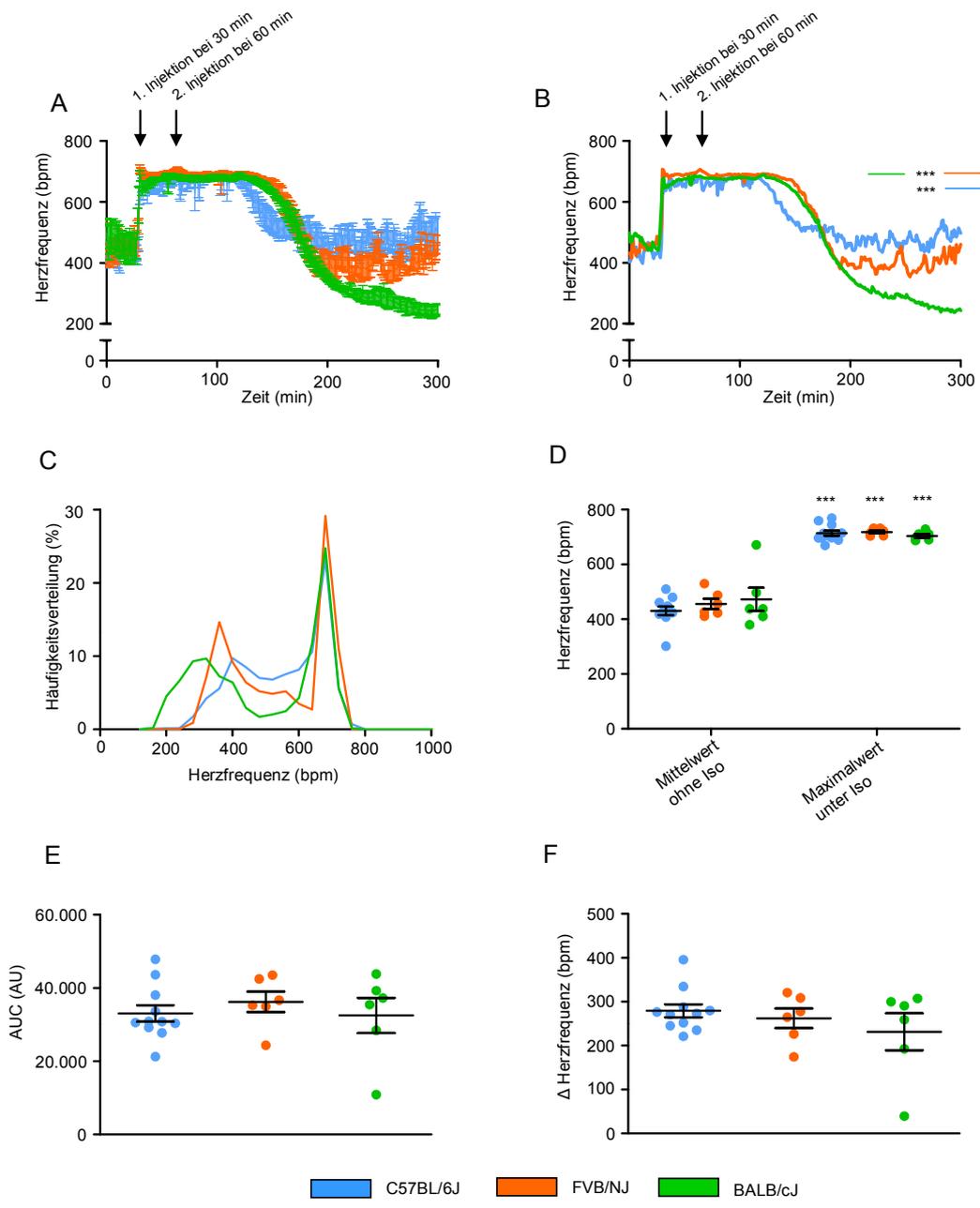
Vergleichend dargestellt ist die Auswertung der Aktivität während einer 24 h Aufzeichnung der Baseline zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Aktivitätsverlauf über 24 h mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (B) ohne den Standardfehler. (C) Vergleich der Mittelwerte zwischen den Linien für die Messung am Tag und in der Nacht. (D) Vergleich der Maximalwerte bzw. Minimalwerte zwischen den Linien während der 24 h Messung. (E) Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Prozent für die Aktivität während der 24 h Messung.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ )

### 3.2.2 Ergebnisse des Stresstests mit Isoproteronol

#### 3.2.2.1 Herzfrequenz während des Stresstests mit Isoproteronol

Die in Bild A und B der Abbildung 18 gezeigten Herzfrequenzverläufe waren zu Beginn des Stresstestes für alle Linien sehr ähnlich. So zeigte sich für die Baseline der ersten 30 min kein signifikanter Unterschied, ebenso wie für den Anstieg der Herzfrequenz nach der ersten Injektion von Isoproteronol. Bis 100 min entwickeln alle Linien ein stabiles Plateau bei einer Herzfrequenz von 700 bis 750 bpm. Ab dem Zeitpunkt 100 min begann die Frequenz der Linie C57BL/6J zu sinken, während FVB/NJ und BALB/cJ das Plateau noch etwas länger aufrecht hielten. Spätestens zum Zeitpunkt 180 min hatten alle Tiere wieder die Ruhefrequenz von 400 bis 500 bpm erreicht. Die Herzfrequenz der BALB/cJ Mäuse sank jedoch unter den Ausgangswert ab und verblieben zum Ende der Aufzeichnung bei einer Herzfrequenz von 250 bpm. In der Statistik zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$  zwischen den BALB/cJ Mäusen und den anderen 2 Linien. Die in C abgebildete Häufigkeitsverteilung der Frequenzbereiche spiegelt den in A und B gezeigten Verlauf wider. Alle 3 Linien zeigten in unterschiedlicher Ausprägung zwei Anstiege der Häufigkeitsverteilung und zwar in dem Bereich von 400 und 700 bpm. Das Maximum von 700 bpm wurde zum Zeitpunkt der Injektionen sowie während der nachfolgenden Plateauphase erreicht. Das geringere Maximum bei 400 bpm gab die Ruhefrequenz vor und nach dem Stresstest wider. Die in B gezeigte geringere Herzfrequenz der BALB/cJ Tiere am Ende der Aufzeichnung, spiegelt sich in dem geringer ausgeprägtem zweiten Maximum in einem Frequenzbereich von 300 bpm wider. Wie bereits in A und B zu erkennen, zeigte sich in D für den Vergleich der mittleren Frequenz der ersten 30 min und der unter Isoproteronol erreichten Maximalwerte eine hohe Signifikanz für den Frequenzanstieg innerhalb einer Gruppe, jedoch kein Unterschied zwischen den Gruppen für den Mittel- oder Maximalwert. Ebenso zeigte sich kein Unterschied für das in F gezeigte Delta der Herzfrequenz, welches den Frequenzanstieg zwischen dem in D gezeigten Mittel- und Maximalwert verdeutlicht. Die in E dargestellte Fläche unterhalb der Kurve zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Linien. Die Berechnung erfolgte anhand einer Nulllinie, welche durch einen Mittelwert der ersten 25 min bis 200 min des Stresstests definiert wurde. Ersichtlich wird aus der Darstellung eine für die Linien C57BL/6J und BALB/cJ deutliche Streubreite der Einzelwerte.



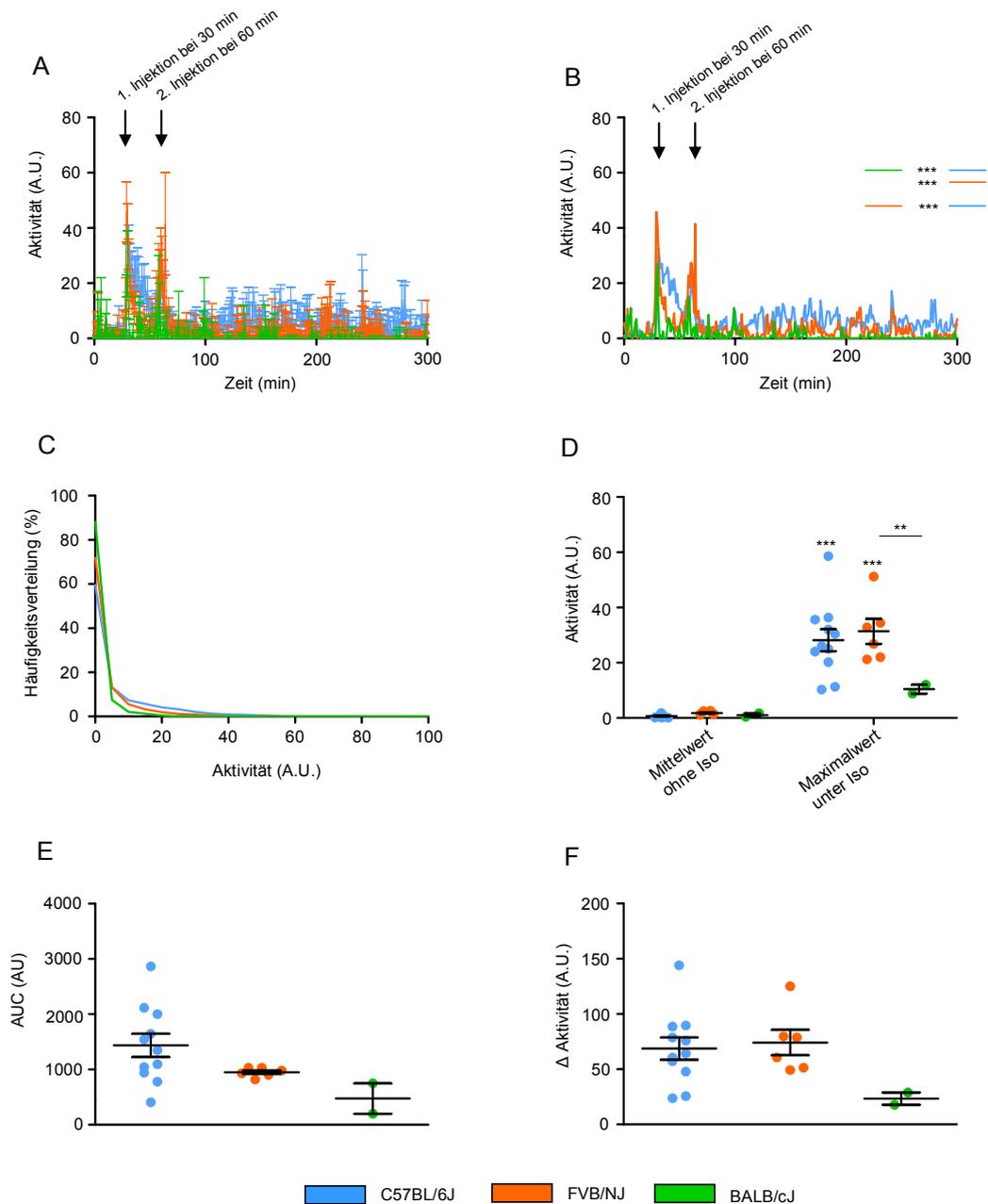
**Abbildung 18: Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung während des Stresstestes mit Isoproterenol**

Vergleichend dargestellt ist die Auswertung der Herzfrequenz während des 300 min andauernden Stresstestes mit Isoproterenol zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Herzfrequenzverlauf während des Stresstestes mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (B) ohne den Standardfehler. (C) Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Prozent für die Herzfrequenz während der Stresstestes. (D) Vergleich der Mittelwerte ohne Isoproterenol und unter Isoproterenol zwischen den Linien. (E) Vergleich der Area under the curve (AUC) während des Stresstestes. (F) Vergleich des Herzfrequenzanstieges durch Isoproterenol.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*) p < 0.001, (\*\*) p < 0.01, (\*) p < 0.05)

### 3.2.2.2 Aktivität während des Stresstests mit Isoproterenol

Die Auswertung der Aktivität in Abbildung 19 zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Linien. In A und B ist zu sehen, dass zwar alle Linien während der Injektionen wesentlich aktiver waren, jedoch C57BL/6J und FVB/NJ mehr Aktivität zeigten als BALB/cJ. Dies zeigte sich auch bei der Betrachtung des gesamten Versuchszeitraumes. Das Aktivitätsniveau deckte sich mit dem Verhalten der Tiere. Vor allem die FVB/NJ Tiere zeigten sich sehr viel aggressiver und wehrhafter im Umgang als die BALB/cJ Mäuse. Die Statistik zeigte signifikante Unterschiede zwischen BALB/cJ und C57BL/6J bzw. FVB/NJ, sowie zwischen FVB/NJ und C57BL/6J. Das in C dargestellte Histogramm spiegelt den Verlauf der Aktivität während des Stresstestes wieder. Die höheren Aktivitätsbereiche von 20 bis 40 A.U. wurden nur für einen kurzen Zeitraum während der Injektionen erreicht. Alle Tiere hielten sich die meiste Zeit des Stresstests bei einem Aktivitätsbereich zwischen 0 und 10 A.U. auf. Mit Ausnahme von BALB/cJ zeigten sich bei allen Linien nur geringe Unterschiede in der Verteilung der Aktivität. BALB/cJ zeigte in dieser Darstellung eine insgesamt deutlich geringere Aktivität während des gesamten Versuchszeitraumes. Die Auswertung der mittleren Aktivität der ersten 25 min und der maximalen Aktivität während des Versuches in D zeigte einige signifikante Unterschiede zwischen den Linien. Während der Baseline zeigten alle Tiere eine geringe Aktivität, welche keinen Unterschied zwischen den Linien aufwies. Der Unterschied zwischen Mittel- und Maximalwerten zeigte sich für die Linien C57BL/6J und FVB/NJ hoch signifikant ( $p < 0,001$ ), wohingegen die maximale Aktivität für BALB/cJ nicht unterschiedlich war. C57BL/6J und FVB/NJ zeigten eine deutlich höhere maximale Aktivität während des Stresstestes als BALB/cJ. Die große Differenz zwischen den Linien in Bezug auf die maximale Aktivität erwies sich im Vergleich zwischen FVB/NJ und BALB/cJ als statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). Ein Vergleich der Differenz zwischen Mittel- und Maximalwerten, in F dargestellt, zeigte sich nicht signifikant. Weiterhin wurde eine große Streubreite der einzelnen Tiere ersichtlich. Ebenso zeigte der in E dargestellte Vergleich der Fläche unterhalb der Kurve zwischen den Linien keinen statistisch signifikanten Unterschied. Der Genotyp C57BL/6J wies wie zuvor in D eine große Streubreite der Einzelwerte auf.



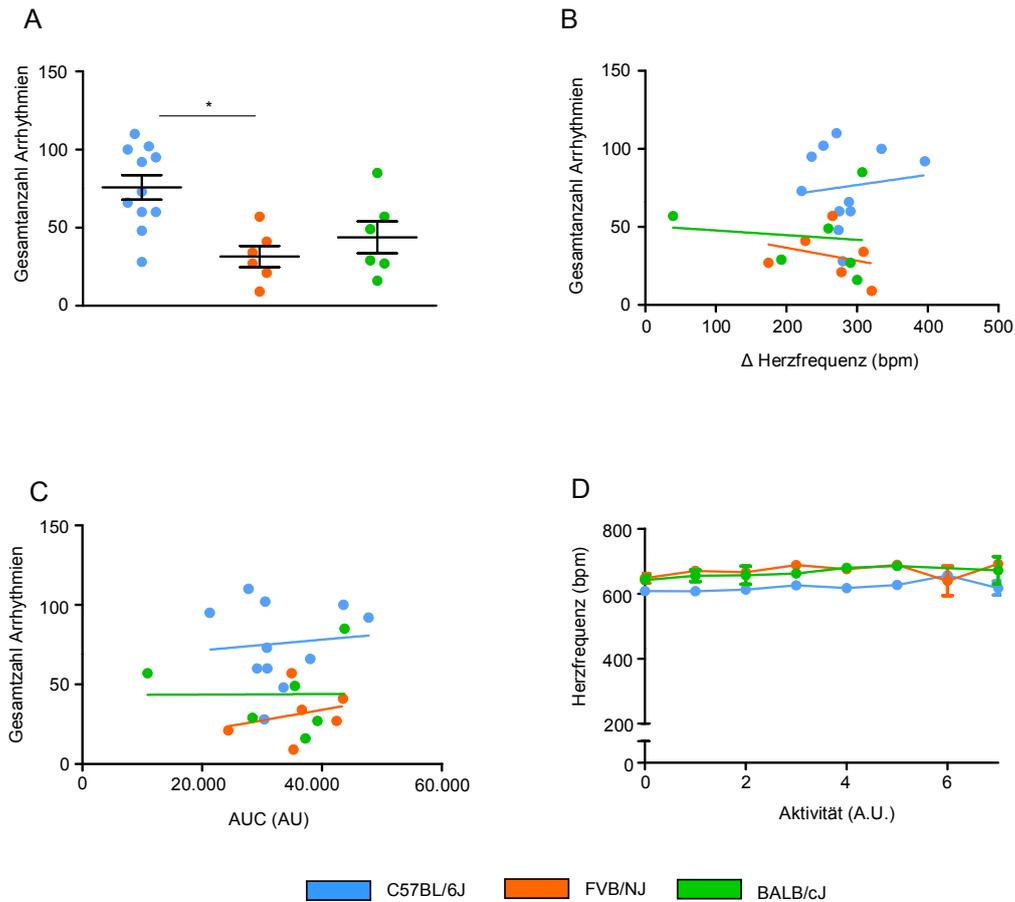
**Abbildung 19: Ergebnisse der Aktivitätsauswertung während des Stresstestes mit Isoproterenol**

Vergleichend dargestellt ist die Auswertung der Aktivität während des 300 min andauernden Stresstestes mit Isoproterenol zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Aktivitätsverlauf während des Stresstestes mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (B) ohne den Standardfehler. (C) Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Prozent für die Aktivität während der Stresstestes. (D) Vergleich der Mittelwerte ohne Isoproterenol und unter Isoproterenol zwischen den Linien. (E) Vergleich der Area under the curve (AUC) während des Stresstestes. (F) Vergleich des Aktivitätsanstiegs durch Isoproterenol.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 2 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ )

### 3.2.2.3 Arrhythmien während des Stresstests mit Isoproterenol

Die Ergebnisse der Arrhythmieauswertung sind in Abbildung 20 dargestellt. Die C57BL/6J Mäuse entwickelten unter Isoproterenol die meisten Arrhythmien, gefolgt von BALB/cJ und FVB/NJ. Die Differenz war zwischen C57BL/6J und FVB/NJ signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). Allen 3 Linien zeigte eine recht große Streuung für die Arrhythmiezahl der einzelnen Tiere. Dies galt vor allem für C57BL/6J. In B ist zu sehen, dass es keine Korrelation zwischen der Anzahl der Arrhythmien und dem Anstieg der Herzfrequenz während des Stresstestes gab. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die Anzahl der Arrhythmien unabhängig von dem Herzfrequenzanstieg ist. Auch der Herzfrequenzverlauf nahm, wie aus C ersichtlich wird, keinen Einfluss auf die Anzahl der Arrhythmien. Die in D gezeigte Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität der Mäuse zeigt, dass die Linien FVB/NJ und BALB/cJ in den Aktivitätsbereichen von 2 bis 5 A.U. einen annähernd gleichen Verlauf aufwiesen. Im Bereich von 0 bis 2 A.U. befanden sich FVB/NJ und BALB/cJ auf einem um ca. 50 bpm höheren Frequenzniveau als C57BL/6J. Insgesamt zeigten die C57BL/6J Mäuse eine geringere Herzfrequenz bei gleicher Aktivität. Bei einer Aktivität von 6 A.U. befanden sich alle 3 Linien auf demselben Niveau. Diese Darstellung verdeutlicht, dass vor allem der Genotyp C57BL/6J bei gleichem Aktivitätsniveau eine geringere Herzfrequenz aufwies als die anderen 2 Linien.



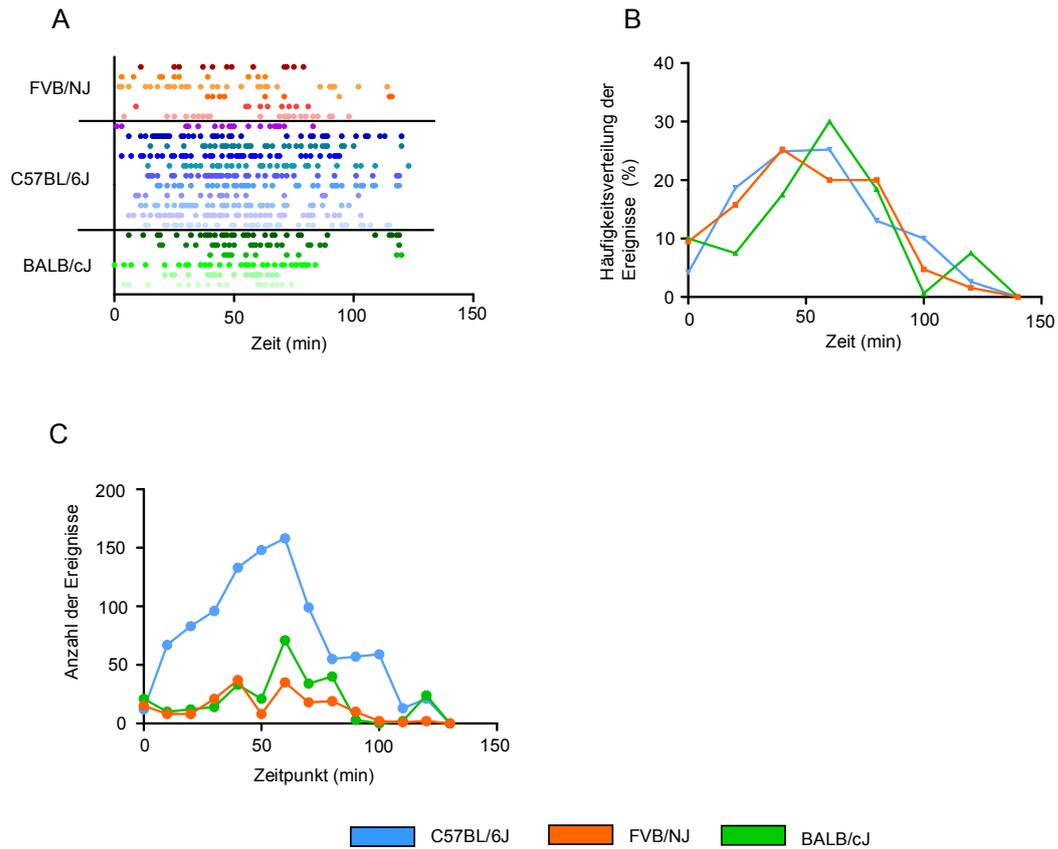
### Abbildung 20: Ergebnisse der Arrhythmieauswertung während des Stresstestes mit Isoproterenol

Vergleichend dargestellt ist die Auswertung der Arrhythmien während des 300 min andauernden Stresstestes mit Isoproterenol zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Vergleich der Gesamtzahl aller während des Stresstestes gezählten Arrhythmien. (B) Normierung der Gesamtzahl aller Arrhythmien auf den Anstieg der Herzfrequenz unter Isoproterenol. (C) Normierung der Gesamtzahl aller Arrhythmien auf die area under the curve unter Isoproterenol. (D) Aktivitätsnormierte Herzfrequenz unter Isoproterenol.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ )

#### **3.2.2.4 Zeitpunkte der Arrhythmien während des Stresstests mit Isoproterenol**

In A aus Abbildung 21 sind die genauen Zeitpunkte der einzelnen während des Stresstests gefundenen Arrhythmien aufgezeigt. Dabei war bei allen Linien zu erkennen, dass die Zahl der Arrhythmien wenige Minuten nach Beginn der Auswertung deutlich anstieg und zum Ende hin nur noch vereinzelte Arrhythmien auftraten. Dies zeigt sich in B und war bei allen Linien annähernd identisch. Vor allem C57BL/6J und FVB/NJ entwickelten die meisten Arrhythmien in den ersten 50 min der Auswertung. Die in C gezeigte Darstellung der absoluten Anzahl aller gemessenen Arrhythmien, dass C57BL/6J mit Abstand die meisten Arrhythmien entwickelte, wie es bereits in Abbildung 20 zu sehen war. Am Ende der Auswertung wurden bei allen Linien keine Arrhythmien mehr gezählt.



### Abbildung 21: Zeitpunkt der Arrhythmien während des Stresstestes unter Isoproterenol

Vergleichend dargestellt ist die Auswertung Zeitpunkt zu denen die Arrhythmien während Stresstestes mit Isoproterenol auftraten zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Darstellung der einzelnen Ereignisse für jedes Tier einer Linie während des Auswertungszeitraumes von 150 min, beginnend mit der 2. Injektion von Isoproterenol. (B) Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Prozent während des Auswertungszeitraumes. (C) Darstellung der absoluten Anzahl der Ereignisse während des Auswertungszeitraumes.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6.

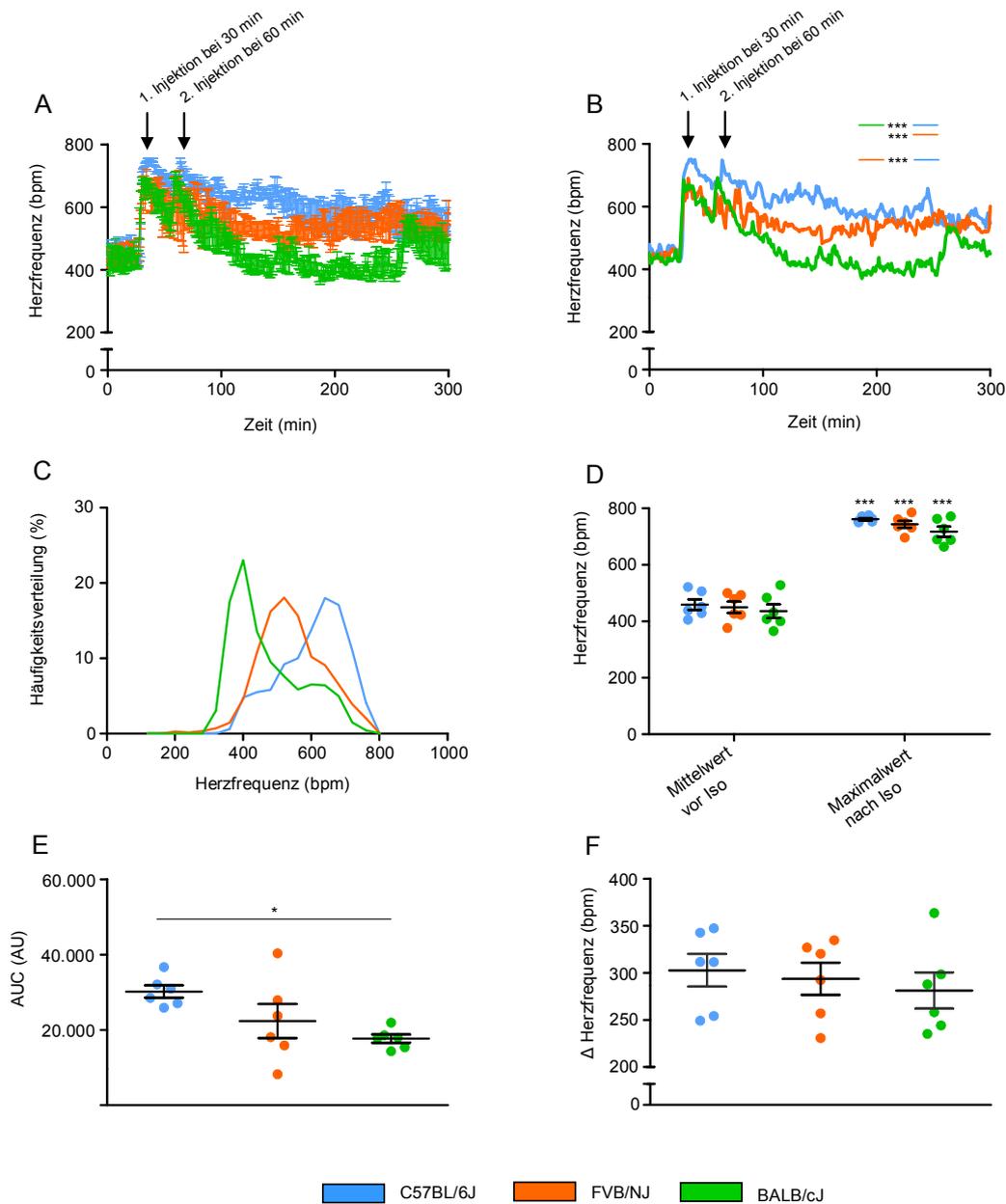
### 3.2.3 Ergebnisse des Stresstestes mit NaCl

Die Auswertung des Stresstestes unter der Verwendung von NaCl als Placebo erfolgte analog zu dem unter Isoproterenol, dargestellt in den Abbildungen 22 bis 24.

#### 3.2.3.1 Herzfrequenz während des Stresstests mit NaCl

In A und B in Abbildung 22 sind die Herzfrequenzverläufe aller Linien während des Placebo-Versuches vergleichend dargestellt. Während der ersten 30 min zeigten C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ ähnliche Verläufe. Nach der ersten Injektion mit NaCl waren deutliche Unterschiede erkennbar. Alle Tiere zeigten einen ungefähren Frequenzanstieg von 450 auf 700 bpm, wobei jedoch C57BL/6J während beider Injektionen um bis zu 50 bpm über den anderen Linien lag. Zwischen der ersten und zweiten Injektion fiel die Frequenz um bis zu 150 bpm auf ca. 600 bpm ab. Ausgenommen C57BL/6J, diese Linie zeigte eine nur geringe Frequenzreduktion um ca. 75 bpm. Die zweite Injektion bewirkte bei allen Linien außer C57BL/6J einen etwas geringeren Frequenzanstieg im Vergleich zur ersten Injektion. Insgesamt lag die Frequenz der C57BL/6J Tiere mit Ausnahme der letzten 50 min dauerhaft oberhalb der anderen 2 Linien. Es folgten die FVB/NJ Tiere, während der Verlauf von BALB/cJ deutlich niedriger war. Bei BALB/cJ war der Frequenzabfall nach der zweiten Injektion am stärksten ausgeprägt, diese Linie erreichte nach 120 min wieder ihren Ausgangswert von ungefähr 450 bpm. Wohingegen C57BL/6J und FVB/NJ während der 300 min Aufzeichnung nicht mehr zum Ausgangswert zurückkehrten. Die FVB/NJ Mäuse erreichten ab dem Zeitpunkt 120 min ein Plateau bei einer Frequenz von 550 bpm. C57BL/6J lag zwischen 100 und 200 min um bis zu 100 bpm oberhalb von FVB/NJ und um 250 bpm oberhalb von BALB/cJ. Die statistische Auswertung zeigte eine hohe Signifikanz von  $p < 0,001$  zwischen BALB/cJ gegen C57BL/6J und FVB/NJ, sowie FVB/NJ gegen C57BL/6J. Zu beachten ist, dass sämtliche Werte eine große Streuung aufwiesen, welches in A gut zu sehen ist. Die Beobachtung deckte sich mit der in Bild C gezeigten Häufigkeitsverteilung. Sowohl C57BL/6J als auch FVB/NJ zeigten eine höhere Aufenthaltswahrscheinlichkeit bei Werten zwischen 600 und 800 bpm. Besonders die C57BL/6J Tiere hielten sich mit einer Häufigkeit von 20 % bei einer Frequenz von 700 bpm auf. Ähnliche Werte zeigte FVB/NJ bei Frequenzen von 650 bpm, wohingegen BALB/cJ sich mit 19 % am häufigsten bei Frequenzen im Bereich von 400 bpm aufhielt. Aus D wird ersichtlich, dass der Frequenzanstieg auf die Maximalwerte bei allen Linien mit  $p < 0,001$  hoch signifikant war. Der Vergleich der Maximalwerte zwischen den Linien zeigte sich ebenso wie die Mittelwerte nicht signifikant, es wird jedoch ersichtlich, dass die BALB/cJ

Tiere einen etwas geringeren Maximalwert aufwiesen im Vergleich zu den anderen 2 Linien. Das in F gezeigte Delta der Herzfrequenz zwischen den in D gezeigten Mittel- und Maximalwerten war in Vergleich der Linien nicht signifikant. Die in Bild E dargestellte Fläche unterhalb der Kurve zeigte einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,05$  zwischen C57BL/6J und BALB/cJ. In dieser Abbildung zeigte sich erneut, dass die Herzfrequenz von C57BL/6J deutlich oberhalb der anderen Linien verlief, vor allem bei FVB/NJ war auch eine größere Streubreite der Einzelwerte erkennbar.



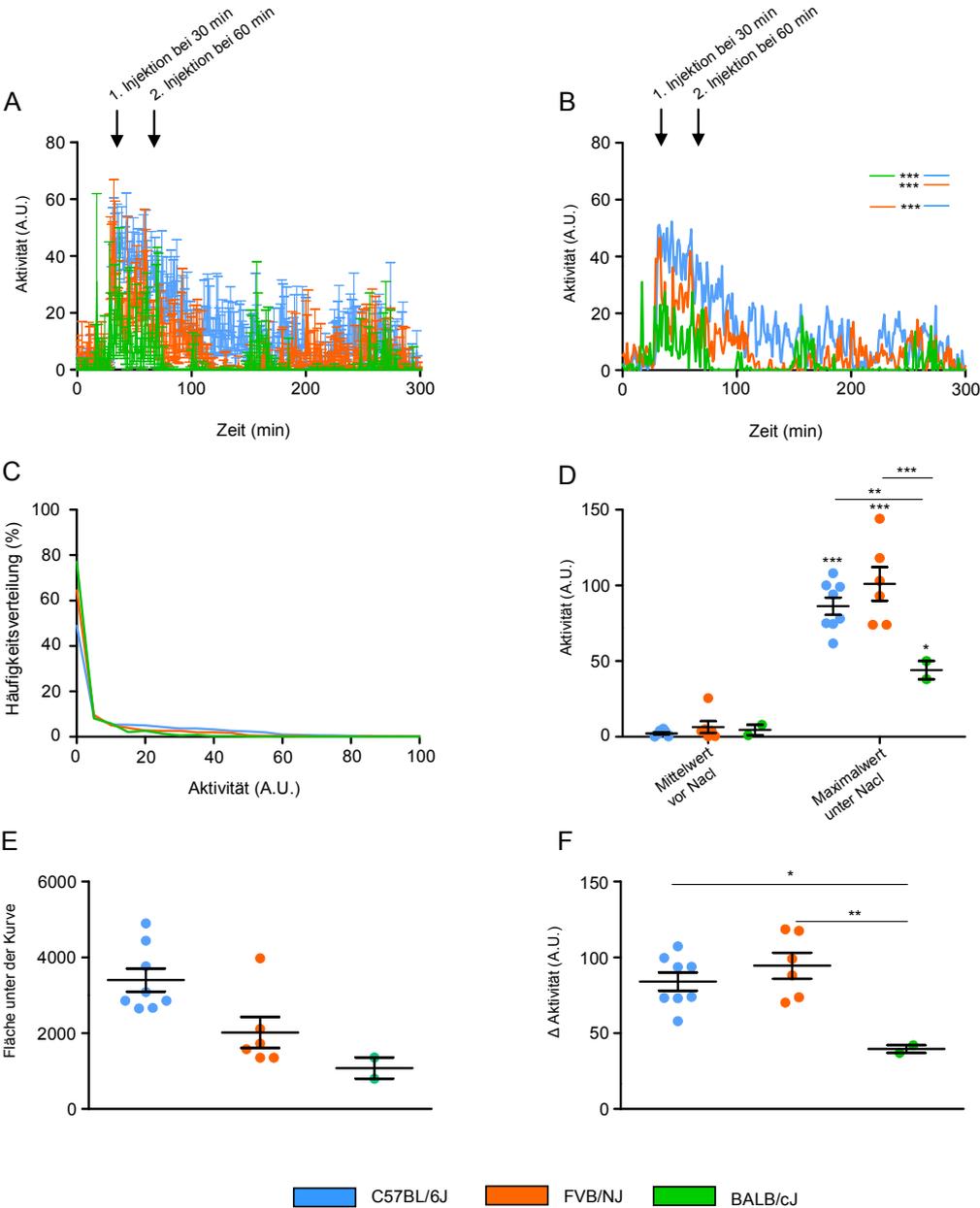
**Abbildung 22: Ergebnisse der Herzfrequenzbewertung während des Stresstestes mit NaCl**

Vergleichend dargestellt ist die Auswertung der Herzfrequenz während des 300 min andauernden Stresstestes mit NaCl zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Herzfrequenzverlauf während des Stresstestes mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (B) ohne den Standardfehler. (C) Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Prozent für die Herzfrequenz während der Stresstestes. (D) Vergleich der Mittelwerte ohne NaCl und unter NaCl zwischen den Linien. (E) Vergleich der Area under the curve (AUC) während des Stresstestes. (F) Vergleich des Herzfrequenzanstieges durch NaCl.

C57BL/6J n = 6, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*) p < 0.001, (\*\*) p < 0.01, (\*) p < 0.05)

### 3.2.3.2 Aktivität während des Stresstests mit NaCl

In Bild A und B in Abbildung 23 zeigte sich ein Unterschied zwischen den Linien während des Stresstests. Bereits zu Beginn starteten die Tiere von einem unterschiedlichen Aktivitätszustand in Ruhe. Durch die erste Injektion mit NaCl stieg die Aktivität bei allen Linien an. C57BL/6J und FVB/NJ zeigten jedoch einen wesentlich größeren Anstieg als BALB/cJ. C57BL/6J zeigte eine maximale Aktivität von 50 A.U. und FVB/NJ von ca. 45 A.U., wohingegen BALB/cJ maximal 30 A.U. erreichte. Die zweite Injektion wirkte sich weniger stark auf die Aktivität der Tiere aus. Zwischen beiden Injektionen sank bei allen Tieren die Aktivität kurzzeitig ab. Nach der zweiten Injektion fiel die Aktivität von FVB/NJ wieder auf die Ausgangswerte der ersten 30 min ab und BALB/cJ zeigte zwischenzeitlich sogar keinerlei Aktivität mehr. Die C57BL/6J Tiere verblieben für den Rest des Versuches oberhalb des Aktivitätslevels der anderen Linien. Ab dem Zeitpunkt 150 min schwankte die Aktivität aller Linien, erreichte jedoch zu keinem Zeitpunkt Werte oberhalb von 20 A.U. Die Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Aktivität zeigte, dass sich die Tiere die meiste Zeit zwischen einer Aktivität von 0 bis 20 A.U. aufhielten. Je höher das Aktivitätsniveau wurde, desto geringer zeigte sich die prozentuale Häufigkeit, mit der sich die Tiere in diesen Bereichen aufhielten. Gering erhöht gegenüber den anderen Linien zeigte sich die Aktivität von C57BL/6J, vor allem im Bereich von 20 bis 60 A.U., welches für eine vermehrte körperliche Aktivität der Tiere spricht. Die in A und B beschriebenen Beobachtungen zeigten sich auch in der Auswertung der Mittel- und Maximalwerte in Bild C, sowie deren Differenz, in Bild F zu sehen. Mit Ausnahme der BALB/cJ Mäuse zeigte sich der Anstieg zwischen Mittel- und Maximalwert hoch signifikant mit  $p < 0,001$  für FVB/NJ und C57BL/6J. C57BL/6J und FVB/NJ zeigten dabei ein wesentlich höheres Maximum als BALB/cJ. Der Aktivitätsanstieg von Mittel- zum Maximalwert zeigte sich für BALB/cJ einfach signifikant ( $p < 0,05$ ). Die sichtbaren Unterschiede zeigten sich auch statistisch signifikant: So wies der Vergleich zwischen C57BL/6J und BALB/cJ eine Signifikanz von  $p < 0,01$  und der Vergleich von FVB/NJ mit BALB/cJ eine Signifikanz von  $p < 0,001$  auf. Ebenfalls signifikant zeigte sich der Vergleich zwischen den Linien bezüglich des Deltas der Aktivität, in F dargestellt. Durch die Injektion von NaCl wurde bei C57BL/6J im Mittel eine Aktivitätssteigerung von 80 A.U. erreicht, bei FVB/NJ um mehr als 90 A.U. BALB/cJ blieb unterhalb von 50 A.U. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,01$  zwischen FVB/NJ und BALB/cJ. Die Differenz zwischen C57BL/6J und BALB/cJ ist mit  $p < 0,05$  signifikant. Die Auswertung der Fläche unterhalb der Kurve, in E zu sehen, wiederum zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Linien.



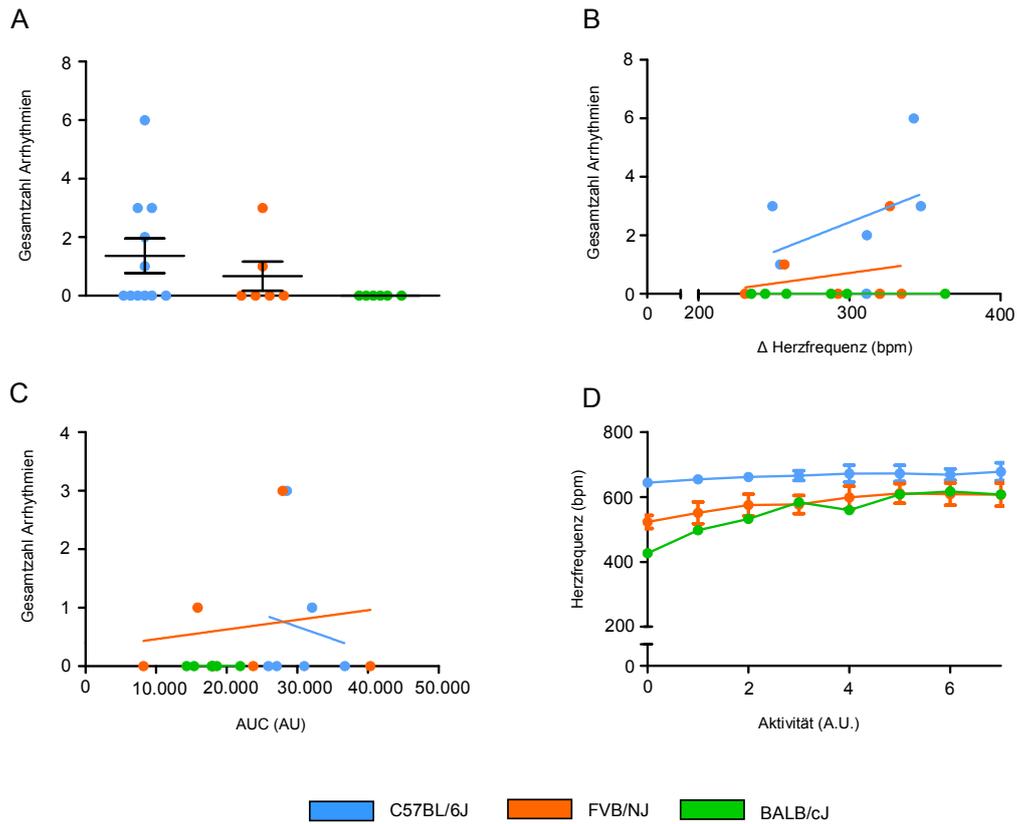
**Abbildung 23: Ergebnisse der Aktivitätsauswertung während des Stresstestes mit NaCl**

Vergleichend dargestellt ist die Auswertung der Aktivität während des 300 min andauernden Stresstestes mit NaCl zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Aktivitätsverlauf während des Stresstestes mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (B) ohne den Standardfehler. (C) Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Prozent für die Aktivität während der Stresstestes. (D) Vergleich der Mittelwerte ohne NaCl und unter NaCl zwischen den Linien. (E) Vergleich der Area under the curve (AUC) während des Stresstestes. (F) Vergleich des Aktivitätsanstieges durch NaCl.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ )

### 3.2.3.3 Arrhythmien während des Stresstests mit NaCl

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Arrhythmieauswertung dargestellt. In A ist zu sehen, dass der Placeboversuch bei BALB/cJ keine Arrhythmien auslöste. C57BL/6J zeigte in der Auswertung eine große Streuung der Werte. Auch bei den FVB/NJ Tieren zeigten sich kaum bis gar keine Arrhythmien. Die Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität, in D dargestellt, zeigt einige wesentliche Unterschiede zwischen den Linien. Die Linie C57BL/6J lag mit der Herzfrequenz dauerhaft und weit oberhalb der anderen 2 Linien. FVB/NJ startete bei 0 A.U. mit einer Herzfrequenz von 520 bpm und stieg bis auf 600 bpm während einer Aktivität von 6 A.U. an. BALB/cJ zeigte während einer Aktivität von 0 A.U. bis 3 A.U. einen steilen Anstieg der Herzfrequenz von 450 bpm auf 600 bpm.



**Abbildung 24: Ergebnisse der Arrhythmieauswertung während des Stresstestes mit NaCl**

Vergleichend dargestellt ist die Auswertung der Arrhythmien während des 300 min andauernden Stresstestes mit NaCl zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ. (A) Vergleich der Gesamtzahl aller während des Stresstestes gezählten Arrhythmien. (B) Normierung der Gesamtzahl aller Arrhythmien auf den Anstieg der Herzfrequenz unter NaCl. (C) Normierung der Gesamtzahl aller Arrhythmien auf die area under the curve unter NaCl. (D) Aktivitätsnormierte Herzfrequenz unter NaCl.

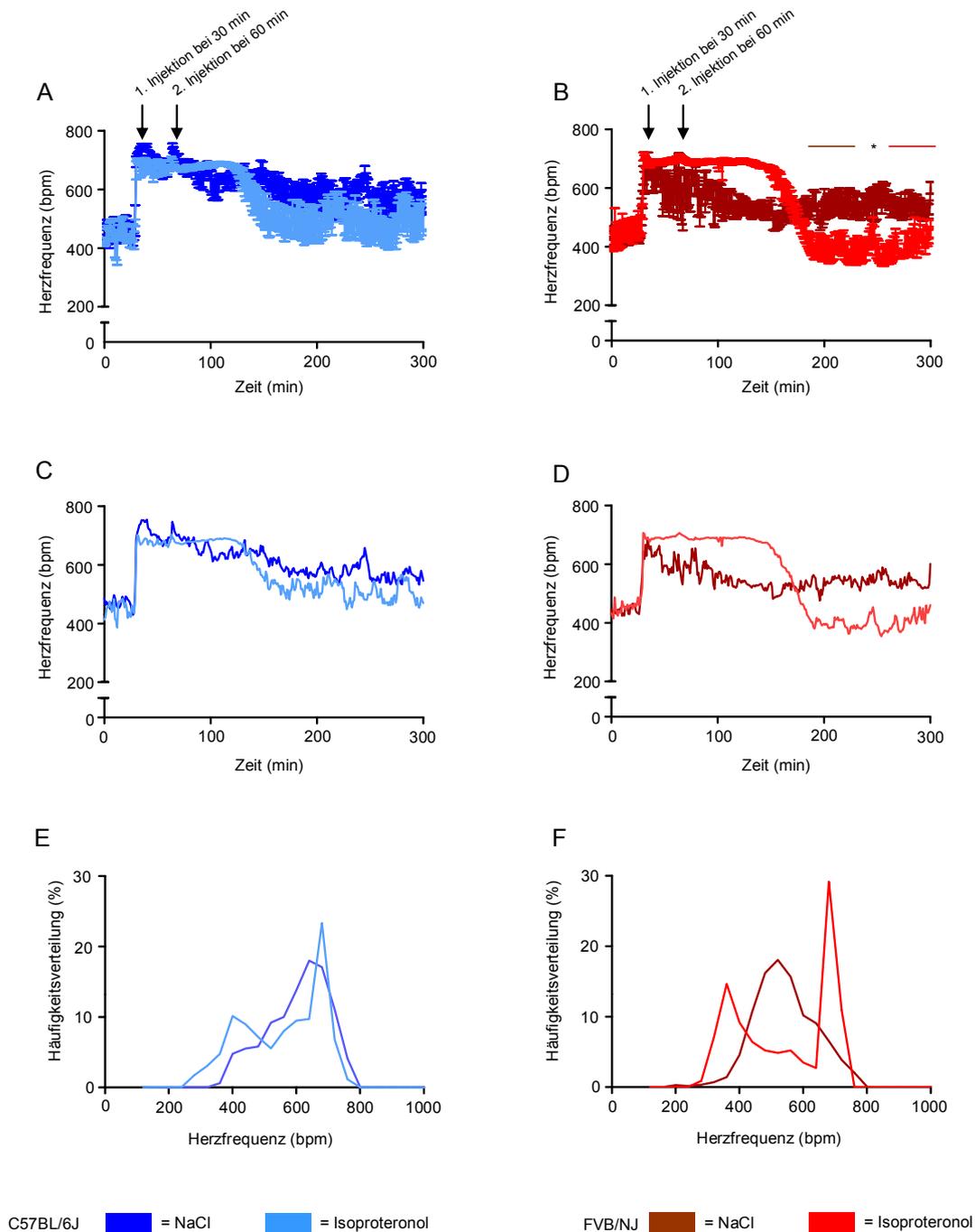
C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6.

### 3.2.4 Vergleich von Isoproteronol und NaCl während des Stresstests

Abbildung 25 und 26 zeigen den Vergleich der Herzfrequenzverläufe zwischen Isoproteronol und NaCl für jede Linie einzeln. In Abbildung 27 sind dann die Auswertungen für einzelne Parameter wie beispielsweise die mittlere und maximale Herzfrequenz zwischen Isoproteronol und NaCl zu sehen.

#### 3.2.4.1 Vergleich der Herzfrequenz von Isoproteronol und NaCl

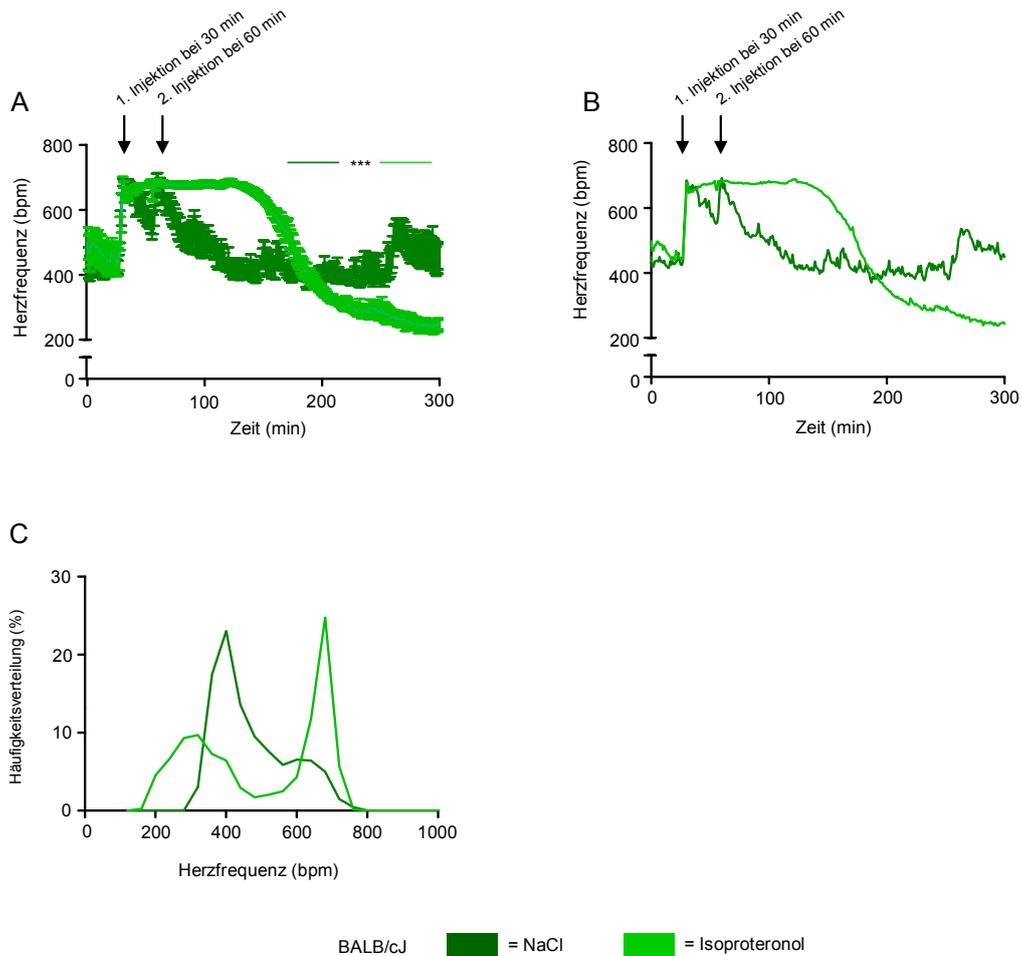
In A und C von Abbildung 25 zeigte sich bei dem Vergleich der Herzfrequenz, dass es zwischen Isoproteronol und NaCl keinen Unterschied für die Linie C57BL/6J gab. Zwar zeigte sich die Frequenz unter NaCl geringgradig höher, dies war statistisch jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu war ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  für die Linie FVB/NJ nachweisbar. In B und D zeigte sich, dass unter Isoproteronol im Anschluss an die zweite Injektion ein Plateau entsteht, welches unter NaCl nicht erkennbar war. Unter NaCl sank die Frequenz unmittelbar nach der zweiten Injektion ab. Nach ungefähr 170 min begann auch die Frequenz unter Isoproteronol zu sinken und fiel nach 200 min unter die Placebofrequenz. Ähnliche Verläufe zeigten auch die Herzfrequenzen der in Abbildung 26 dargestellten Linie BALB/cJ. Auch hier verblieb nach der zweiten Injektion mit Isoproteronol ein Plateau, wohingegen die Herzfrequenz unter NaCl schnell absank. Auch die BALB/cJ Tiere fielen nach dem Ende der Plateauphase mit ihrer Herzfrequenz unter die Placebofrequenz. In Abbildung 27 zeigte sich, dass Isoproteronol keinen nachweislichen Effekt auf die mittlere oder maximale Herzfrequenz hatte. Einzig bei C57BL/6J zeigte sich eine signifikante Reduktion der maximalen Frequenz unter Isoproteronol. Auch auf die Fläche unterhalb der Herzfrequenzkurve hatte Isoproteronol keinen Effekt. Auf die Anzahl der Arrhythmien hingegen hatte Isoproteronol einen großen Effekt. Bei allen Linien, ausgenommen BALB/cJ, zeigte sich eine statistisch signifikante Steigerung der Arrhythmiezahlen unter Isoproteronol.



### Abbildung 25: Vergleich der Herzfrequenzverläufe zwischen Isoproterenol und NaCl Teil I

Vergleichend dargestellt sind die Herzfrequenzverläufe während des Stresstestes zwischen Isoproterenol und NaCl für die Linien C57BL/6J und FVB/NJ. (A) Vergleich der Herzfrequenzverläufe für die Linie C57BL/6J unter Isoproterenol und NaCl mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (C) ohne den Standardfehler. (B) Vergleich der Herzfrequenzverläufe für die Linie FVB/NJ unter Isoproterenol und NaCl mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (D) ohne den Standardfehler. (E) und (F) zeigen die Häufigkeitsverteilung der Herzfrequenz im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl in Prozent für die Linie C57BL/6J (E) und FVB/NJ (F).

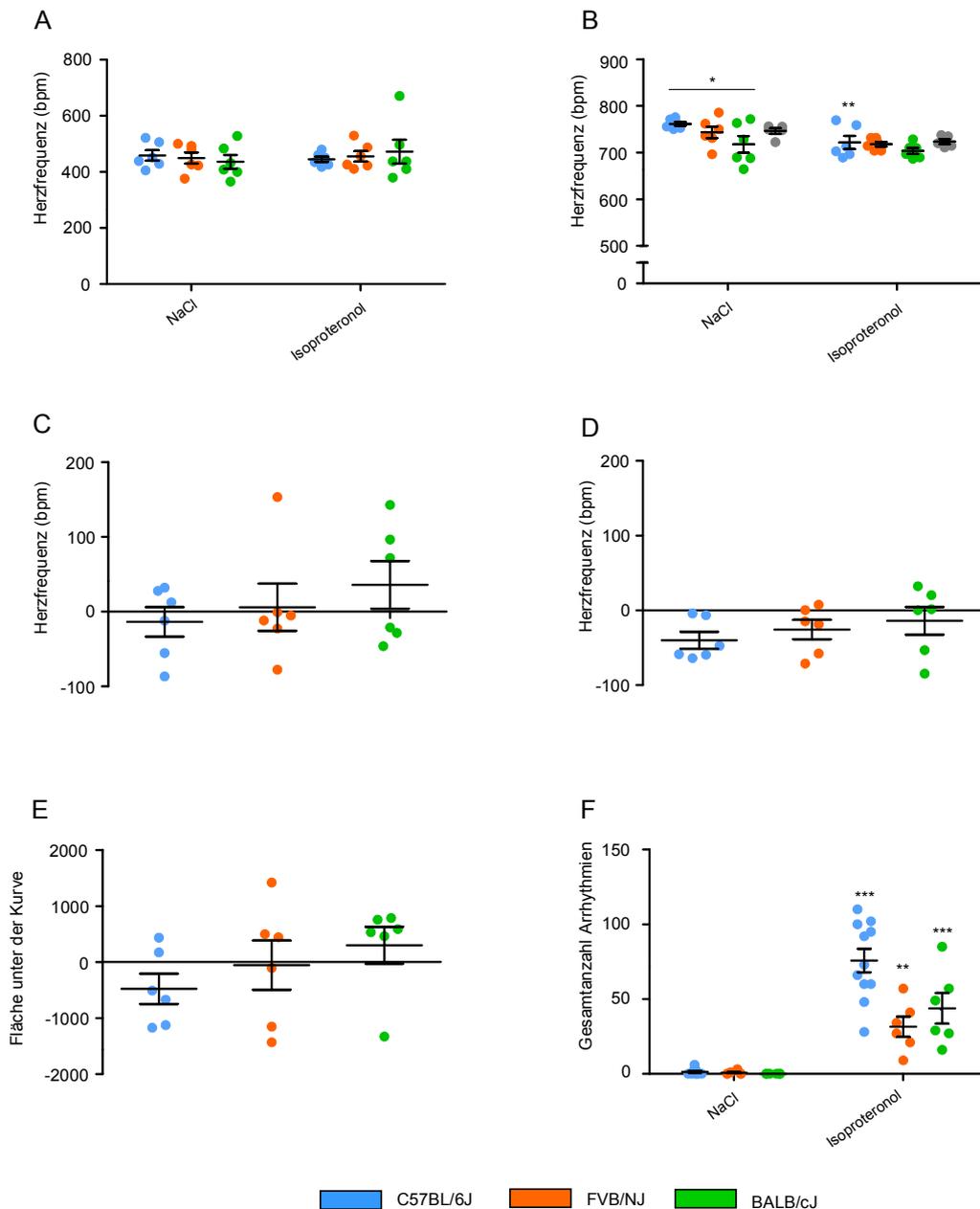
C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ )



### Abbildung 26: Vergleich der Herzfrequenzverläufe zwischen Isoproterenol und NaCl Teil II

Vergleichend dargestellt sind die Herzfrequenzverläufe während des Stresstestes zwischen Isoproterenol und NaCl für die Linie BALB/cJ. (A) Vergleich der Herzfrequenzverläufe unter Isoproterenol und NaCl mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (B) ohne den Standardfehler. (C) zeigt die Häufigkeitsverteilung der Herzfrequenz im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl in Prozent.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05)



### Abbildung 27: Einzelauswertungen der Herzfrequenz zwischen Isoproterenol und NaCl

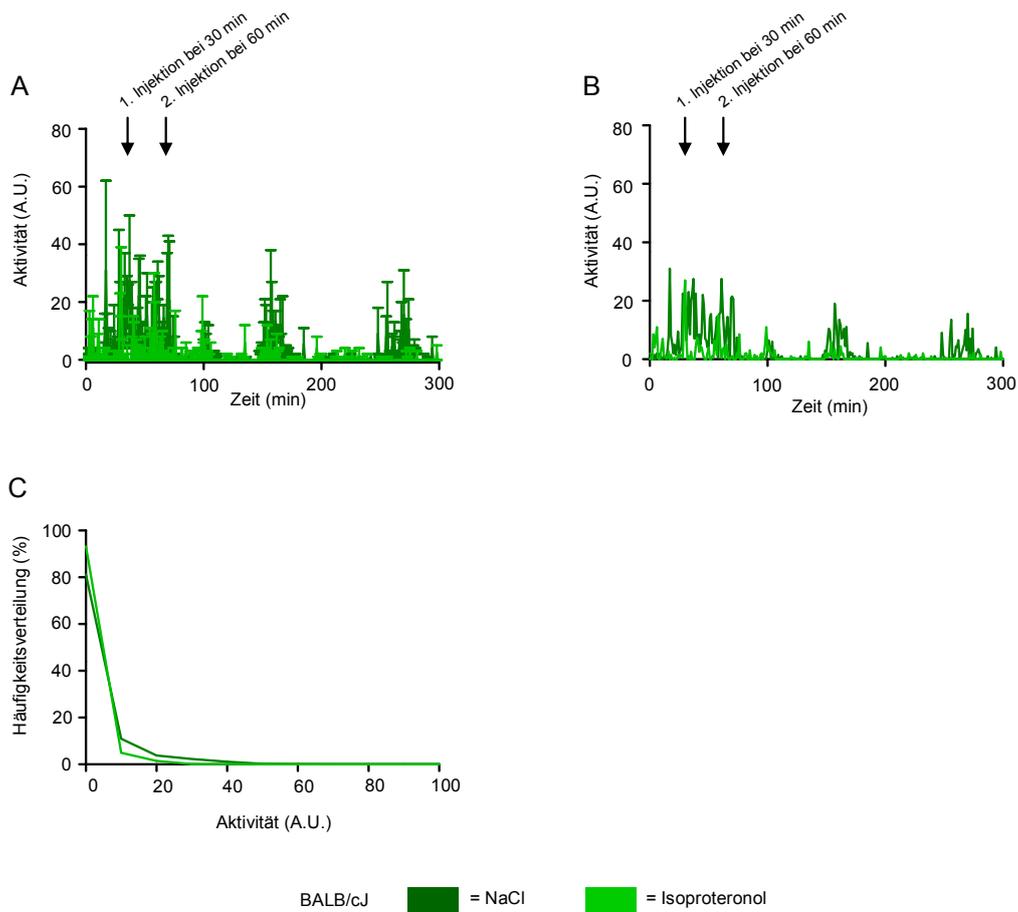
Gegenübergestellt sind die Einzelauswertungen der Herzfrequenz während des Stresstest im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl. (A) Mittlere Herzfrequenz vor der 1. Injektion im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl. (B) Maximale Herzfrequenz nach der 1. Injektion im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl. (C) Differenz der mittleren Herzfrequenz zwischen Isoproterenol und NaCl. (D) Differenz der maximalen Herzfrequenz zwischen Isoproterenol und NaCl. (E) Differenz der Fläche unterhalb der Kurve (AUC) für die Herzfrequenzverläufe zwischen Isoproterenol und NaCl. (F) Vergleich der Gesamtzahl aller Arrhythmien zwischen Isoproterenol und NaCl.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*) p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05)

### 3.2.4.2 Vergleich der Aktivität von Isoproteronol und NaCl

Abbildung 28 und 29 zeigen den Vergleich der Aktivitätsverläufe zwischen Isoproteronol und NaCl für jede Linie. In Abbildung 30 sind die Auswertungen für einzelne Parameter wie beispielsweise die mittlere und maximale Aktivität zwischen Isoproteronol und NaCl dargestellt. Für die in Abbildung 28 gezeigten Linien C57BL/6J und FVB/NJ war unter Isoproteronol eine signifikante Reduktion der Aktivität während der ersten 200 min des Stresstests erkennbar. Besonders deutlich war dies während und kurz nach den jeweiligen Injektionen sichtbar. Bei der in Abbildung 29 dargestellten Linie BALB/cJ hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Isoproteronol und NaCl. Dies spiegelte sich auch in der Darstellung der Isoproteronoleffekte auf die Aktivität der Mäuse wider. Zwar zeigten sich in B signifikante Unterschiede zwischen den Linien innerhalb eines Treatments, jedoch waren die in C bis D gezeigten Effekte von Isoproteronol auf die mittlere und maximale Aktivität, wie auch die Fläche unter der Kurve, statistisch nicht signifikant.

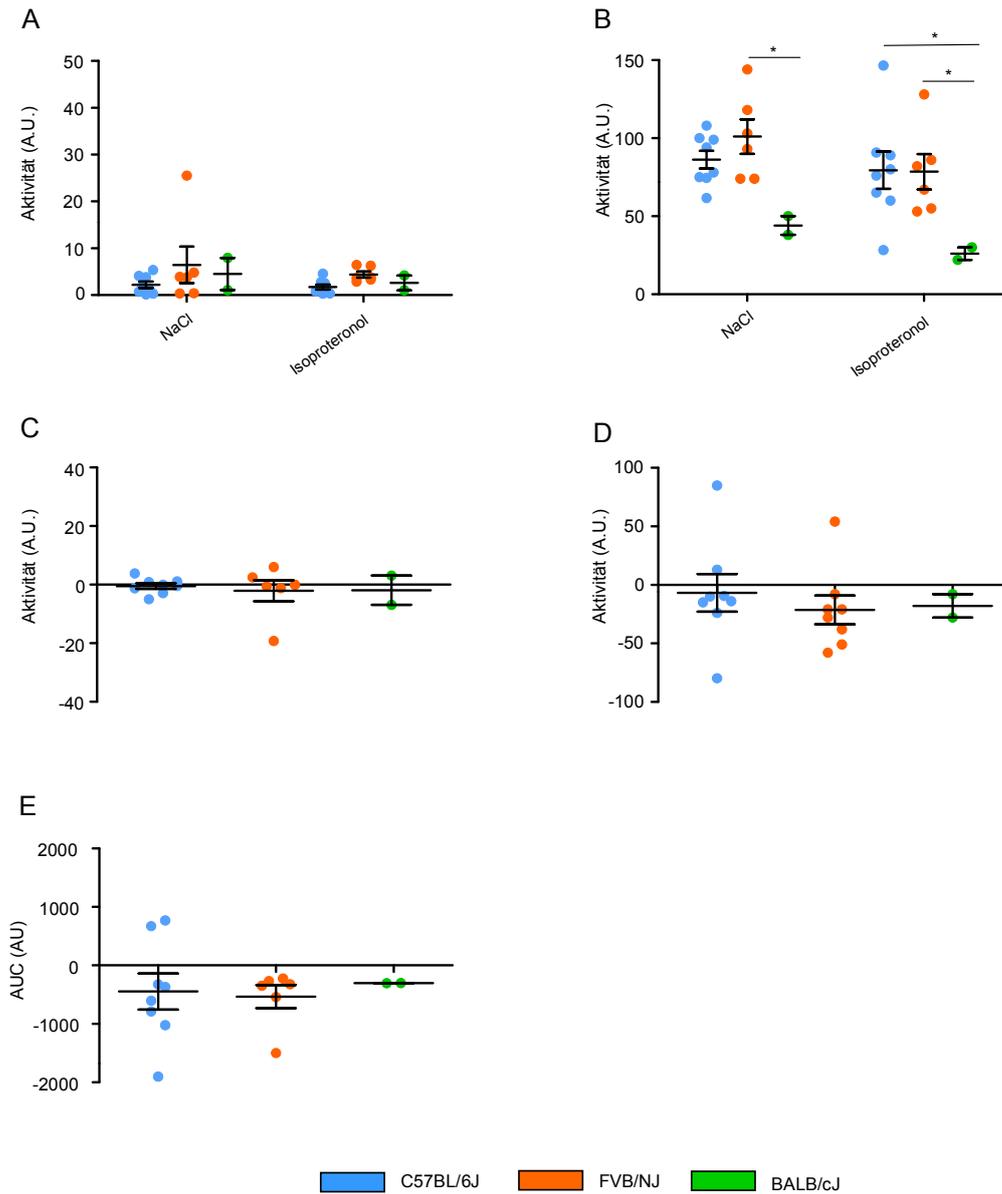




### Abbildung 29: Vergleich der Aktivitätsverläufe zwischen Isoproteronol und NaCl Teil II

Vergleichend dargestellt sind die Aktivitätsverläufe während des Stresstestes zwischen Isoproteronol und NaCl für die Linie BALB/cJ. (A) Vergleich der Aktivitätsverläufe unter Isoproteronol und NaCl mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und in (B) ohne den Standardfehler. (C) zeigt die Häufigkeitsverteilung der Aktivität im Vergleich zwischen Isoproteronol und NaCl in Prozent.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6.



**Abbildung 30: Einzelauswertungen der Aktivität zwischen Isoproterenol und NaCl**

Gegenübergestellt sind die Einzelauswertungen der Herzfrequenz während des Stresstest im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl. (A) Mittlere Aktivität vor der 1. Injektion im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl. (B) Maximale Aktivität nach der 1. Injektion im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl. (C) Differenz der mittleren Aktivität zwischen Isoproterenol und NaCl. (D) Differenz der maximalen Aktivität zwischen Isoproterenol und NaCl. (E) Differenz der Fläche unterhalb der Kurve (AUC) für die Aktivitätsverläufe zwischen Isoproterenol und NaCl.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*)  $p < 0.05$ )

## 4 Diskussion

### 4.1 Validierung eines physiologischen Stresstestes an der wachen Maus für die Induktion von ventrikulären Arrhythmien

Die kardiale Forschung mit Mäusen hat bis heute viele Stresstests hervorgebracht, welche zu einer Aktivitätssteigerung des Sympathikus am murinen Herzen führen. Jedoch wird ein Vergleich der Daten auf Grund unterschiedlichster Methoden merklich erschwert. Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine einheitliche Methodik für die Durchführung eines physiologischen Stresstestes an der wachen Maus. Ebenso wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch kein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivitätssteigerung des Sympathikus und der Entwicklung ventrikulärer Arrhythmien hergestellt. Es wurde die Hypothese getestet, dass die Verwendung einer  $\beta$ -adrenerg wirksamen Substanz (Isoproteronol) im Gegensatz zu einem natürlichen bzw. äußerlichen Stressor (z.B. Fönen oder einem Handling der Tiere) über eine Aktivitätssteigerung des Sympathikus zu signifikant mehr ventrikulären Arrhythmien führt. Dabei wurde die basale Herzfrequenz als indirektes Maß für den Grundsympathikotonus und die Herzfrequenzsteigerung als indirektes Maß für Aktivitätssteigerung des Sympathikus verwendet.

#### 4.1.1 Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung

Die Auswertung der Herzfrequenzantwort für die 4 Stresstestvarianten (Isoproteronol, Isoproteronol + Fön, NaCl, NaCl + Fön) zeigte bei allen Varianten Gemeinsamkeiten wie auch wesentliche Unterschiede.

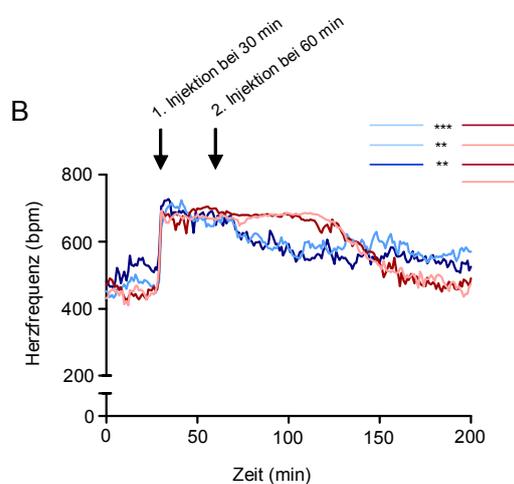
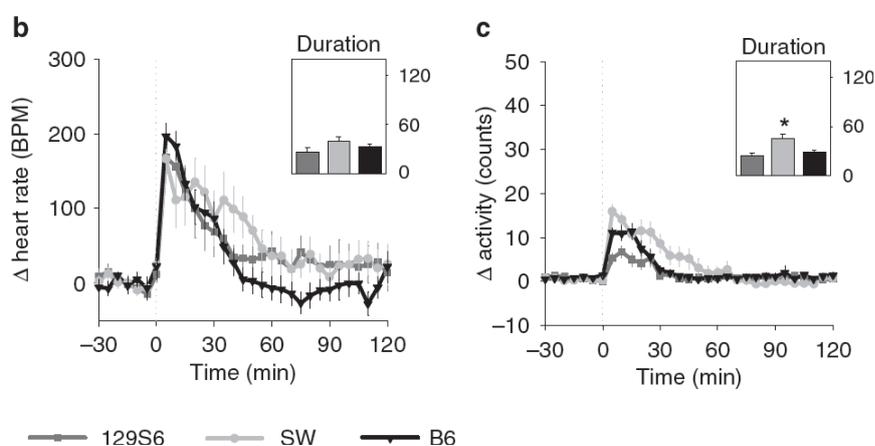


Abbildung 31: Ausschnitt aus Abbildung 13, Herzfrequenzverlauf im Vergleich von 4 Stressvarianten

Abbildung 31 zeigt den Herzfrequenzverlauf im Vergleich zwischen den 4 Stresstestvarianten. Jede der 4 Versuchsvarianten führte bei allen Tieren zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung des Sympathikus in Form einer maximalen Herzfrequenzerhöhung. Kein Unterschied war dabei zwischen Isoproterenol und Isoproterenol + Fön, sowie zwischen NaCl und NaCl + Fön zu sehen. Durch die Injektion von NaCl sank die Frequenz unmittelbar nach jeder Injektion ab. Unter Isoproterenol hingegen war eine deutlich länger andauernde maximale Frequenzerhöhung sichtbar, welche etwa 100 min andauerte und erst dann kontinuierlich sank. Die Herzfrequenz am Ende des Versuches zeigte unter Placebobedingungen eine leichte Erhöhung im Vergleich zur Ausgangsfrequenz. Unter Isoproterenol hingegen erreichte die Herzfrequenz der Tiere zum Ende der Aufzeichnung hin wieder ihren Ausgangswert. Für die maximale Sympathikusaktivierung durch jede der 4 Stresstestvarianten ist vermutlich sowohl das Handling der Tiere wie auch der durch die i.p. Injektion bedingten Schmerz ursächlich. Keines der Tiere zeigte während der gesamten Versuchsdauer eine Adaptation an diese natürlichen Stressoren Angst und Schmerz. Zu beiden Injektionszeitpunkten wurde jeder Zeit eine maximale Frequenzantwort ausgelöst. Andere Arbeiten zeigten, dass sowohl die Veränderungen von Umweltbedingungen (z.B. ein neuer Käfig), wie auch ein Handling der Tiere zu einem linienabhängigen Anstieg von Körpertemperatur und Herzfrequenz führt (Kramer, van Acker et al. 1993; van Acker, Kramer et al. 1995). In Abbildung 32 zeigt sich der Einfluss des Handlings auf Herzfrequenz und Aktivität. Auch hier ist ein initialer Anstieg der Herzfrequenz um 200 bpm zu sehen, welche nach Exposition stetig abfällt und sich nach 40-50 min wieder normalisiert (van Bogaert, Groenink et al. 2006). Ein ähnlicher Herzfrequenzverlauf wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet.



**Abbildung 32: Einfluss des Handling auf Herzfrequenz und Aktivität zwischen Linien**

modifiziert aus: van Bogaert, M. J., L. Groenink, et al. (2006). "Mouse strain differences in autonomic responses to stress." *Genes Brain Behav* 5(2): 139-149.

Kramer et al. konnten nachweisen, dass allein das Betreten eines Raumes, in welchem die Käfige der Mäuse standen, zu einem Herzfrequenzanstieg führt. Dabei zeigten die Mäuse nach einer täglich Exposition über 2 Wochen eine Adaptation an sowohl das Betreten des Raumes wie auch das Handling. Die einzige Ausnahme war zum Zeitpunkt 9:30 Uhr. Eine Störung am Morgen löste mehr Stress aus, da sich die Tiere zu dieser Zeit in ihrer Schlaf- und Ruhephase befanden (Kramer, van de Weerd et al. 2004). Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden alle zwischen 9 und 11 Uhr morgens vorgenommen. Dadurch konnte vermutlich eine größere Differenz zwischen Ruhe- und Maximalfrequenz erreicht werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass ein Training der Tiere in Form von regelmäßigem Handling vor Beginn der Versuchsphase eine Stressreduktion bewirken könnte. In der vorliegenden Arbeit folgt dem Stress durch das Betreten des Versuchsraumes und dem Handling der Tiere ein weiterer Stressor in Form von Schmerz durch die i.p. Injektion. Van Meijer et al. konnten durch den Vergleich des Herzfrequenzanstiegs zwischen subkutaner, intramuskulärer und intraperitonealer Injektion zeigen, dass der größte Stress durch eine intraperitoneale Injektion ausgelöst wird (Meijer, Spruijt et al. 2006). Diese Erkenntnisse legen bei der Interpretation der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse die Vermutung nahe, dass durch Handling und Injektionsschmerzen ein identischer Frequenzanstieg bei allen 4 Stresstestvarianten erreicht wurde. Jedoch ist eine klare Trennung zwischen der Herzfrequenzantwort auf das Handling und auf die Injektion nicht möglich. Signifikant unterschiedlich hingegen war der Herzfrequenzverlauf zwischen Isoproterenol und NaCl. Isoproterenol konnte dabei als einzige Variante die Herzfrequenz über länger als 100 min auf maximale Werte von bis zu 800 bpm bei allen Tieren erhalten. Dabei war vermutlich die Konzentration des Isoproterenol bestimmend für die Höhe und Dauer dieses Plateaus.

<b>Isoproterenoldosis</b>	<b>Auswirkung auf die Herzfrequenz</b>	<b>Dauer der Herzfrequenzerhöhung</b>	<b>Referenz</b>
1 µg/kg i.p.	Steigerung um 25 %	Keine Angaben	(Berul, McConnell et al. 2001)
1 µg/kg i.v.	Steigerung um 100 bpm	1-2 min	(Desai, Sato et al. 1997)
3- 10 µg/kg i.v.	Steigerung um 41 %	1-2 min	(Desai, Sato et al. 1997)
<b>2x 2 mg/kg i.p.</b>	<b>Steigerung um 275 bpm</b> <b>Steigerung um 60 %</b>	<b>100 min</b>	<b>Ergebnisse der vorliegenden Arbeit</b>

**Tabelle 3: Kurzfristige Wirkung von Isoproterenol im Literaturvergleich**

Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, dass eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Isoproteronol und der Herzfrequenz existiert. Dabei bewirkt eine geringe Dosis von 1 µg/kg eine ebenso geringe wie auch kurze Herzfrequenzerhöhung. Bereits 1975 konnten Burden und Parkes zeigen, dass bei zuvor mit Atropin behandelten Mäusen die Höhe und Dauer der Herzfrequenzsteigerung von der Isoproteronoldosis abhängig war (Burden and Parkes 1975). Desai et al. wiesen eine maximale Herzfrequenzsteigerung um 41% durch 3 µg/kg Isoproteronol i.v. nach (Desai, Sato et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine Gesamtdosis von 4 mg/kg eine Steigerung der Herzfrequenz um 60% erreicht. Damit liegt die von Desai et al. ermittelte Frequenzsteigerung um 20 % niedriger.

<b>Isoproteronoldosis</b>	<b>Auswirkung auf die Herzfrequenz</b>	<b>Referenz</b>
1 mg/kg/Tag über 13 Tage	Steigerung um 144 bpm	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
10 mg/kg/Tag über 13 Tage	Steigerung um 148 bpm	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
100 mg/kg/Tag über 5 Tage	linksventrikuläre Hypertrophie	(Faulx, Ernsberger et al. 2005)

**Tabelle 4: Langfristige Wirkung von Isoproteronol im Literaturvergleich**

Eine wiederholte Gabe größerer Dosen wird für die Induktion einer kardialen Hypertrophie genutzt. Tabelle 4 zeigt, dass eine Gabe von höheren Dosen zwischen 1-10 mg/kg auf die Herzfrequenz einen nur sehr geringen Effekt hat. Für die Beurteilung dieser Ergebnisse muss jedoch auch die Methodik bedacht werden. Ein exakter Vergleich der Ergebnisse ist auf Grund unterschiedlicher Messmethoden nicht möglich. In keiner der gezeigten Arbeiten wurde ein Herzfrequenzverlauf gezeigt aus dem hervorgehen könnte, welche Dosis benötigt wird um die Herzfrequenz für eine bestimmte Zeit zu erhöhen. Die Arbeiten, welche höhere Dosen verwendeten, konnten zwar eine wesentliche Frequenzsteigerung bewirken, benennen jedoch nur einen einzigen Messzeitpunkt. Daraus können keine Rückschlüsse auf die Dauer der Frequenzerhöhung gezogen werden.

Weiterhin zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zwar einen identischen aber keinen zusätzlichen Effekt durch das Fönen der Tiere. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sowohl eine alleinige Injektion von Isoproteronol wie auch ein zusätzliches Fönen eine maximale Frequenzsteigerung bedingen, die Herzfrequenz durch eine Kombination aber nicht zusätzlich

gesteigert werden kann. In der von McDougall et al. 2005 veröffentlichten Arbeit wurden 3 Rattenlinien jeweils einem Handling, dem Fönen sowie der Einengung in einer Röhre unterzogen. Dabei zeigte das Fönen direkt auf den Kopf der Tiere ein sehr viel geringern Effekt auf die Herzfrequenz als die Fixierung in einer Röhre (McDougall, Lawrence et al. 2005). Auch ist ein Stress durch Geräusche des Föns nicht sicher auszuschließen. Denn auch die durch das Betreten eines Raumes verursachten Geräusche und Gerüche führen bei Mäusen nachweislich zu einem Anstieg der Herzfrequenz (Kramer, van de Weerd et al. 2004). Für die Mäuse der vorliegenden Arbeit könnte dies bedeuten, dass der nicht nachweisbare Effekt des zusätzlichen Fönens vermutlich durch die Injektion bedingt wurde. Auch konnte das Fönen der Tiere ohne die Injektion von Isoproteronol weder eine dauerhafte Aktivitätssteigerung des Sympathikus noch eine signifikante Induktion von Arrhythmie erzielen.

#### 4.1.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung

<b>Intervention</b>	<b>Mittelwert HR (bpm) vor Injektion</b>	<b>Mittelwert Max HR (bpm) nach Injektion</b>	<b>Mittelwert Delta HR (bpm)</b>
<b>Iso</b>	446 ± 10 **	717 ± 10	270 ± 8 ***
<b>Iso + Fön</b>	444 ± 18 **	718 ± 5	273 ± 18 ***
<b>NaCl</b>	468 ± 12	738 ± 14	269 ± 20 ***
<b>NaCl + Fön</b>	511 ± 23	757 ± 14	246 ± 28 ***

**Tabelle 5: Vergleich der Mittelwerte für die Herzfrequenz vor und der die maximale Herzfrequenz nach Injektion von Isoproteronol**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus SEM für die Herzfrequenz vor der Injektion, die Maximalwerte plus SEM nach der Injektion, sowie die Differenz zwischen diesen beiden Werten mit den jeweiligen statistischen Signifikanzen. Hoch signifikant mit  $p < 0,001$  zeigte sich bei allen Varianten der Anstieg der Herzfrequenz. Weiterhin zeigte sich der Vergleich der mittleren Herzfrequenz zwischen Iso und NaCl bzw. zwischen Iso + Fön und NaCl mit  $p < 0,01$  signifikant unterschiedlich.

$n = 11$  (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ )

Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Versuchteils mit den 11 C57BL/6J Mäusen. Zu sehen ist, dass zwar unter NaCl + Fön die höchste Herzfrequenz verzeichnet werden konnte, jedoch die Differenzen zwischen der mittleren Herzfrequenz vor Versuchsbeginn und der Maximalfrequenz während des Stresstestes bei allen vier Stressvarianten keinen signifikanten Unterschied aufwies. Vor allem entwickelten die Mäuse unter Isoproteronol wesentlich mehr Arrhythmien. Der Vergleich der 4 Stresstestvarianten

konnte zeigen, dass die Herzfrequenz der Mäuse durch die zweimaligen Injektion von 2 mg/kg Körpergewicht Isoproteronol, über einen signifikant längeren Zeitraum erhöht werden konnte und eine weitere Frequenzsteigerung durch ein zusätzliches Fönen nicht möglich war. Auf die weitere Verwendung des Föns wurde verzichtet, da kein zusätzlicher Effekt auf Aktivität des Sympathikus erzielt werden konnte und die Qualität des EKG zu stark beeinträchtigt wurde. Die Injektion von Isoproteronol führte reproduzierbar zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung des Sympathikus in Form einer Herzfrequenzsteigerung und erwies sich als geeigneter Stresstest für die Induktion von Arrhythmien über eine Steigerung der Sympathikusaktivität bei Mäusen.

#### 4.1.2 Ergebnisse der Arrhythmieauswertung

Intervention	Mittelwert Arrhythmiezahl
Iso	77 ± 8 ***
Iso + Fön	52 ± 16 ***/ *
NaCl	3 ± 1
NaCl + Fön	1 ± 0,6

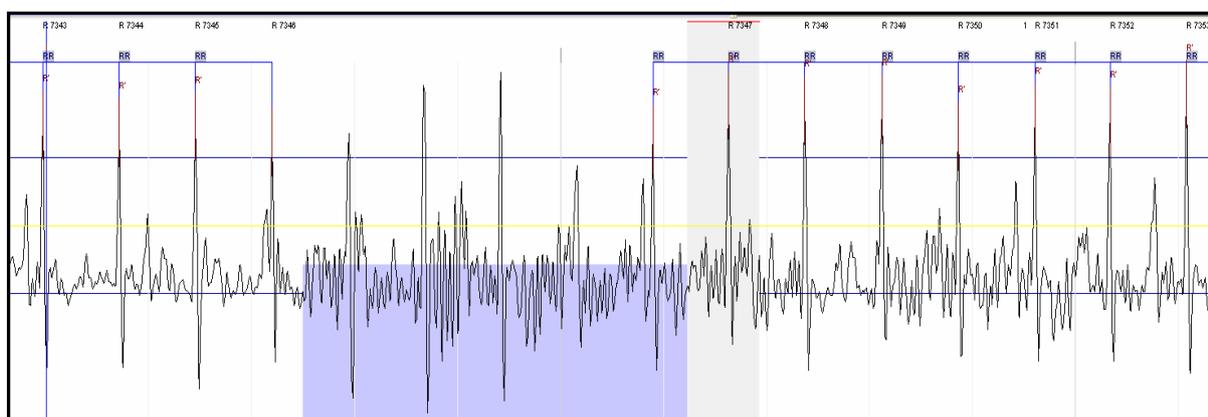
**Tabelle 6: Vergleich der Arrhythmien den verschiedenen Stresstestvarianten**

Dargestellt sind die Mittelwerte aller ermittelten Arrhythmien während des Stresstest plus SEM. Hoch signifikant unterschiedlich mit  $p < 0,001$  zeigte sich der Vergleich zwischen Iso und NaCl, Iso und NaCl + Fön, sowie zwischen Iso + Fön und NaCl. Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Unterschied vom  $p < 0,05$  zwischen Iso + Fön und NaCl + Fön.

n= 11 (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ )

Die in Tabelle 6 zusammengefasste Auswertung der absoluten Arrhythmiezahlen ergab, dass die C57BL/6J Mäuse durch eine Intervention mit Isoproteronol oder Isoproteronol + Fön signifikant mehr Arrhythmien entwickelten als unter den Placebovarianten NaCl und NaCl + Fön. Durch eine Intervention mit NaCl konnten kaum Arrhythmien induziert werden. Möglich wäre ein Zusammenhang zwischen Dauer und Delta des Frequenzanstieges während des Stresstestes. Die Auswertung der Herzfrequenzverläufe zeigte, dass die Herzfrequenz durch Isoproteronol über einen signifikant längeren Zeitraum erhöht werden konnte. Durch eine NaCl-Injektion hingegen konnte die Herzfrequenz lediglich für 10 bis maximal 20 min erhöht werden und fiel deutlich schneller wieder ab. Trotz der durch eine NaCl-Injektion ebenfalls induzierten maximalen Frequenzerhöhung, konnten durch NaCl in den ersten 10 bis

20 min nach der Injektion kaum Arrhythmien gefunden werden. Unter Isoproterenol hingegen wurden im ersten Drittel des 120 minütigen Auswertungszeitraumes die meisten Arrhythmien gefunden. Das Fönen zeigte sowohl bei der Verwendung von NaCl als auch Isoproterenol keinen additiven Effekt in Bezug auf die Arrhythmiezahl. Weiterhin entstanden durch den Fön Interferenzen mit dem Telemetriesender bzw. dem Receiver unterhalb des Käfigs. Durch den Fön wurden massive Artefakte im EKG hervorgerufen, welche eine zuverlässige Auswertung deutlich erschwerten. Einige Bereiche wurden durch die Artefakte sogar unkenntlich. Diese Artefakte waren bereits im EKG während der Stresstestaufzeichnung zu sehen und wurden als mangelnde Qualität des EKG in den Protokollen vermerkt. In Abbildung 33 ist ein solches Artefakt gezeigt. Weiterhin war die Auswertung dieser EKG Dateien sehr viel zeitaufwendiger, da das Programm nicht selten die doppelte Anzahl an Gaps und nicht identifizierbaren EKG-Abschnitten in der RR-Analyse zeigte.



**Abbildung 33: Darstellung eines Artefaktes während der Nutzung eines Föns**

Die R-Zacken sind zwar noch identifizierbar, jedoch überdecken die Artefakte vor allem den zwischen den R-Zacken gelegenen EKG-Abschnitt. Dieser ist nicht nur für die Identifizierung der verschiedenen Arrhythmieformen wichtig, sondern vor allem für die Suche und Kennzeichnung einer potenziellen Arrhythmie durch das Programm. Der in Abbildung 33 violett unterlegte Abschnitt verdeutlicht dies. Durch die hohen inter-beat Artefakte ist das Programm nicht mehr dazu in der Lage zwischen Artefakt und R-Zacke zu unterscheiden. Dadurch zeigt es diesen Bereich als Gap an. Diese Gap ist jedoch auch manuell nicht sicher auswertbar da es unmöglich ist, eine Arrhythmie hinter dem Artefakt zu erkennen. Vor allem steigt durch die hohe Anzahl an Gaps der Arbeitsaufwand enorm und für zuverlässige Ergebnisse wäre eine vollmanuelle Auswertung nötig. Dies ist jedoch auch Grund der großen Datenmenge und des dadurch bedingten enormen Zeitaufwandes nicht durchführbar. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil der Arbeit auf ein zusätzliches Fönen der Tiere verzichtet.

### 4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Stresstestvalidierung

Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Validierung eines physiologischen Stresstests an der wachen Maus. Es wurde die Hypothese getestet, dass die Verwendung einer  $\beta$ -adrenerg wirksamen Substanz (Isoproteronol) im Gegensatz zu einem natürlichen bzw. äußerlichen Stressor (z.B. Fönen oder einem Handling der Tiere) über eine Aktivitätssteigerung des Sympathikus zu signifikant mehr ventrikulären Arrhythmien führt. Dabei wurde die basale Herzfrequenz als indirektes Maß für den Grundsympathikotonus und die Herzfrequenzsteigerung als indirektes Maß für die Aktivitätssteigerung des Sympathikus verwendet.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

1. Führt die Applikation von Isoproteronol im Gegensatz zur Injektion von NaCl zu einer signifikanten Steigerung der Sympathikusaktivität in Form einer Herzfrequenzsteigerung?
2. Führt die Applikation von Isoproteronol im Gegensatz zur Injektion von NaCl zu signifikant mehr ventrikulären Arrhythmien?
3. Führt ein zusätzliches Fönen zu einer additiven Steigerung der Arrhythmiezahlen?

Der im ersten Teil dieser Arbeit validierte Stresstest mit Isoproteronol konnte zuverlässig und reproduzierbar ventrikuläre Arrhythmien bei allen 11 Mäusen der Linie C57BL/6J induzieren. Damit bestätigte sich die Hypothese, dass die Verwendung einer  $\beta$ -adrenerg wirksamen Substanz im Gegensatz zu einem natürlichen Stressor über eine Aktivitätssteigerung des Sympathikus zu signifikant mehr ventrikulären Arrhythmien führt.

Die zuvor gestellten Fragen können folgendermaßen beantwortet werden:

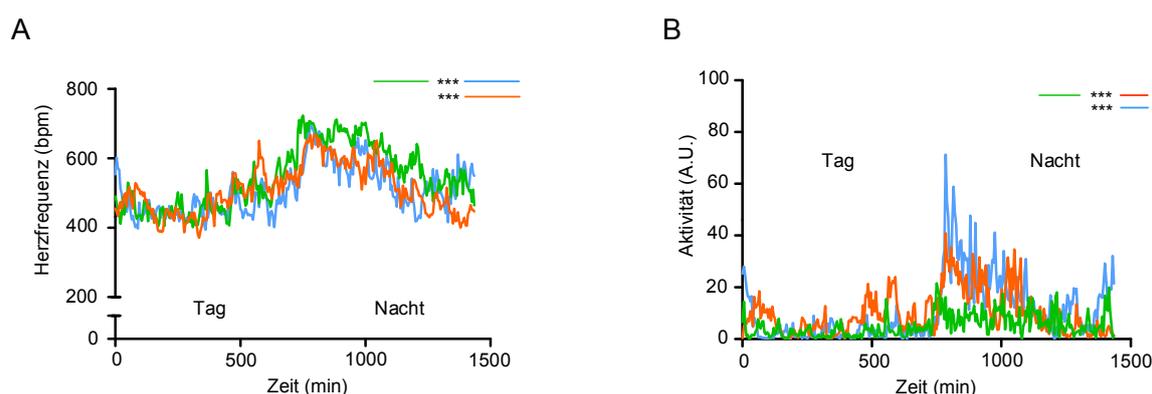
1. Sowohl die Injektion von Isoproteronol, wie auch von NaCl führte zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung des Sympathikus in Form einer maximalen Herzfrequenzerhöhung bei allen Tieren. Jedoch zeigte sich nur unter Isoproteronol eine signifikant länger andauernde Herzfrequenzerhöhung.
2. Die Injektion von Isoproteronol führte im Vergleich zur einer Injektion von NaCl zu signifikant mehr ventrikulären Arrhythmien bei allen Tieren.
3. Ein zusätzliches Fönen der Tiere zeigte keinen additiven Effekt auf die Arrhythmiezahl. Die Methode eignet sich weiterhin nicht für die Induktion eines kardialen Stresses, weil sie merklich die Qualität des EKG minderte und damit die Datenauswertung deutlich erschwerte.

## 4.2 Anwendung der validierten Stresstestmethode bei drei Mauslinien

Die Forschung mit Mäusen hat verschiedenste Linien hervorgebracht, welche unter anderem große Unterschiede in Bezug auf ihre kardiovaskulären Parameter aufweisen. Unter anderem wurde ein unterschiedlicher basaler Sympathikotonus proklamiert. Jedoch wurde bis jetzt noch kein Unterschied in Bezug auf die Arrhythmogenität verschiedener Linien gezeigt oder ein Zusammenhang mit dem basalen Sympathikotonus der Tiere hergestellt. Basierend auf Vorarbeiten wurden für den zweiten Teil der Arbeit 3 Mauslinien mit einem unterschiedlichen basalen Sympathikotonus ausgewählt und dem zuvor im ersten Teil validierten Stresstest unterzogen. Dabei wurde die Hypothese getestet, dass der genetische Hintergrund einer Mauslinie einen Einfluss auf die Arrhythmiezahl unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation hat.

### 4.2.1 Linienabhängige Herzfrequenz und Aktivität während der 24 h Baseline

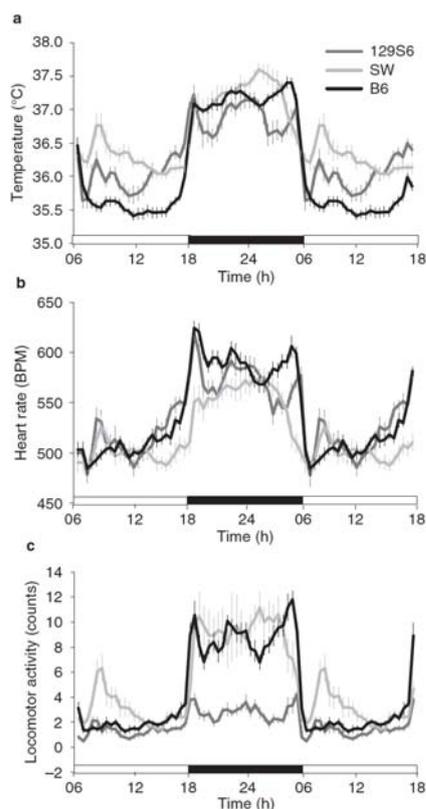
Vor Beginn der Stresstestphase wurde bei allen Tieren eine 24 h Baseline der Herzfrequenz und Aktivität aufgezeichnet. Dies war zuverlässig und reproduzierbar über den implantierten Telemetriesender möglich. Der Vergleich der 24 h Baseline zeigte bei allen Linien einen deutlichen Tag-Nacht-Rhythmus mit einer signifikanten nächtlichen Erhöhung von Aktivität und Herzfrequenz. Dieser zirkadiane Rhythmus ist bei der Maus als nachtaktives Tier bekannt (Guo and Stein 2003). In Abbildung 34 sind die Abläufe von Herzfrequenz und Aktivität während der 24 h Baseline nochmals dargestellt.



**Abbildung 34: Darstellung von Herzfrequenz und Aktivität während der 24 h Baseline**

Diese Abbildung entstammt den Abbildungen 16 und 17 aus dem Ergebnisteil. (A) zeigt den Verlauf der Herzfrequenz und (B) den Verlauf der Aktivität während der Baselinemessung.

Es zeigte sich zwischen den Linien ein signifikanter Unterschied des zirkadianen Rhythmus. C57BL/6J und FVB/NJ zeigten ein sehr ähnliches Verhalten mit einer Erhöhung der nächtlichen Aktivität und Herzfrequenz. Die BALB/cJ Mäuse hingegen zeigten sowohl die geringste Aktivität wie auch die höchste Herzfrequenz. Vor allem während der nächtlichen aktiven Phase zeigten sie nur eine geringe Aktivitätserhöhung im Vergleich zu den anderen Linien. Bei BALB/cJ zeigte sich keine Proportionalität von Herzfrequenz und Aktivität. Die Herzfrequenz verblieb trotz sinkender Aktivität am Tag oberhalb der anderen Linien. In Zusammenschau dieser Ergebnisse wird deutlich, dass es einen linienspezifischen zirkadianen Rhythmus gibt und die Herzfrequenz nicht in direktem Zusammenhang mit der Aktivität steht. Van Bogaert et al. zeigten ebenfalls einen linienspezifischen Unterschied im Bezug auf den zirkadianen Rhythmus zwischen C57BL/6J, Swiss Webster und 129S6. Abbildung 34 verdeutlicht, dass bei van Bogaert et al. die Herzfrequenz von C57BL/6J und Swiss Webster nachts auf einem ähnlich hohen Niveau waren, obwohl die Swiss Webster Mäuse zu dieser Zeit eine wesentlich geringere Aktivität aufwiesen (van Bogaert, Groenink et al. 2006).

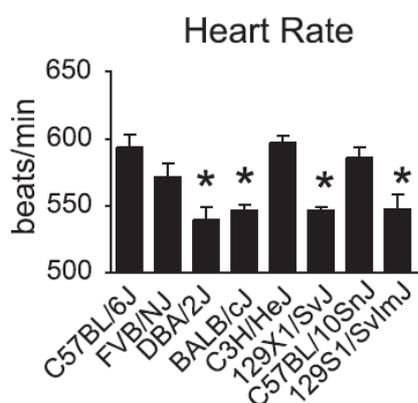


**Abbildung 35: Zirkadianer 24 h-Rhythmus von Körpertemperatur (a), Herzfrequenz (b) und Aktivität (c) im Linienvergleich von C57BL/6J, Swiss Webster und 129S6.**

Modifiziert aus: van Bogaert, M. J., L. Groenink, et al. (2006). "Mouse strain differences in autonomic responses to stress." *Genes Brain Behav* 5(2): 139-149.

Es könnte somit einen linienabhängigen basalen Sympathikotonus gegeben, welcher ursächlich für die höhere Herzfrequenz der BALB/cJ Mäuse in dieser Arbeit ist, bei einem identischen Aktivitätsniveau aller gezeigten 3 Linien. Weiterhin wurde deutlich, dass Mäuse tagsüber insbesondere am Morgen eine wesentlich niedrigere Herzfrequenz aufweisen und ein Stresstest zu dieser Tageszeit einen größeren Frequenzanstieg bewirkt. Somit war der in dieser Arbeit der zwischen 9 und 11 Uhr angesetzte Stresstest zeitlich gut gewählt.

Sowohl Barnabei et al. als auch Shah et al. kamen zu dem Schluss, dass der genetische Unterschied zwischen Inzucht-Linien, zu denen auch die hier verwendeten Linien zählen, die kardiale Funktion signifikant beeinflusst. Der Vergleich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit zeigt, wie entscheidend die Methodik für die Ergebnisse ist. Barnabei et al. führten *ex vivo* und *in vivo* Messungen kardialer Parameter über einen intrakardialen Katheter an zuvor anästhesierten Mäusen durch. Sie konnten zeigen, dass die Linie C57BL/6J eine wesentlich höhere kardiale Aktivität zeigte als die anderen Linien, zu welchen auch FVB/NJ und BALB/cJ zählten. Bei Barnabei et al. zeigte die Linie C57BL/6J, im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, eine signifikant höhere Baseline Herzfrequenz als BALB/cJ (Barnabei, Palpant et al. 2010). Ein Ausschnitt aus den Ergebnissen von Barnabei et al. ist in Abbildung 36 zu sehen.



**Abbildung 36: *In vivo* Baselinemessung hämodynamischer Funktionen im Linienvergleich**

Modifiziert aus: Barnabei, M. S., N. J. Palpant, et al. (2010). "Influence of genetic background on *ex vivo* and *in vivo* cardiac function in several commonly used inbred mouse strains." *Physiol Genomics* 42A(2): 103-113.



#### **4.2.2 Linienabhängige Antwort von Herzfrequenz und Aktivität auf eine $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol**

Der erste Teil der Arbeit konnte zeigen, dass die Verwendung einer  $\beta$ -adrenergen Substanz (Isoproterenol) sehr gut geeignet ist, um über eine Steigerung der Sympathikusaktivität ventrikuläre Arrhythmien auszulösen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde dieser Stresstest für den Linienvergleich zwischen BALB/cJ, FVB/NJ und C57BL/6J verwendet. In diesem Abschnitt sollte die Frage beantwortet werden, ob ein liniengebundener Unterschied in Bezug auf die Herzfrequenz und die Aktivität bei Mäusen unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation besteht.

Die Tabellen 7 und 8 zeigen die Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung im Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl für die 3 Mauslinien. Bei allen Linien konnte, unabhängig von dem Inhalt der Injektion, ein signifikanter Frequenzanstieg erzielt werden. Dabei zeigte sich bei C57BL/6J ein signifikant größerer Anstieg unter NaCl als unter Isoproterenol. Bei den anderen Linien war dies nicht der Fall. Die größte Differenz zwischen Isoproterenol und NaCl zeigte sich in der Dauer der Frequenzerhöhung. Die Herzfrequenz war bei allen Linien unter Isoproterenol signifikant länger erhöht. Unter NaCl hingegen zeigte sich bereits nach wenigen Minuten ein deutlicher Frequenzabfall. Dabei wird wie zuvor schon im ersten Teil der Arbeit deutlich, dass die maximale Sympathikusaktivierung zwischen dem Inhalt der Injektion nicht differiert. Die unmittelbare Aktivitätssteigerung des Sympathikus bewirkt vor allem das Handling der Mäuse sowie der der Injektionsschmerz. Es zeigte sich noch ein weiterer Isoproterenol-induzierter Effekt. Alle Linien, besonders BALB/cJ, zeigten im Gegensatz zu NaCl einen deutlichen Frequenzabfall und gelangten auf Höhe der Ausgangsfrequenz wieder an. BALB/cJ sankt sogar noch unterhalb dieser Frequenz ab. Unter NaCl reduzierte sich die Herzfrequenz wesentlich schneller, sankt jedoch nicht wieder auf den Ausgangswert zurück. Bei C57BL/6J verblieb sie sogar bis zum Ende hin bei deutlich erhöhten Werten von ca. 600 bpm. Diese Beobachtung lässt sich in Zusammenhang mit der Aktivität erklären. Die zusammengefassten Auswertungen der Aktivität während des Stresstests sind in den Tabellen 9 und 10 gezeigt.

Linie	HR (bpm) vor Injektion	HR Max (bpm) nach Injektion	Delta HR (bpm)	Dauer HR Erhöhung (min) durch Iso	HR (bpm) nach Ende des Max bis zum Ende der Aufzeichnung
<b>C57BL/6J</b>	431 ± 16	714 ± 9	279 ± 15 ***	56	460
<b>BALB/cJ</b>	472 ± 43	704 ± 6	231 ± 42 ***	71	250
<b>FVB/NJ</b>	456 ± 19	718 ± 5	262 ± 22 ***	85	410

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung unter Isoproterenol**

Dargestellt sind die Mittelwerte vor sowie die Maximalwerte nach der Injektion und weiterhin die Differenz zwischen diesen beiden Werten mit den jeweiligen SEM sowie den statistischen Signifikanzen unter Isoproterenol. Weiterhin sind Dauer und Höhe der Herzfrequenz zum Ende der Aufzeichnungen abgebildet. Hoch signifikant unterschiedlich mit  $p < 0,001$  zeigte sich dabei der Anstieg der Herzfrequenz für den jeweiligen Genotypen.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*)  $p < 0,05$ )

Linie	HR (bpm) vor Injektion	HR Max (bpm) nach Injektion	Delta HR (bpm)	Dauer HR Erhöhung (min) durch NaCl	HR (bpm) nach Ende des Max bis zum Ende der Aufzeichnung
<b>C57BL/6J</b>	459 ± 19	762 ± 4	303 ± 17 ***	~ 2-5	600
<b>BALB/cJ</b>	436 ± 24	718 ± 18	281 ± 19 ***	~ 2-5	530
<b>FVB/NJ</b>	450 ± 20	744 ± 12	294 ± 17 ***	~ 2-5	440

**Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung unter NaCl**

Dargestellt sind die Mittelwerte vor sowie die Maximalwerte nach der Injektion und weiterhin die Differenz zwischen diesen beiden Werten mit den jeweiligen SEM sowie den statistischen Signifikanzen unter NaCl. Hoch signifikant unterschiedlich mit  $p < 0,001$  zeigte sich dabei der Anstieg der Herzfrequenz für den jeweiligen Genotypen.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*)  $p < 0,05$ )

Linie	Act (A.U.) vor Injektion	Act Max (A.U.) nach Injektion	Delta Act (A.U.)
C57BL/6J	2 ± 0,4	70 ± 10	69 ± 10 ***
BALB/cJ	3 ± 1,6	26 ± 4	23 ± 6
FVB/NJ	4 ± 0,6	79 ± 11 **	74 ± 12 ***

**Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Aktivitätsauswertung unter Isoproterenol**

Dargestellt sind die Mittelwerte vor sowie die Maximalwerte nach der Injektion und weiterhin die Differenz zwischen diesen beiden Werten mit den jeweiligen SEM sowie den statistischen Signifikanzen unter Isoproterenol. Hoch signifikant unterschiedlich mit  $p < 0,001$  zeigte sich dabei der Anstieg der Aktivität für die Linien C57BL/6J und FVB/NJ. Weiterhin zeigte sich der Vergleich der mittleren Aktivität nach der Injektion zwischen den Linien FVB/NJ und BALB/cJ mit  $p < 0,01$  signifikant.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ )

Linie	Act (A.U.) vor Injektion	Max Act (A.U.) nach Injektion	Mittelwert Delta Act (A.U.)
C57BL/6J	2 ± 0,7	86 ± 6 ***	84 ± 6 *
BALB/cJ	5 ± 3,4	44 ± 6 *	40 ± 3
FVB/NJ	6 ± 4	101 ± 11 ***	95 ± 9 **

**Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Aktivitätsauswertung unter NaCl**

Dargestellt sind die Mittelwerte vor sowie die Maximalwerte nach der Injektion und weiterhin die Differenz zwischen diesen beiden Werten mit den jeweiligen SEM sowie den statistischen Signifikanzen unter NaCl. Hoch signifikant unterschiedliche mit  $p < 0,001$  zeigte sich dabei der Anstieg der Aktivität für die Linien C57BL/6J und FVB/NJ. Der Aktivitätsanstieg unter NaCl zeigte sich bei BALB/cJ mit  $p < 0,05$  ebenfalls signifikant. Weiterhin zeigte sich der Vergleich des Deltas für die unter NaCl zwischen den Linien C57BL/6J und BALB/cJ mit  $p < 0,05$  und zwischen FVB/NJ und BALB/cJ mit  $p < 0,01$  signifikant.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ )

Wie zuvor die Herzfrequenz, so wurde auch die Aktivität bei beiden Versuchsvarianten durch die Injektion merklich erhöht. Es zeigte sich jedoch, dass trotz einer weiterhin erhöhten Herzfrequenz, die Aktivität unter Isoproterenol bei allen Linien schnell wieder absank. Hier zeigte sich, wie zuvor schon bei der Baselinemessung, dass die Herzfrequenz der Tiere nicht durch eine erhöhte Aktivität bedingt war. Im Gegenteil, die Tiere schienen sich unmittelbar nach der Injektion so wenig wie möglich zu bewegen. Dies gilt insbesondere für die BALB/cJ Tiere. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Mäuse versuchten den durch Isoproterenol induzierten Stress zu reduzieren, indem sie sich weniger bewegen. Dies wäre als eine Schutzreaktion zu interpretieren, durch welche das kardiovaskuläre System versucht einen weiteren Stress zu vermeiden bzw. den Stress zu senken. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die Aktivität der Tiere zwischen den Linien variiert. So waren die C57BL/6J Tiere wesentlich aktiver als BALB/cJ. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Arbeitsgruppen. Bei O'Leary et al. zeigte sich BALB/cJ wesentlich ängstlicher (O'Leary, Gunn et al. 2013), bei Wahlsten et. al wesentlich weniger aggressiv (Wahlsten, Metten et al. 2003) und bei Lightfoot et al. auch deutlich weniger aktiv im Laufrad als C57BL/6J und FVB/NJ (Lightfoot, Leamy et al. 2010). Dies bestätigt die Vermutung, dass die Aktivität der Mäuse ebenfalls linienabhängig ist. Der Vergleich der Herzfrequenzantwort auf Isoproterenol zwischen den Linien zeigt, dass die Antwort der BALB/cJ Tiere signifikant unterschiedlich ist im Gegensatz zu den anderen 2 Linien. Nicht nur das länger andauernde Plateau sondern auch die zum Ende hin unterhalb der Frequenz der anderen 2 Linien abfallende Herzfrequenz war dabei auffällig.

In diesem Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es einen linienspezifischen Unterschied in Bezug auf die Herzfrequenz und Aktivität der Mäuse unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation gibt. Jedoch konnte kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der basalen Herzfrequenz und der Herzfrequenzsteigerung während des Stresstestes hergestellt werden. Zwar zeigte BALB/cJ die höhere basale Herzfrequenz und auch einen signifikanten Unterschied zu den anderen Linien während des Stresstestes, jedoch war dieser vor allem durch den ausgeprägten Frequenzabfall zu Ende des Versuches hin bedingt. Die maximale Frequenzantwort und damit die maximale Erregbarkeit des Sympathikus zeigte sich bei allen Linien identisch.

### 4.2.3 Linienabhängige Arrhythmogenität während des Stresstestes mit Isoproterenol

Auch in diesem Teil der Arbeit zeigte sich, dass der zuvor bei C57BL/6J validierte Stresstest zuverlässig und reproduzierbar Arrhythmien induzierte. Weiterhin konnte auch die etablierte Methode für die Auswertung der Arrhythmien durch ecgAUTO® erfolgreich angewendet werden.

Linie	Arrhythmiezahl unter Iso	Arrhythmiezahl unter NaCl
<b>C57BL/6J</b>	76 ± 8	1,4 ± 0,6 ***
<b>BALB/cJ</b>	43 ± 10	0 ± 0 ***
<b>FVB/NJ</b>	31 ± 7	0,6 ± 0,5 **

**Tabelle 11: Zusammenfassung der mittleren Arrhythmiezahl unter Isoproterenol und NaCl**

Dargestellt sind die Werte als Mittelwerte plus SEM für Arrhythmien unter Isoproterenol und NaCl. Hochsignifikant mit  $p < 0,001$  zeigte sich dabei die Differenz zwischen den beiden Injektionsinhalten bei den Linien Anstieg C57BL/6J und BALB/cJ. Die Linie FVB/NJ zeigte bei diesem Vergleich einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,01$ .

C57BL/6J  $n = 11$ , BALB/cJ  $n = 6$  und FVB/NJ  $n = 6$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ )

Tabelle 11 zeigt die mittlere Arrhythmiezahl aller Linien während des Stresstests im Vergleich zwischen NaCl und Isoproterenol. Wie zuvor im ersten Teil der Arbeit zeigten sich unter Isoproterenol signifikant mehr Arrhythmien. Weiterhin zeigten sich im Linienvergleich wesentliche Unterschiede in Bezug auf die Arrhythmogenität der Tiere. Die signifikant meisten Arrhythmien entwickelte der Genotyp C57BL/6J mit im Mittel 73 gezählten Arrhythmien. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass bei allen Linien eine alleinige maximale Herzfrequenzsteigerung nicht ausreichend ist um Arrhythmien zu induzieren. Für diesen Effekt ist die zusätzliche Verwendung von Isoproterenol nötig. Dabei scheint vor allem die durch Isoproterenol induzierte länger andauernde maximale Sympathikusaktivität verantwortlich zu sein. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei Isoproterenol um ein Noradrenalin-Derivat und als solches wirkt Isoproterenol auf die  $\beta$ -Rezeptoren an den kardialen Myozyten und darüber auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Homöostase.

#### 4.2.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ und dessen Bedeutung bei kardialen Rhythmusstörungen der Maus

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, nimmt  $\text{Ca}^{2+}$  eine entscheidende Rolle im Ablauf der elektromechanischen Kopplung während einer Herzaktion ein.  $\text{Ca}^{2+}$  stellt das Bindeglied zwischen den intrazellulären Ionenströmen und der muskulären Kontraktion des Myokards dar. Störungen innerhalb dieses empfindlichen Systems können zu Rhythmusstörungen führen. So kommt es beispielsweise bei CPVT Patienten unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation durch körperlichen oder emotionalem Stress zu einem unphysiologischen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die entscheidende Rolle für die Induktion von Arrhythmien spielt dabei die  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Ursächlich hierfür ist eine Mutation im RyR2 des SR (Priori, Napolitano et al. 2002), welche die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 erhöht und somit zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck aus dem SR führt (Jiang, Xiao et al. 2002). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks induzieren so genannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen, welche dann Arrhythmien auslösen können.  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks betreffen immer nur lokal begrenzte Bereiche des SR, wohingegen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen wesentlich mehr RyR2-Rezeptoren aktivieren und sich somit über ein wesentlich größeres Gebiet am SR ausbreiten können (Kashimura, Briston et al. 2010). Es gibt derzeit zwei mögliche Hypothesen für diese Beobachtung. Die erste nimmt an, dass eine Phosphorylierung des RyR2 dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht und dadurch die Grenze für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR herabsetzt (Wehrens, Lehnart et al. 2003). Die zweite Möglichkeit ist eine Phosphorylierung des Phospholambans, welches zu einer Erhöhung der SERCA-Aktivität und damit zu einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anteils führt (Kashimura, Briston et al. 2010). Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation sind spontane idiopathische  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks aus dem SR ohne eine zugrunde liegende Pathologie. Diese sind definiert als  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen, welche außerhalb des Rhythmus stattfinden. Die bekanntesten diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen sind so genannte spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks (Cheng and Lederer 2008). Während eines solchen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks erhöht sich die lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR, da weitere miteinander verbundene RyR2-Kanäle über die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aktiviert werden. Diese Ereignisse sind in Kinetik und Höhe vergleichbar mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung während einer elektromechanischen Kopplung, jedoch begrenzt in Zeit und Ort. Unter bestimmten Umständen, bei hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im SR und intrazellulär, sowie sensitivierten RyR2-Kanälen, kann ein lokaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark eine die gesamte Zelle betreffende  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle auslösen (Cheng, Lederer et al. 1996). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen sind in der Lage Arrhythmien zu induzieren. Während einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation werden einige  $\text{Ca}^{2+}$ -Mechanismen hoch reguliert, beispielsweise der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die L-Typ Kanäle und die Phosphorylierung

von Phospholamban. Damit erhöht sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dieses wird zum einen für die Steigerung der Inotropie benötigt, kann aber ebenso zu Arrhythmien führen (Thandroyen, Morris et al. 1991). Curran et al. konnten zeigen, dass bei herzinsuffizienten Hasen eine  $\beta$ -adrenerge Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks aus dem SR durch Isoproterenol über die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Proteinkinase (CaMKII) vermittelt wird. CaMKII phosphoryliert die RyR2-Kanäle und erhöht somit die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Curran, Hinton et al. 2007). Bei C57BL/6J Mäusen, welche ebenfalls  $\beta$ -adrenerg stimuliert wurden, ist für die Erhöhung des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks die Phosphorylierung der RyR2s durch die Protein Kinase A verantwortlich (Morimoto, J et al. 2009). Die Arbeit von Shah et al. verglich unter anderem die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation von FVB/NJ, C57BL/6J und BALB/cJ. Dabei zeigte sich, dass C57BL/6J und BALB/cJ eine höhere Dichte an T-Tubuli aufwiesen. Über einen externen Stromreiz induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks waren bei BALB/cJ deutlich vermehrt beobachtet worden und sowohl bei C57BL/6J und BALB/cJ wesentlich länger als bei FVB/NJ. Weiterhin zeigten BALB/cJ signifikant mehr  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks (Shah, Siedlecka et al. 2010). Alle gezeigten Arbeiten liefern wichtige Ansätze und weisen auf eine linienspezifische Arrhythmogenität von Mäusen hin. Entscheidend dabei war die  $\beta$ -adrenerge Stimulation, welche eine gewisse Zeit bestehen musste. Der Sympathikus spielt somit in diesem Stresstestmodell die entscheidende Rolle. Möglich wäre in diesem Zusammenhang, dass die Linie C57BL/6J unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation durch Unterschiede in der Signalkaskade vermehrt zu Arrhythmien neigt. Zwar zeigte sich in der Arbeit von Shah et al., dass den Ergebnissen nach die Linie BALB/cJ vermehrt zu Arrhythmien neigen müsste, jedoch wurde bei der von Shah et al. angewandten Methode der Einfluss des Sympathikus außen vor gelassen. Die Versuche wurden an isolierten Kardiomyozyten vorgenommen, welche somit nicht vegetativ beeinflussbar waren. Dies könnte eine mögliche Erklärung liefern, warum die Linie C57BL/6J in der vorliegenden Arbeit unter Isoproterenol signifikant mehr Arrhythmien entwickelte als BALB/cJ. Diese Vermutung wird gestützt durch die Arbeit von Waldeyer et al., welche eine relative Widerstandsfähigkeit von C57BL/6J gegenüber Arrhythmien zeigte, dies jedoch an isolierten Herzen nachwies, welche somit ebenfalls keiner vegetativen Steuerung durch das autonome Nervensystem unterlagen (Waldeyer, Fabritz et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, wie entscheidend der Einfluss des Sympathikus auf die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien bei den verwendeten Mauslinien C57BL/6J, BALB/cJ und FVB/NJ ist.

Es wird in der medizinischen Fachwelt viel über linienspezifische Unterschiede bei Mäusen diskutiert. In der Literatur existieren verschiedene Methoden, durch welche bei genetisch

manipulierten Mäusen humane kardiale Pathologien induziert und unterschiedliche Arrhythmie-Modelle an den Tieren getestet werden. Dabei interessiert vorwiegend die Qualität und nicht die Quantität der Arrhythmien (London, Jeron et al. 1998; Jeron, Mitchell et al. 2000; Kirchhof, Fabritz et al. 2004; Cerrone, Colombi et al. 2005; Sabir, Fraser et al. 2007; Stokoe, Balasubramaniam et al. 2007; Werdich, Baudenbacher et al. 2007; Killeen, Thomas et al. 2008; Fabritz, Damke et al. 2010; Broun, Asghari et al. 2012; Faggioni, Hwang et al. 2013). Jedoch wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Vergleich einer liniengebundenen Arrhythmogenität unter annähernd physiologischen Bedingungen getätigt. Diese Arbeit konnte als erste zeigen, dass die zuvor auf vielen Teilgebieten der Kardiologie nachgewiesenen linienspezifischen Unterschiede auch für die ventrikuläre Arrhythmogenität gelten.

#### **4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des Stresstestes im Linienvergleich**

Es wurde die Hypothese getestet, dass der genetische Hintergrund einer Mauslinie einen Einfluss auf die Arrhythmogenität unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation hat.

Dabei wurden folgende Fragen für den zweiten Teil formuliert:

1. Ist der zuvor im ersten Teil der vorliegenden Arbeit validierte Stresstest dazu geeignet um eine linienabhängige Arrhythmogenität von Mäusen nachzuweisen?
2. Besteht ein liniengebundener Unterschied in Bezug auf die basale Herzfrequenz als indirektes Maß für den Grundsympathikotonus und determiniert dieser die Reaktion einer Linie auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation?
3. Determiniert die basale Herzfrequenz, als indirektes Maß für den Grundsympathikotonus, die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien?
4. Ist für die Induktion von ventrikulären Arrhythmien die absolute Höhe der Herzfrequenzsteigerung oder die Dauer der maximalen Frequenzerhöhung entscheidend?

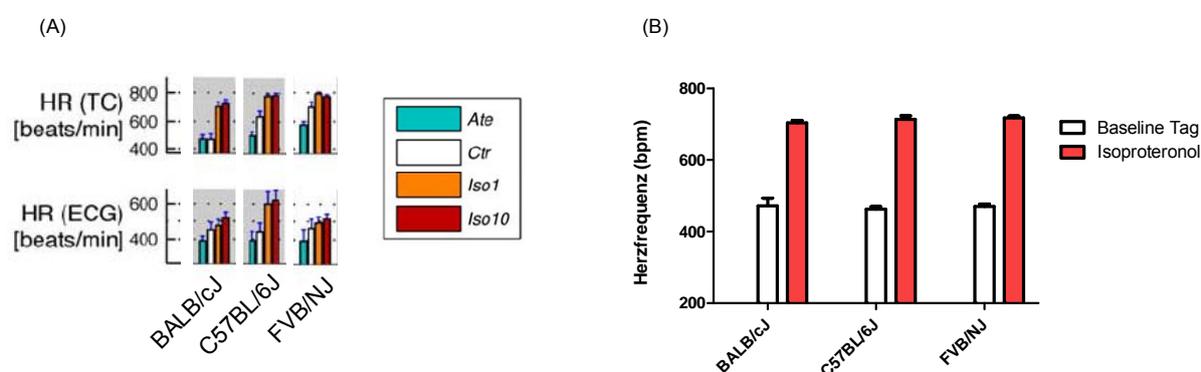
Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte die Hypothese bestätigt werden. Es zeigte sich eine eindeutige Linienabhängigkeit der Arrhythmogenität bei den Linien C57Bl/6J, FVB/NJ und BALB/cJ unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation. Weiterhin zeigten sich auch die Parameter Herzfrequenz und Aktivität als linienabhängig.

Die zuvor gestellten Fragen können folgendermaßen beantwortet werden:

1. Der zuvor im ersten Teil der Arbeit validierte Stresstest war zuverlässig und reproduzierbar durchführbar und zeigte sich sehr gut geeignet eine linienabhängige Arrhythmogenität von Mäusen nachzuweisen.
2. Es konnte eine liniengebundene basale Herzfrequenz nachgewiesen werden. Jedoch waren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterschiedlich zu denen von Berthonneche et al. (Berthonneche, Peter et al. 2009). Es zeigte sich, dass die Linie BALB/cJ in der vorliegenden Arbeit eine höhere basale Herzfrequenz und damit einen höheren Grundsympathikotonus aufwies als C57BL/6J und FVB/NJ. Weiterhin konnte kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem basalen Sympathikotonus und der Sympathikusaktivierung während des Stresstests hergestellt werden. Zwar zeigte sich bei BALB/cJ eine höhere basale Herzfrequenz und auch ein signifikanter Unterschied zu den anderen Linien während des Stresstests, jedoch war dieser vor allem durch den ausgeprägten Frequenzabfall zu Ende des Versuches hin bedingt. Die maximale Frequenzantwort und damit die maximale Erregbarkeit des Sympathikus zeigte sich bei allen Linien identisch.
3. Die Kenntnis der basalen Herzfrequenz ließ keine Rückschlüsse auf die Arrhythmogenität der betreffenden Linie zu. Es zeigte sich, dass die Linie mit dem höheren basalen Sympathikotonus (BALB/cJ) die wenigsten Arrhythmien entwickelte. Die Ursache hierfür ist jedoch nicht im basalen Sympathikotonus zu finden, sondern möglicherweise auf zellulärer Ebene angesiedelt, bedingt durch Unterschiede in der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Regulation zwischen den Mauslinien. Diese Beobachtung stimmt mit den anderen bisher zu dieser Thematik veröffentlichten Arbeiten überein (Gehrmann, Hammer et al. 2000; Hoit, Kiatchoosakun et al. 2002; Shusterman, Usiene et al. 2002; Faulx, Ernsberger et al. 2005; van Bogaert, Groenink et al. 2006; Berthonneche, Peter et al. 2009; Shah, Siedlecka et al. 2010).
4. Für die Induktion von ventrikulären Arrhythmien ist nicht die absolute Höhe der Herzfrequenz entscheidend, sondern die Dauer der maximalen Frequenzsteigerung. Es zeigten sich trotz maximaler Frequenzerhöhung unter NaCl im Gegensatz zu Isoproterenol kaum Arrhythmien. Weiterhin ermöglicht die Dauer der Frequenzerhöhung erst ventrikuläre Arrhythmien, jedoch ist im Linienvergleich die Gesamtzahl der Arrhythmien unabhängig hiervon. Denn C57BL/6J zeigte trotz einer kürzer andauernden Frequenzerhöhung mehr Arrhythmien als FVB/NJ, dessen Frequenz um mehr als 30 min länger erhöht war.

#### 4.2.5 Vergleich der basalen Herzfrequenz sowie der Herzfrequenz unter $\beta$ -adrenerger Stimulation mit anderen Arbeiten

Der Vergleich von den in dieser Arbeit generierten Ergebnisse mit denen von Berthonneche et al. zeigt deutliche Unterschiede (Berthonneche, Peter et al. 2009). So war in dieser Arbeit vor allem in der Nacht ein Unterschied in Bezug auf den basalen Sympathikotonus zu sehen. Die Messungen von Berthonneche et al. fanden jedoch nur tagsüber statt, weshalb in Abbildung 38 auch nur die Tag-Messungen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Der bei Berthonneche et al. gezeigte Unterschied zwischen den Linien konnte in Bezug auf den basalen Sympathikotonus in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Auch ergab sich bei der  $\beta$ -adrenergen Stimulation durch Isoproterenol kein linienabhängiger Unterschied in Bezug auf ihre maximale Frequenzantwort, wie es bei Berthonneche et al. der Fall war. Eine nahe liegende Erklärung wäre die divergierende Methodik beider Arbeiten. In Abbildung 38 ist ein deutlicher Unterschied der basalen Herzfrequenz zwischen beiden Messmethoden der Arbeit von Berthonneche et al. zu erkennen.



**Abbildung 38: Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit der Arbeit von Berthonneche et al. 2009**

(A) Modifiziert aus: Berthonneche, C., B. Peter, et al. (2009). "Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains." *PLoS One* 4(8): e6610. Dargestellt sind die Ergebnisse der Herzfrequenz unter Atenolol, Kontrolle, sowie 1 bzw. 10 mg/kg Isoproterenol im Linienvergleich sowie im Vergleich zwischen den Messmethoden Tail-cuff (TC) und Telemetrie in Anästhesie (ECG). (B) Dargestellt sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die Mittelwerte der Herzfrequenz am Tag während einer 24 h Baselinemessung und unter 2x2mg/kg Isoproterenol im Stresstest.

So zeigte beispielsweise BALB/cJ in der Tail-cuff Messung eine deutlich niedrigere Herzfrequenz als in der telemetrischen Messung unter Anästhesie. Bereits Kramer et al. zeigten, dass Anästhetika einen wesentlichen Einfluss auf kardiale Parameter haben. Unter Verwendung von Hypnorm® (Fentanyl) entwickelte sich bei den Mäusen eine Herzfrequenz von 350 - 400 bpm. Die Herzfrequenz lag damit noch unterhalb der im Schlaf (400-450 bpm) und in Ruhe (450-500 bpm) gemessenen Frequenz (Kramer, van Acker et al. 1993). Es ist durchaus möglich, dass bei Berthonneche et al. die Herzfrequenz von FVB/NJ und C57BL/6J durch die Anästhesie reduziert wurde. Die Ergebnisse sind folglich nicht vergleichbar. Auch ergab sich in der vorliegenden Arbeit durch eine  $\beta$ -adrenergen Stimulation mit Isoproterenol keine Differenz der Linien in Bezug auf ihre maximale Frequenzantwort, wie es bei Berthonneche et al. eindeutig der Fall war. Erneut wäre die unterschiedliche Methodik eine nahe liegende Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse beider Arbeiten. Dies belegen auch die Herzfrequenzen unter Baselinebedingungen sowie unter  $\beta$ -adrenergen Stimulation in weiteren Arbeiten, dargestellt in den Tabellen 12-14. Die meisten der hier zitierten Arbeiten verwendeten Telemetriesender, dies ist jedoch die einzige Gemeinsamkeit. Sie unterscheiden sich sowohl in den Zeiten der Messungen, als auch in der Länge der Messungen. Einige Arbeiten machen weiterhin keine Angaben über die genaue Datenerhebung. Die Baseline Herzfrequenz bei C57BL/6J schwankt im Vergleich zwischen 317 bpm, gemessen über subkutane Elektroden unter Anästhesie (Berul, Aronovitz et al. 1996) und 764 bpm, gemessen über Elektroden, die mit den Füßen der Tieren in Kontakt standen (Chu, Otero et al. 2001). Die Methodik von Chu et al. sollte so wenig invasiv wie möglich sein und den Einfluss von Operation oder Anästhesie vermeiden. Interessanterweise zeigt sich im Vergleich der Herzfrequenzen bei C57BL/6J und FVB/NJ, dass die Methode von Chu et al. die höchsten Frequenzen generiert. Der Vergleich zwischen den einzelnen Bestimmungsmethoden, wie Telemetrie, konventionellen EKG-Elektroden oder einem intravasalen Katheter ist nicht möglich. Selbst der Vergleich von telemetrisch erhobenen kardialen Parametern ist trotz einheitlicher Messmethodik kaum realisierbar. Denn nicht nur die Bestimmungsmethode allein, sondern auch die Versuchsbedingungen wie Tageszeit, Dauer und Aufzeichnungsfrequenz nehmen Einfluss auf die Ergebnisse. Dieses wäre einzig über eine einheitlich verwendete Messmethode zusammen mit einem einheitlichen Versuchsprotokoll erreichbar.

Baseline HR (bpm)	$\beta$ -adrenerge Stimulation HR (bpm)	Treatment Stimulation	Methodik	Dauer der Messung	Referenz
317	./.	./.	subkutane Elektroden in Anästhesie	./.	(Berul, Aronovitz et al. 1996)
501 $\pm$ 14	666 $\pm$ 24	Laufband	intravasaler Katheter	30 min	(Desai, Sato et al. 1997)
724	699	0.5 mg/kg i.p. Atropin	Telemetrie	Messung zwischen 9 und 15 Uhr für 30-60 min	(Gehrmann, Hammer et al. 2000)
764 $\pm$ 37	./.	./.	EKG über die Füße der Tiere	./.	(Chu, Otero et al. 2001)
433 $\pm$ 55	./.	./.	Echokardiographie unter Anästhesie	./.	(Hoit, Kiatchoosakun et al. 2002)
609 $\pm$ 22	~700	1 $\mu$ g Isoproterenol	Telemetrie	24 h Baseline 30 min Pharmaka	(Shusterman, Usiene et al. 2002)
754 $\pm$ 41	./.	./.	EKG Elektroden	./.	(Mouse Phenome Data Base 2003)
582 $\pm$ 29	./.	./.	Telemetrie	2 min alle 1 h	(Xiao, Fuchs et al. 2004)
~ 580	./.	./.	Telemetrie	Zwischen 9 und 11 Uhr für 20 min	(Howden, Liu et al. 2008)
637	781 784	1 mg Iso/ Tag (2 Wochen) 10 mg Iso/Tag (2 Wochen)	Tail-Cuff	Zwischen 14 und 17 Uhr An Tag 10,11 und 12	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
441	601 618	1 mg Iso/ Tag (2 Wochen) 10 mg Iso/Tag (2 Wochen)	Telemetrie in Anästhesie	Zwischen 14 und 17 Uhr an Tag 15	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
620	./.	./.	Telemetrie	5 min alle 3 h über 24 h	(Shah, Siedlecka et al. 2010)
<b>Tag: 472 Nacht: 545</b>	<b>714 (mean)</b>	<b>2x 2 mg/kg Iso mit 30 min Abstand i.p.</b>	<b>Telemetrie</b>	<b>Zwischen 10 und 11 Uhr 24 h für Baseline</b>	<b>Ergebnisse dieser Arbeit</b>

**Tabelle 12: C57BL/6J - Übersicht über die Unterschiede der murinen Herzfrequenz während der 24 h Baselinemessung sowie unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation in der Literatur**

Baseline HR (bpm)	$\beta$ -adrenerge Stimulation HR (bpm)	Treatment Stimulation	Methodik	Messung	Referenz
509 $\pm$ 12	693 $\pm$ 17	Laufband	Intravasaler Katheter	30 min	(Desai, Sato et al. 1997)
616	./.	./.	Telemetrie	24 h zu Beginn jeder Stunde	(Mitchell, Jeron et al. 1998)
619	./.	./.	Telemetrie	48 h	(London, Jeron et al. 1998)
794 $\pm$ 14	./.	./.	EKG über die Füße der Tiere	./.	(Chu, Otero et al. 2001)
680 $\pm$ 33	~ 730	1 $\mu$ g Iso	Telemetrie	24 h Baseline 30 min Pharmaka	(Shusterman, Usiene et al. 2002)
~ 560	./.	./.	Telemetrie	Zwischen 9 und 11 Uhr für 20 min	(Howden, Liu et al. 2008)
701	792 772	1 mg Iso/Tag (2 Wochen) 10 mg Iso/Tag (2 Wochen)	Tail-Cuff	Zwischen 14 und 17 Uhr An Tag 10,11 und 12	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
461	493 515	1 mg Iso/Tag (2 Wochen) 10 mg Iso/Tag (2 Wochen)	Telemetrie Anästhesie	Zwischen 14 und 17 Uhr an Tag 15	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
700	./.	./.	Telemetrie	5 min alle 3 h über 24 h	(Shah, Siedlecka et al. 2010)
Tag: 475 Nacht: 539	731 (mean)	2x 2 mg/kg Iso mit 30 min Abstand i.p.	Telemetrie	Zwischen 10 und 11 Uhr 24 h für Baseline	Ergebnisse dieser Arbeit

**Tabelle 13: FVB/NJ - Übersicht über die Unterschiede der murinen Herzfrequenz während der 24 h Baselinemessung sowie unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation in der Literatur**

Baseline HR (bpm)	$\beta$ -adrenerge Stimulation HR (bpm)	Treatment Stimulation	Methodik	Messung	Referenz
450-500	700-800	Wiegen, Handling	Telemetrie	./.	(Kramer, van Acker et al. 1993)
581 $\pm$ 97	./.	./.	EKG über die Füße der Tiere	./.	(Chu, Otero et al. 2001)
568 $\pm$ 4	./.	./.	Telemetrie	./.	(Berul, McConnell et al. 2001)
657 $\pm$ 51	./.	./.	EKG Elektroden	./.	(Mouse Phenome Data Base 2003)
~ 580	./.	./.	Telemetrie	Zwischen 9 und 11 Uhr für 20 min	(Howden, Liu et al. 2008)
468	712 727	1 mg Iso/Tag (2 Wochen) 10 mg Iso/Tag (2 Wochen)	Tail-Cuff	Zwischen 14 und 17 Uhr An Tag 10,11 und 12	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
451	474 517	1 mg Iso/Tag (2 Wochen) 10 mg Iso/Tag (2 Wochen)	Telemetrie in Anästhesie	Zwischen 14 und 17 Uhr an Tag 15	(Berthonneche, Peter et al. 2009)
580	./.	./.	Telemetrie	5 min alle 3 h über 24 h	(Shah, Siedlecka et al. 2010)
<b>Tag: 477 Nacht: 611</b>	<b>710 (mean)</b>	<b>2x 2 mg/kg Iso mit 30 min Abstand i.p.</b>	<b>Telemetrie</b>	<b>Zwischen 10 und 11 Uhr 24 h für Baseline</b>	<b>Ergebnisse dieser Arbeit</b>

**Tabelle 14: BALB/cJ - Übersicht über die Unterschiede der murinen Herzfrequenz während der 24 h Baselinemessung sowie unter einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation in der Literatur**

## 4.3 Diskussion der Methodik

### 4.3.1 Implantation und Verwendung von Telemetriesendern

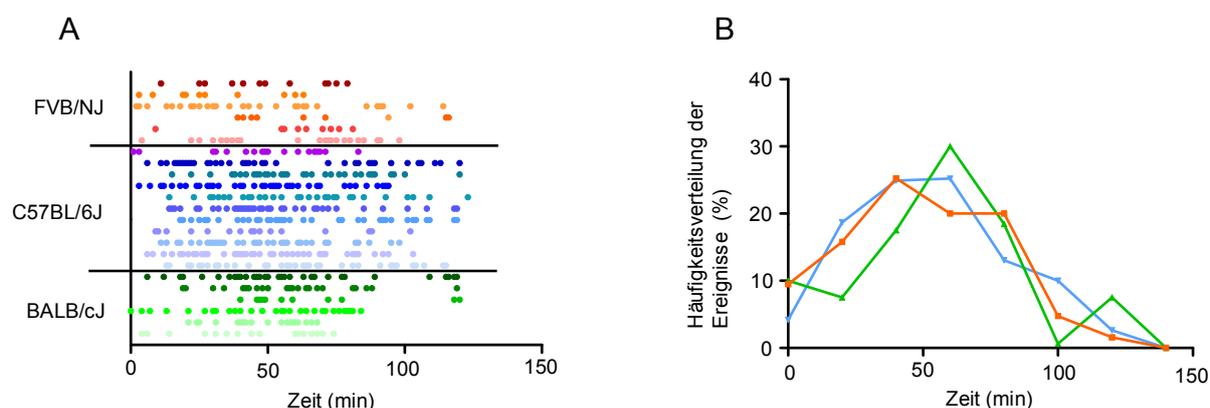
Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind Telemetriesender für die Aufzeichnung kardialer Parameter ohne eine direkte Beeinflussung der Mäuse durch ein Handling am besten geeignet. Im ersten Teil der Arbeit zeigte sich während der Operation und in der postoperativen Versorgung der Tiere, dass der größere der beiden Telemetriesender (DSI TA10ETA-F20) mit einem Gewicht von 4 g bei den Mäusen deutliche mehr postoperative Komplikationen verursachte. So wurde eine wesentlich höhere Rate an Nahtdehiszenzen beobachtet. Weiterhin versuchten die Tiere ihre Nähte aufzuknabbern und in einem Fall befand sich der Sender am nächsten Tag vollständig außerhalb der Körperhöhle. Diese Tiere mussten euthanasiert werden. Bei fast allen Tieren mussten innerhalb eines Zeitraumes von 2 bis 7 Tagen nach der Operation die Nähte unter Narkose revidiert werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sowohl die Größe, wie auch die Positionierung des Senders gewesen sein. Die subkutane Implantation auf der muskulären Bauchwand führte dazu, dass die anschließende Hautnaht direkt über dem Sender lag. Auch die Nahttechnik mit Einzelknopfnähten führte dazu, dass die Mäuse die Nähte wieder eröffnen konnten. Folglich wurden folgende Verbesserungen vorgenommen:

1. Es wurden kleinere und leichtere Sender (DSI TA11ETA-F10, Gewicht 2g) implantiert.
2. Die Lage des Senders wurde verändert und dieser subkutan auf dem Rücken der Tiere platziert.
3. Zum Verschluss der Wunde wurden zusätzlich zu den Einzelknopfnähten Klammern und Hautkleber verwendet.

Durch diese Modifikationen zeigte sich sowohl ein verbessertes postoperatives Outcome der Tiere, wie auch eine deutliche Reduktion der nötigen Wundrevisionen. Die Überlegenheit dieses Vorgehens proklamierten Thireau et al. in ihrer 2008 veröffentlichten Arbeit. Auch sie beschrieben eine höhere Überlebensrate der Tiere nach subkutaner Implantation der Sender auf den Rücken der Tiere (Thireau, Zhang et al. 2008) ebenso wie Baumans et al. (Baumans, Bouwknecht et al. 2001).

### 4.3.2 Stresstest mit Isoproterenol vs. Fön

Im ersten Teil der Arbeit zeigte sich, dass das zusätzliche Föhnen der Mäuse weder einen additiven Effekt auf die maximale Herzfrequenz noch auf die Anzahl der Arrhythmien hatte. Vielmehr entstanden durch das Föhnen Artefakte im EKG, welche zum einen die zuverlässige Auswertung durch das Programm ecgAuto® erschwerten. Zum anderen verlängerte sich die Auswertung durch die erforderliche manuelle Auswertung wesentlich. Durch den unverhältnismäßig großen Zeitaufwand und die fehlende Reproduzierbarkeit der Auswertung ist diese Methode für eine Arrhythmieinduktion nicht geeignet. Die Verwendung von Isoproterenol als Stressor ist hingegen sehr gut geeignet. Die Anwendung ist standardisiert und die individuelle Wirkung am Tier über eine gewichtsadaptierte Dosis sehr gut vergleichbar. Durch den Vergleich zwischen Isoproterenol und NaCl als Injektion im ersten Teil, unabhängig ob zusätzlich gefönt wurde oder nicht, konnte gezeigt werden, dass nur durch Isoproterenol eine ausreichend lang andauernde Herzfrequenzerhöhung zu erreichen war. Dabei zeigte sich der gewählte Auswertungszeitraum von 120 min nach der zweiten Injektion repräsentativ. Dies belegt Abbildung 39 aus dem Ergebnisteil. Hier zeigte sich deutlich, dass die meisten Arrhythmien bei allen Linien in einem Zeitraum von 30-90 min auftraten.



**Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung der Arrhythmien während des Stresstestes mit Isoproterenol**

Diese Abbildung entstammt der Abbildung 21. Vergleichend dargestellt ist die Auswertung Zeitpunkt zu denen die Arrhythmien während Stresstestes mit Isoproterenol auftraten. (A) Darstellung der einzelnen Ereignisse für jedes Tier einer Linie während des Auswertungszeitraumes von 150 min, beginnend mit der 2. Injektion von Isoproterenol. (B) Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Prozent während des Auswertungszeitraumes.

C57BL/6J n = 11, BALB/cJ n = 6 und FVB/NJ n = 6

### 4.3.3 Verbesserungsmöglichkeiten des etablierten Stresstestmodells

Die Implantation einer Pumpe, welche ferngesteuert eine definierte Isoproteronoldosis appliziert wäre eine denkbare Verbesserungsmöglichkeit. Hierdurch wären Einflussfaktoren wie das Handling und der Injektionsschmerz vollständig reduzierbar. Als weiteren Kritikpunkt ist zu nennen, dass in die Versuchsreihe eine zusätzliche Stresstestvariante, in Form von isoliertem Fönen, hinzugefügt werden könnte. Damit wäre zusätzlich nachweisbar, ob ein alleiniges Fönen als Stressfaktor für die Induktion von Arrhythmien ausreichend ist. Des Weiteren könnten die Mäuse über einen wesentlich längeren Zeitraum gefönt werden. Um einen direkten Effekt des Fönens auf die Induktion von Arrhythmien nachweisen zu können, müssten die Tiere über den gesamten Auswertungszeitraum gefönt werden. Als Gegenargument kann hier aufzuführen, dass die Auswertung des EKG durch die vom Fön ausgelösten Artefakte deutliche erschwert war und damit keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt würden. Weiterhin würden Versuche mit größeren Tierzahlen zu genaueren Ergebnissen führen und die Aussagekraft der Ergebnisse verstärken.

### 4.4 Relevanz der Arbeit

Diese Arbeit konnte zwei wesentliche Fragen beantworten. Durch den etablierten Stresstest mit Isoproteronol konnten zuverlässig und reproduzierbar Arrhythmien bei Mäusen induziert werden. Vor allem konnte gezeigt werden, dass Mäuse zum einen dazu in der Lage sind, über eine Aktivitätssteigerung des Sympathikus, Arrhythmien zu entwickeln und zum anderen, dass auch dieser kardiovaskuläre Parameter linienabhängig ist. Des Weiteren zeigte die Recherche zu dieser Thematik in anderen Arbeiten, dass ein Vergleich der Ergebnisse ohne eine einheitliche Methodik erschwert wird und teilweise auch nicht möglich ist. Dies unterstreicht die Relevanz einer einheitlichen Methode für die Bestimmung kardiovaskulärer Parameter an Mäusen. Die hier validierte Methode könnte einen Schritt in die richtige Richtung bedeuten. Die nachgewiesenen genetisch bedingten Unterschiede in Bezug auf die ventrikulären Arrhythmien bei Mäusen zeigen erneut wie groß der genetische Einfluss ist und wie wichtig die Auswahl einer Linie für das Ergebnis sein kann. Mäuse mit einem C57BL/6J bzw. FVB/NJ Hintergrund wären für eine Arbeit an ventrikulären Arrhythmien wesentlich besser geeignet als BALB/cJ. Die Berücksichtigung linienspezifischer Unterschiede von Mäusen in Bezug auf kardiovaskuläre Parameter ist letztendlich entscheidend für die Erforschung humaner Rhythmusstörungen. Bei der Auswahl einer Linie für ein geplantes Projekt sollte dieses Wissen in Zukunft noch stärker in den Fokus rücken.

## 5 Zusammenfassung

Ventrikuläre Arrhythmien nehmen in der kardialen Forschung auf Grund ihrer hohen Mortalitätsrate einen wichtigen Stellenwert ein. Die Maus dient dabei als wichtigstes Tiermodell für die Gewinnung weiterer Erkenntnisse. Bereits publizierte Daten belegen genetisch bedingte Unterschiede bei kardiovaskulären Parametern von Mäusen. Weiterhin existieren unterschiedliche Stresstestmodelle, welche über eine physische oder psychische Stressreaktion ventrikuläre Arrhythmien induzieren können. Doch nur sehr wenige berücksichtigen dabei den Einfluss des vegetativen Nervensystems.

In dieser Arbeit konnte ein zuverlässig reproduzierbarer Stresstest validiert werden, welcher durch die Verwendung von Isoproterenol als Noradrenalin-Derivat die Wirkung des Sympathikus imitiert und somit annähernd physiologisch wirkt. Durch eine Injektion von Isoproterenol konnte eine signifikante Aktivitätssteigerung des Sympathikus, gemessen an der Herzfrequenz, erreicht werden. Dabei stellte sich heraus, dass nicht die absolute Frequenzsteigerung, sondern die Dauer einer maximalen Sympathikusaktivität entscheidend ist für die Induktion signifikanter Arrhythmiezahlen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es linienspezifische Unterschiede zwischen den Linien C57BL/6J, FVB/NJ und BALB/cJ in Bezug auf ihre basale Herzfrequenz, als indirektes Maß für den Grundsympathikotonus, während eines 24 h Rhythmus gibt. Ebenso zeigten sich durch den Stresstest linienabhängige Unterschiede in Bezug auf die Arrhythmogenität der Mäuse. Die Linie BALB/cJ entwickelte dabei trotz eines wesentlich höheren basalen Sympathikotonus die wenigsten Arrhythmien, wohingegen C57BL/6J trotz eines geringeren Sympathikotonus die meisten Arrhythmien zeigte. Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen dem basalen Sympathikotonus und der Arrhythmogenität der gezeigten Linien hergestellt werden. Hier wäre ein möglicher Unterschied auf zellulärer Ebene, z.B. innerhalb der  $Ca^{2+}$ -Homöostase, in Betracht zu ziehen. Durch eine annähernd physiologische Stressmethode der Mäuse wurden im Vergleich zu anderen Arbeiten, welche den Einfluss des autonomen Nervensystems ausschlossen, gänzlich andere Ergebnisse erzielt. Die vorliegende Arbeit belegt, dass die Messmethodik und auch das Versuchsprotokoll entscheidend für das Ergebnis und die Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten sind. Schlussendlich zeigte sich, dass auch ventrikuläre Arrhythmien, als ein weiterer kardialer Parameter, abhängig sind von der Mauslinie und dies bei zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden sollte.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

µg	Mikrogramm
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	<i>Activity Unit</i> , Aktivitätseinheit
AUC	<i>Area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro Minute
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CPVT	katecholaminerge polymorphe Kammertachykardie
DAD	<i>Delayed afterdepolarization</i> , späte depolarisierende Nachpotenziale
EAD	<i>Early afterdepolarization</i> , frühe depolarisierende Nachpotenziale
EKG	Elektrokardiogramm
h	<i>hour</i> , Stunde
HCN-Kanäle	<i>hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i>
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
km	Kilometer
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
NAADP	Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat
NaCl	Natriumchlorid
PES	programmierte elektrische Stimulation
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
s	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
SERCA	<i>Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase</i> , Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
VES	ventrikuläre Extrasystole
VF	<i>ventricular fibrillation</i> , Kammerflimmern
VT	<i>ventricular tachycardia</i> , ventrikuläre Tachykardie

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Einfluss von Sympathikus und Parasympathikus auf das Schrittmacherpotenzial .....</b>	<b>3</b>
<b>Abbildung 2: Auswahl der Linien anhand des basalen Sympathikotonus .....</b>	<b>21</b>
<b>Abbildung 3: Skizze der Telemetriesenderplatzierung bei der Maus .....</b>	<b>25</b>
<b>Abbildung 4: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Vorversuche .....</b>	<b>26</b>
<b>Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf des Stresstestes .....</b>	<b>28</b>
<b>Abbildung 6: Ventrikuläre Extrasystole im murinen EKG .....</b>	<b>30</b>
<b>Abbildung 7: Bigeminus im murinen EKG .....</b>	<b>31</b>
<b>Abbildung 8: Trigemini im murinen EKG .....</b>	<b>31</b>
<b>Abbildung 9: Couplet im murinen EKG .....</b>	<b>32</b>
<b>Abbildung 10: Salve im murinen EKG .....</b>	<b>32</b>
<b>Abbildung 11: Monomorphe Ventrikuläre Tachykardie im murinen EKG .....</b>	<b>33</b>
<b>Abbildung 12: Ventrikuläre Fibrillation im murinen EKG .....</b>	<b>33</b>
<b>Abbildung 13: Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung für die Stresstestvalidierung .....</b>	<b>39</b>
<b>Abbildung 14: Ergebnisse der Arrhythmieauswertung für die Stresstestvalidierung Teil I .....</b>	<b>41</b>
<b>Abbildung 15: Ergebnisse der Arrhythmieauswertung für die Stresstestvalidierung Teil II .....</b>	<b>42</b>
<b>Abbildung 16: Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung für die 24 h Baselinemessung .....</b>	<b>44</b>
<b>Abbildung 17: Ergebnisse der Aktivitätsauswertung für die 24 h Baselinemessung .....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 18: Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung während des Stresstestes mit Isoproteronol .....</b>	<b>48</b>
<b>Abbildung 19: Ergebnisse der Aktivitätsauswertung während des Stresstestes mit Isoproteronol .....</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 20: Ergebnisse der Arrhythmieauswertung während des Stresstestes mit Isoproteronol .....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 21: Zeitpunkt der Arrhythmien während des Stresstestes unter Isoproteronol .....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 22: Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung während des Stresstestes mit NaCl .....</b>	<b>57</b>

<b>Abbildung 23: Ergebnisse der Aktivitätsauswertung während des Stresstestes mit NaCl.....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 24: Ergebnisse der Arrhythmieauswertung während des Stresstestes mit NaCl.....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 25: Vergleich der Herzfrequenzverläufe zwischen Isoproteronol und NaCl Teil I.....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 26: Vergleich der Herzfrequenzverläufe zwischen Isoproteronol und NaCl Teil II.....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 27: Einzelauswertungen der Herzfrequenz zwischen Isoproteronol und NaCl.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 28: Vergleich der Aktivitätsverläufe zwischen Isoproteronol und NaCl Teil I.....</b>	<b>67</b>
<b>Abbildung 29: Vergleich der Aktivitätsverläufe zwischen Isoproteronol und NaCl Teil II.....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 30: Einzelauswertungen der Aktivität zwischen Isoproteronol und NaCl.....</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 31: Ausschnitt aus Abbildung 13, Herzfrequenzverlauf im Vergleich von 4 Stressvarianten.....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 32: Einfluss des Handling auf Herzfrequenz und Aktivität zwischen Linien.....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 33: Darstellung eines Artefaktes während der Nutzung eines Föns.....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildung 34: Darstellung von Herzfrequenz und Aktivität während der 24 Baseline.....</b>	<b>78</b>
<b>Abbildung 35: Zirkadianer 24 h-Rhythmus von Körpertemperatur (a), Herzfrequenz (b) und Aktivität (c) im Linienvergleich von C57BL/6J, Swiss Webster und 129S6.....</b>	<b>79</b>
<b>Abbildung 36: In vivo Baselinemessung hämodynamischer Funktionen im Linienvergleich.....</b>	<b>80</b>
<b>Abbildung 37: Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung sowie des zirkadianen Rhythmus im Vergleich zwischen C57BL/6J, BALB/cJ, FVN/nJ und 129S6.....</b>	<b>81</b>
<b>Abbildung 38: Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit der Arbeit von Berthonneche et al. 2009.....</b>	<b>91</b>

<b>Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung der Arrhythmien während des Stresstestes mit Isoproteronol</b> .....	97
---	----

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Murine basale Herzfrequenz im Stressmodellvergleich unterschiedlicher Arbeiten</b> .....	18
<b>Tabelle 2: Randomisierte Zuteilung der Mäuse für jede der 4 Stresstestvarianten</b> .....	27
<b>Tabelle 3: Kurzfristige Wirkung von Isoproteronol im Literaturvergleich</b> .....	72
<b>Tabelle 4: Langfristige Wirkung von Isoproteronol im Literaturvergleich</b> .....	73
<b>Tabelle 5: Vergleich der Mittelwerte für die Herzfrequenz vor und der die maximale Herzfrequenz nach Injektion von Isoproteronol</b> .....	74
<b>Tabelle 6: Vergleich der Arrhythmien den verschiedenen Stresstestvarianten</b> .....	75
<b>Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung unter Isoproteronol</b> .....	83
<b>Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Herzfrequenzauswertung unter NaCl</b> .....	83
<b>Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Aktivitätsauswertung unter Isoproteronol</b> .....	84
<b>Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Aktivitätsauswertung unter NaCl</b> .....	84
<b>Tabelle 11: Zusammenfassung der mittleren Arrhythmiezahl unter Isoproteronol und NaCl</b> .....	86
<b>Tabelle 12: C57BL/6J - Übersicht über die Unterschiede der murinen Herzfrequenz während der 24 h Baselinemessung sowie unter einer <math>\beta</math>-adrenergen Stimulation in der Literatur</b> .....	93
<b>Tabelle 13: FVB/NJ - Übersicht über die Unterschiede der murinen Herzfrequenz während der 24 h Baselinemessung sowie unter einer <math>\beta</math>-adrenergen Stimulation in der Literatur</b> .....	94
<b>Tabelle 14: BALB/cJ - Übersicht über die Unterschiede der murinen Herzfrequenz während der 24 h Baselinemessung sowie unter einer <math>\beta</math>-adrenergen Stimulation in der Literatur</b> .....	95

## 6.4 Publikation

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-mediated calcium signaling and arrhythmias in the heart evoked by  $\beta$ -adrenergic stimulation.

Nebel M, Schwoerer AP, Warszta D, Siebrands CC, **Limbrock AC**, Swarbrick JM, Fliegert R, Weber K, Bruhn S, Hohenegger M, Geisler A, Herich L, Schlegel S, Carrier L, Eschenhagen T, Potter BV, Ehmke H, Guse AH.

J Biol Chem. 2013 May 31;288(22):16017-30. doi: 10.1074/jbc.M112.441246. Epub 2013 Apr 5.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahlquist, R. P. (1948). "A study of the adrenotropic receptors." *Am J Physiol* **153**(3): 586-600.
- An, R. H., M. P. Davies, et al. (1996). "Developmental changes in beta-adrenergic modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in embryonic mouse heart." *Circ Res* **78**(3): 371-378.
- Balasubramaniam, R., A. A. Grace, et al. (2003). "Electrogram prolongation and nifedipine-suppressible ventricular arrhythmias in mice following targeted disruption of KCNE1." *J Physiol* **552**(Pt 2): 535-546.
- Barnabei, M. S., N. J. Palpant, et al. (2010). "Influence of genetic background on ex vivo and in vivo cardiac function in several commonly used inbred mouse strains." *Physiol Genomics* **42A**(2): 103-113.
- Baumans, V., J. A. Bouwknecht, et al. (2001). "Intra-Abdominal Transmitter Implantation in Mice: Effects on Behaviour and Body Weight." *Animal Welfare* **10**: 291-302.
- Bergmann, S. R., R. E. Clark, et al. (1979). "An improved isolated heart preparation for external assessment of myocardial metabolism." *Am J Physiol* **236**(4): H644-661.
- Berthonneche, C., B. Peter, et al. (2009). "Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains." *PLoS One* **4**(8): e6610.
- Berul, C. I., M. J. Aronovitz, et al. (1996). "In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse." *Circulation* **94**(10): 2641-2648.
- Berul, C. I., B. K. McConnell, et al. (2001). "Ventricular arrhythmia vulnerability in cardiomyopathic mice with homozygous mutant Myosin-binding protein C gene." *Circulation* **104**(22): 2734-2739.
- Bijl, M. J., L. E. Visser, et al. (2009). "Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in beta-blocker users." *Clin Pharmacol Ther* **85**(1): 45-50.
- Blizard, D. A. and R. Welty (1971). "Cardiac activity in the mouse: strain differences." *J Comp Physiol Psychol* **77**(2): 337-344.
- Brandenburger, M., J. Wenzel, et al. (2012). "Organotypic slice culture from human adult ventricular myocardium." *Cardiovasc Res* **93**(1): 50-59.
- Brooks, D., R. L. Horner, et al. (1996). "Validation of a telemetry system for long-term measurement of blood pressure." *J Appl Physiol* (1985) **81**(2): 1012-1018.
- Bround, M. J., P. Asghari, et al. (2012). "Cardiac ryanodine receptors control heart rate and rhythmicity in adult mice." *Cardiovasc Res* **96**(3): 372-380.
- Burden, D. T. and M. W. Parkes (1975). "An investigation of the tachycardia produced by intracerebro-ventricular injections of isoprenaline in mice." *Br J Pharmacol* **53**(3): 341-347.
- Calligaris, S. D., M. Ricca, et al. (2013). "Cardiac stress test induced by dobutamine and monitored by cardiac catheterization in mice." *J Vis Exp*(72).
- Cerrone, M., B. Colombi, et al. (2005). "Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor." *Circ Res* **96**(10): e77-82.
- Cesarovic, N., F. Nicholls, et al. (2010). "Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice." *Lab Anim* **44**(4): 329-336.

- Cheng, C. F., T. B. Kuo, et al. (2014). "Abnormal cardiac autonomic regulation in mice lacking ASIC3." *Biomed Res Int* **2014**: 709159.
- Cheng, H., M. R. Lederer, et al. (1996). "Calcium sparks and  $[Ca^{2+}]_i$  waves in cardiac myocytes." *Am J Physiol* **270**(1 Pt 1): C148-159.
- Cheng, H. and W. J. Lederer (2008). "Calcium sparks." *Physiol Rev* **88**(4): 1491-1545.
- Chu, V., J. M. Otero, et al. (2001). "Method for non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice." *BMC Physiol* **1**: 6.
- Clusin, W., D. C. Spray, et al. (1975). "Activation of a voltage-insensitive conductance by inward calcium current." *Nature* **256**(5516): 425-427.
- Cohn, M. (2010). Alternatives to animal testing gaining Ground. *The Baltimore Sun*.
- Curran, J., M. J. Hinton, et al. (2007). "Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase." *Circ Res* **100**(3): 391-398.
- Curtis, M. J., J. C. Hancox, et al. (2013). "The Lambeth Conventions (II): guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias." *Pharmacol Ther* **139**(2): 213-248.
- Cushman, W. C., D. J. Reda, et al. (2000). "Regional and racial differences in response to antihypertensive medication use in a randomized controlled trial of men with hypertension in the United States. Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents." *Arch Intern Med* **160**(6): 825-831.
- de Waard, M. C., J. van der Velden, et al. (2007). "Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction." *Circ Res* **100**(7): 1079-1088.
- Desai, K. H., R. Sato, et al. (1997). "Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease." *Am J Physiol* **272**(2 Pt 2): H1053-1061.
- Dhingra, D. and R. Chhillar (2012). "Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice." *Pharmacol Rep* **64**(4): 796-807.
- DiFrancesco, D. and P. Tortora (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." *Nature* **351**(6322): 145-147.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, et al. (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." *J Embryol Exp Morphol* **87**: 27-45.
- Doevendans, P. A., M. J. Daemen, et al. (1998). "Cardiovascular phenotyping in mice." *Cardiovasc Res* **39**(1): 34-49.
- Douglas, J. G., G. L. Bakris, et al. (2003). "Management of high blood pressure in African Americans: consensus statement of the Hypertension in African Americans Working Group of the International Society on Hypertension in Blacks." *Arch Intern Med* **163**(5): 525-541.
- Eickhoff, B. (2000). "Transgene Tiere knock-out Mäuse." *BioTec*.
- Fabiato, A. (1985). "Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell." *J Gen Physiol* **85**(2): 247-289.
- Fabritz, L., D. Damke, et al. (2010). "Autonomic modulation and antiarrhythmic therapy in a model of long QT syndrome type 3." *Cardiovasc Res* **87**(1): 60-72.

- Faggioni, M., H. S. Hwang, et al. (2013). "Accelerated sinus rhythm prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and in patients." Circ Res **112**(4): 689-697.
- Faulx, M. D., P. Ernsberger, et al. (2005). "Strain-dependent beta-adrenergic receptor function influences myocardial responses to isoproterenol stimulation in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(1): H30-36.
- Ferrier, G. R., J. H. Saunders, et al. (1973). "A cellular mechanism for the generation of ventricular arrhythmias by acetylstrophanthidin." Circ Res **32**(5): 600-609.
- Friedman, B. J., O. Y. Grinberg, et al. (1997). "Myocardial oxygen tension in isolated erythrocyte-perfused rat hearts and comparison with crystalloid media." J Mol Cell Cardiol **29**(10): 2855-2858.
- Galindo-Tovar, A. and A. J. Kaumann (2008). "Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac beta(1)-adrenoceptors." Br J Pharmacol **153**(4): 710-720.
- Galletly, D. C., A. M. Westenberg, et al. (1994). "Effect of halothane, isoflurane and fentanyl on spectral components of heart rate variability." Br J Anaesth **72**(2): 177-180.
- Garrey, W. (1914). "The nature of fibrillary contraction of the heart: its relation to tissue mass and form." Am J Physiol **33**: 397-414.
- Gehrmann, J., P. E. Hammer, et al. (2000). "Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(2): H733-740.
- Gillies, M., R. Bellomo, et al. (2005). "Bench-to-bedside review: Inotropic drug therapy after adult cardiac surgery -- a systematic literature review." Crit Care **9**(3): 266-279.
- Goldbarg, A. N., H. K. Hellerstein, et al. (1968). "Electrocardiogram of the normal mouse, *Mus musculus*: general considerations and genetic aspects." Cardiovasc Res **2**(1): 93-99.
- Gottlieb, S. S., R. J. McCarter, et al. (1998). "Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction." N Engl J Med **339**(8): 489-497.
- Gross, V. and F. C. Luft (2003). "Exercising restraint in measuring blood pressure in conscious mice." Hypertension **41**(4): 879-881.
- Grubb, S. C., C. J. Bult, et al. (2014). "Mouse phenome database." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D825-834.
- Grupp, I. L., A. Subramaniam, et al. (1993). "Comparison of normal, hypodynamic, and hyperdynamic mouse hearts using isolated work-performing heart preparations." Am J Physiol **265**(4 Pt 2): H1401-1410.
- Guimaraes, S. and D. Moura (2001). "Vascular adrenoceptors: an update." Pharmacol Rev **53**(2): 319-356.
- Guo, Y. F. and P. K. Stein (2003). "Circadian rhythm in the cardiovascular system: chronocardiology." Am Heart J **145**(5): 779-786.
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.
- Han, G. S. (2013). "Endurance exercise effects on cardiac hypertrophy in mice." J Phys Ther Sci **25**(12): 1525-1527.
- Herold, G., Ed. (2011). Innere Medizin.
- Hoit, B. D., S. Kiatchoosakun, et al. (2002). "Naturally occurring variation in cardiovascular traits among inbred mouse strains." Genomics **79**(5): 679-685.

- Howden, R., E. Liu, et al. (2008). "The genetic contribution to heart rate and heart rate variability in quiescent mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(1): H59-68.
- Huntgeburth, M., K. Tiemann, et al. (2011). "Transforming growth factor beta(1) oppositely regulates the hypertrophic and contractile response to beta-adrenergic stimulation in the heart." PLoS One **6**(11): e26628.
- Imanishi, S. and B. Surawicz (1976). "Automatic activity in depolarized guinea pig ventricular myocardium. Characteristics and mechanisms." Circ Res **39**(6): 751-759.
- James, J. F., T. E. Hewett, et al. (1998). "Cardiac physiology in transgenic mice." Circ Res **82**(4): 407-415.
- Jelinek, M. V. and B. Lown (1974). "Exercise stress testing for exposure of cardiac arrhythmia." Prog Cardiovasc Dis **16**(5): 497-522.
- Jeron, A., G. F. Mitchell, et al. (2000). "Inducible polymorphic ventricular tachyarrhythmias in a transgenic mouse model with a long Q-T phenotype." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(6): H1891-1898.
- Jiang, D., B. Xiao, et al. (2002). "Enhanced basal activity of a cardiac Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) mutant associated with ventricular tachycardia and sudden death." Circ Res **91**(3): 218-225.
- Johansson, C., B. Vennstrom, et al. (1998). "Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor-alpha1-deficient mice is an intrinsic defect." Am J Physiol **275**(2 Pt 2): R640-646.
- Kaplan, M. L., Y. Cheslow, et al. (1994). "Cardiac adaptations to chronic exercise in mice." Am J Physiol **267**(3 Pt 2): H1167-1173.
- Karow, Ed. (2011). Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
- Kashimura, T., S. J. Briston, et al. (2010). "In the RyR2(R4496C) mouse model of CPVT, beta-adrenergic stimulation induces Ca waves by increasing SR Ca content and not by decreasing the threshold for Ca waves." Circ Res **107**(12): 1483-1489.
- Killeen, M. J., G. Thomas, et al. (2008). "Mouse models of human arrhythmia syndromes." Acta Physiol (Oxf) **192**(4): 455-469.
- Kirchhof, P., L. Fabritz, et al. (2004). "Ventricular arrhythmias, increased cardiac calmodulin kinase II expression, and altered repolarization kinetics in ANP receptor deficient mice." J Mol Cell Cardiol **36**(5): 691-700.
- Kirchhof, P., L. Fabritz, et al. (2006). "Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice." Circulation **114**(17): 1799-1806.
- Kirchhof, P., J. Klimas, et al. (2007). "Stress and high heart rate provoke ventricular tachycardia in mice expressing triadin." J Mol Cell Cardiol **42**(5): 962-971.
- Knollmann, B. C., P. Kirchhof, et al. (2003). "Familial hypertrophic cardiomyopathy-linked mutant troponin T causes stress-induced ventricular tachycardia and Ca<sup>2+</sup>-dependent action potential remodeling." Circ Res **92**(4): 428-436.
- Kramer, K., S. A. van Acker, et al. (1993). "Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice." J Pharmacol Toxicol Methods **30**(4): 209-215.
- Kramer, K., H. van de Weerd, et al. (2004). "Effect of conditioning on the increase of heart rate and body temperature provoked by handling in the mouse." Altern Lab Anim **32 Suppl 1A**: 177-181.
- Kurnik, D., C. Li, et al. (2008). "Beta-1-adrenoceptor genetic variants and ethnicity independently affect response to beta-blockade." Pharmacogenet Genomics **18**(10): 895-902.

- Lederer, W. J. and R. W. Tsien (1976). "Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres." J Physiol **263**(2): 73-100.
- Leenhardt, A., V. Lucet, et al. (1995). "Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients." Circulation **91**(5): 1512-1519.
- Lehnart, S. E., M. Mongillo, et al. (2008). "Leaky Ca<sup>2+</sup> release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice." J Clin Invest **118**(6): 2230-2245.
- Lehnart, S. E., X. H. Wehrens, et al. (2005). "Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias." Cell **123**(1): 25-35.
- Levine, J. H., J. F. Spear, et al. (1985). "Cesium chloride-induced long QT syndrome: demonstration of afterdepolarizations and triggered activity in vivo." Circulation **72**(5): 1092-1103.
- Li, N. and X. H. Wehrens (2010). "Programmed electrical stimulation in mice." J Vis Exp(39).
- Lightfoot, J. T., L. Leamy, et al. (2010). "Strain screen and haplotype association mapping of wheel running in inbred mouse strains." J Appl Physiol (1985) **109**(3): 623-634.
- Liu, H., X. Xing, et al. (2013). "The expression level of myocardial beta1-adrenergic receptor affects metoprolol antihypertensive effects: a novel mechanism for interindividual difference." Med Hypotheses **81**(1): 71-72.
- Liu, J., Z. Q. Liu, et al. (2006). "beta1-Adrenergic receptor polymorphisms influence the response to metoprolol monotherapy in patients with essential hypertension." Clin Pharmacol Ther **80**(1): 23-32.
- London, B., A. Jeron, et al. (1998). "Long QT and ventricular arrhythmias in transgenic mice expressing the N terminus and first transmembrane segment of a voltage-gated potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2926-2931.
- Lorenz, J. N. and J. Robbins (1997). "Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse." Am J Physiol **272**(3 Pt 2): H1137-1146.
- Lüderitz, Ed. (1993). Geschichte der Herzrhythmusstörungen, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Lujan, H. L. and S. E. DiCarlo (2014). "Cardiac electrophysiology and the susceptibility to sustained ventricular tachycardia in intact, conscious mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **306**(8): H1213-1221.
- Luxembourg B., K. M., Lindhoff-Last E. (2007). "Basiswissen Gerinnungslabor." Deutsches Ärzteblatt Heft **21**.
- Marks, A. R. (2002). "Clinical implications of cardiac ryanodine receptor/calcium release channel mutations linked to sudden cardiac death." Circulation **106**(1): 8-10.
- Materson, B. J. (2004). "Variability in response to antihypertensive drug treatment." Hypertension **43**(6): 1166-1167.
- McDougall, S. J., A. J. Lawrence, et al. (2005). "Differential cardiovascular responses to stressors in hypertensive and normotensive rats." Exp Physiol **90**(1): 141-150.
- McDougall, S. J., J. R. Paull, et al. (2000). "Restraint stress : differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats." Hypertension **35**(1 Pt 1): 126-129.
- Meijer, M. K., B. M. Spruijt, et al. (2006). "Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice." Lab Anim **40**(4): 382-391.

- Mills, P. A., D. A. Huetteman, et al. (2000). "A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry." J Appl Physiol (1985) **88**(5): 1537-1544.
- Mitchell, G. F., A. Jeron, et al. (1998). "Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse." Am J Physiol **274**(3 Pt 2): H747-751.
- Morimoto, S., O. U. J, et al. (2009). "Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca<sup>2+</sup> leak in mouse heart." Biochem Biophys Res Commun **390**(1): 87-92.
- Mouse Phenome Data Base. (2003). "Mouse Phenome Data Base." Retrieved 01.11.2014, from <http://phenome.jax.org/>.
- Nebel, M., A. P. Schwoerer, et al. (2013). "Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-mediated calcium signaling and arrhythmias in the heart evoked by beta-adrenergic stimulation." J Biol Chem **288**(22): 16017-16030.
- Norman, R. A., Jr., T. G. Coleman, et al. (1981). "Continuous monitoring of arterial pressure indicates sinoaortic denervated rats are not hypertensive." Hypertension **3**(1): 119-125.
- Nunn, N., C. H. Feetham, et al. (2013). "Elevated blood pressure, heart rate and body temperature in mice lacking the XLalphas protein of the Gnas locus is due to increased sympathetic tone." Exp Physiol **98**(10): 1432-1445.
- O'Leary, T. P., R. K. Gunn, et al. (2013). "What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice?" Behav Genet **43**(1): 34-50.
- Osadchii, O. E. (2007). "Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects." Heart Fail Rev **12**(1): 66-86.
- Pape, Kurtz, et al. (2014). Physiologie, Thieme Verlagsgruppe.
- Plante, E., D. Lachance, et al. (2005). "Dobutamine stress echocardiography in healthy adult male rats." Cardiovasc Ultrasound **3**: 34.
- Prenner, B. M. (2008). "Role of long-acting beta2-adrenergic agonists in asthma management based on updated asthma guidelines." Curr Opin Pulm Med **14**(1): 57-63.
- Priori, S. G., C. Napolitano, et al. (2002). "Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." Circulation **106**(1): 69-74.
- Rau, T., H. Wuttke, et al. (2009). "Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study." Clin Pharmacol Ther **85**(3): 269-272.
- Reichelt, M. E., L. Willems, et al. (2009). "Cardiac and coronary function in the Langendorff-perfused mouse heart model." Exp Physiol **94**(1): 54-70.
- Sabir, I. N., J. A. Fraser, et al. (2007). "The contribution of refractoriness to arrhythmic substrate in hypokalemic Langendorff-perfused murine hearts." Pflugers Arch **454**(2): 209-222.
- Sandeep Mahajan, S. T. (2002). "Stress Test for the Kidney." Journal, Indian Academy of Clinical Medicine **Vol. 3, No. 2**: 189-192.
- Schlager, G. (1966). "Systolic blood pressure in eight inbred strains of mice." Nature **212**(5061): 519-520.
- Schmechel, A., M. Grimm, et al. (2009). "Treatment with atorvastatin partially protects the rat heart from harmful catecholamine effects." Cardiovasc Res **82**(1): 100-106.
- Shah, A. P., U. Siedlecka, et al. (2010). "Genetic background affects function and intracellular calcium regulation of mouse hearts." Cardiovasc Res **87**(4): 683-693.
- Shan, J., A. Kushnir, et al. (2010). "Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice." J Clin Invest **120**(12): 4388-4398.

- Shusterman, V., I. Usiene, et al. (2002). "Strain-specific patterns of autonomic nervous system activity and heart failure susceptibility in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(6): H2076-2083.
- Stapleton, M. P. (1997). "Sir James Black and propranolol. The role of the basic sciences in the history of cardiovascular pharmacology." Tex Heart Inst J **24**(4): 336-342.
- Stokoe, K. S., R. Balasubramaniam, et al. (2007). "Effects of flecainide and quinidine on arrhythmogenic properties of Scn5a<sup>+/-</sup> murine hearts modelling the Brugada syndrome." J Physiol **581**(Pt 1): 255-275.
- Stull, L. B., N. Hiranandani, et al. (2006). "Murine strain differences in contractile function are temperature- and frequency-dependent." Pflugers Arch **452**(2): 140-145.
- Tada, M. and A. M. Katz (1982). "Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma." Annu Rev Physiol **44**: 401-423.
- Thandroyen, F. T., A. C. Morris, et al. (1991). "Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells." Circ Res **69**(3): 810-819.
- Thireau, J., B. L. Zhang, et al. (2008). "Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide." Exp Physiol **93**(1): 83-94.
- Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell **51**(3): 503-512.
- Vaidya, D., G. E. Morley, et al. (1999). "Reentry and fibrillation in the mouse heart. A challenge to the critical mass hypothesis." Circ Res **85**(2): 174-181.
- van Acker, S. A., K. Kramer, et al. (1995). "Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity." Br J Pharmacol **115**(7): 1260-1264.
- van Bogaert, M. J., L. Groenink, et al. (2006). "Mouse strain differences in autonomic responses to stress." Genes Brain Behav **5**(2): 139-149.
- Van Vliet, B. N., L. L. Chafe, et al. (2000). "Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure." J Pharmacol Toxicol Methods **44**(2): 361-373.
- Verheule, S., T. Sato, et al. (2004). "Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1." Circ Res **94**(11): 1458-1465.
- Wahlsten, D., P. Metten, et al. (2003). "A rating scale for wildness and ease of handling laboratory mice: results for 21 inbred strains tested in two laboratories." Genes Brain Behav **2**(2): 71-79.
- Waldeyer, C., L. Fabritz, et al. (2009). "Regional, age-dependent, and genotype-dependent differences in ventricular action potential duration and activation time in 410 Langendorff-perfused mouse hearts." Basic Res Cardiol **104**(5): 523-533.
- Walker, M. J., M. J. Curtis, et al. (1988). "The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion." Cardiovasc Res **22**(7): 447-455.
- Wang, L., S. Swirp, et al. (2000). "Age-dependent response of the electrocardiogram to K(+) channel blockers in mice." Am J Physiol Cell Physiol **278**(1): C73-80.
- Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, et al. (2003). "FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death." Cell **113**(7): 829-840.
- Werdich, A. A., F. Baudenbacher, et al. (2007). "Polymorphic ventricular tachycardia and abnormal Ca<sup>2+</sup> handling in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2202-2211.

- Wit, A. L. and P. F. Cranefield (1977). "Triggered and automatic activity in the canine coronary sinus." Circ Res **41**(4): 434-445.
- Xiao, H. D., S. Fuchs, et al. (2004). "Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death." Am J Pathol **165**(3): 1019-1032.
- Yuan, Q., G. C. Fan, et al. (2007). "Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity." Circulation **115**(3): 300-309.
- Zineh, I., A. L. Beitelshees, et al. (2004). "Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension." Clin Pharmacol Ther **76**(6): 536-544.

## 8 Lebenslauf

### Angaben zur Person:

Name: Ann-Christin Katharina Limbrock  
Geburtstag: 23.02.1987  
Geburtstort: Münster

### Vermerk:

Der vollständige Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version dieser Dissertation entfernt.

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heimo Ehmke für die Bereitstellung des Themas, der benötigten Geräte und Materialien und besonders für das entgegengebrachte Vertrauen in meine Person.

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. Alexander Schwoerer für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie durchzuführen. Sein außerordentliches Engagement, seine ständige Motivation und die vielen fruchtbaren Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich für die gute Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Guse, Institut Biochemie und molekulare Zellbiologie, bedanken, durch welche eine erfolgreiche Publikation entstand.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Kollegen des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie für die kollegiale Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre, vor allem während der Teambesprechungen und Kaffeepausen. Mein besonderer Dank gilt dabei Marisa Jelinek, Dipl. Ing. Peter Bassalay, Dr. Anika Seniuk und Claudia Kollien für die herzliche Aufnahme in das Team, die gute Einarbeitung, sowie die Unterstützung in der Laborarbeit und die wertvollen Ratschläge.

Ich danke meinen Eltern für die Ermöglichung meiner Ausbildung und ihrer bedingungslosen Unterstützung und Liebe auch in schwierigen Zeiten und widme ihnen diese Arbeit.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Matthias für die liebevolle Unterstützung und das Vertrauen in allen Phasen dieser Arbeit bedanken.

## 10 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Validierung eines Stresstestes  
an wachen Mäusen  
für die Induktion von ventrikulären Arrhythmien  
im Mauslinienvergleich

im Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung durch Prof. Dr. Heimo Ehmke und Betreuung durch PD. Dr. Alexander Schwoerer ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, Dezember 2014

.....  
Ann-Christin Limbrock