

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Kardiologie  
der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg

## **Bedeutung des intrinsischen kardialen autonomen Nervensystems für die ventrikuläre Elektrophysiologie und Arrhythmieinduzierbarkeit**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Stephan Jürgen Heinrich Angendoehr  
aus Nettetal

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.10.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Meyer, M.A.**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Heimo Ehmke**

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
2.1	Physiologische Grundlagen.....	2
2.1.1	Grundlagen der autonomen Regulation .....	2
2.1.1.1	Sympathikus.....	2
2.1.1.2	Parasympathikus.....	3
2.1.1.3	Intrinsische Ganglienplexus .....	6
2.1.2	Autonome kardiale Innervation und Regulation .....	6
2.1.3	Das intrinsische kardiale autonome Nervensystem .....	8
2.1.3.1	Anatomischer Aufbau .....	8
2.1.3.1	Funktion.....	12
2.1.4	Einfluss der autonomen Innervation auf die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien.....	13
2.2	Methodische Grundlagen .....	15
2.2.1	Das Elektrokardiogramm der Maus.....	15
2.2.2	Elektrophysiologische Untersuchung des Herzens .....	17
2.2.3	Das isolierte Herz nach Oscar Langendorff .....	18
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
3.1	Tiermodell und Versuchstierhandhabung.....	20
3.2	Apparativer Versuchsaufbau .....	21
3.3	Software .....	25
3.3.1	LabChart 8.1.....	25
3.3.2	Mc_Stimulus II.....	25
3.4	Stimulationsprotokoll .....	25
3.5	Narkose, Monitoring und Instrumentierung .....	27
3.5.1	Untersuchung der Maus <i>in-vivo</i> .....	27
3.5.2	Untersuchung des isolierten Herzens .....	31
3.6	Versuchsablauf.....	38
3.6.1	Untersuchung der Maus <i>in-vivo</i> .....	38
3.6.2	Untersuchung des isolierten Herzens .....	38
3.7	Auswertung des Oberflächen-Elektrokardiogramms.....	40
3.8	Arrhythmiequantifizierung.....	42
3.9	Statistik .....	45
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
4.1	Elektrophysiologische Untersuchung der Maus <i>in-vivo</i> .....	46
4.1.1	Einfluss der Körperkerntemperatur auf die kardiale Elektrophysiologie.....	47
4.1.2	Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die kardiale Elektrophysiologie <i>in-vivo</i> ...	49
4.1.3	Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die ventrikuläre Repolarisation <i>in-vivo</i> ...	51
4.1.4	Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien <i>in-vivo</i> .....	51
4.2	Elektrophysiologische Untersuchung des isolierten Herzens.....	52
4.2.1	Einfluss einer kardialen Denervation auf die ventrikuläre Repolarisation des isolierten Herzens .....	53
4.2.2	Einfluss einer kardialen Denervation auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien im isolierten Herzen .....	57
4.3	Quantifizierung induzierter ventrikulärer Arrhythmien .....	60
4.3.1	Arrhythmiequantifizierung <i>in-vivo</i> .....	60
4.3.2	Arrhythmiequantifizierung <i>ex-vivo</i> .....	61
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>62</b>
5.1	Elektrophysiologische Untersuchung der Maus <i>in-vivo</i> .....	63
5.1.1	Einfluss der Körperkerntemperatur auf die kardiale Elektrophysiologie.....	64
5.1.2	Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die kardiale Elektrophysiologie <i>in-vivo</i> ...	66
5.1.3	Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die ventrikuläre Repolarisation <i>in-vivo</i> ...	67

5.1.4	Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien <i>in-vivo</i> .....	68
5.2	Elektrophysiologische Untersuchung des isolierten Herzens.....	70
5.2.1	Einfluss einer kardialen Denervation auf die ventrikuläre Repolarisation des isolierten Herzens .....	71
5.2.2	Einfluss einer kardialen Denervation auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien im isolierten Herzen .....	73
5.3	Quantifizierung induzierter ventrikulärer Arrhythmien .....	74
5.4	Klinischer Ausblick .....	75
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>84</b>
<b>10.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>96</b>
<b>11.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>
<b>12.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>98</b>
12.1	Verbrauchsmaterialien .....	98
12.2	Chemikalien und Pharmaka .....	98
12.3	Geräte und Instrumente .....	99
12.4	Software .....	100
<b>13.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>101</b>
<b>14.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>102</b>
<b>15.</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....</b>	<b>103</b>
<b>16.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>105</b>

### **1. Arbeitshypothese und Fragestellung**

Das autonome Nervensystem (ANS) nimmt Einfluss auf sämtliche Stellgrößen der kardialen Elektrophysiologie (Habecker et al., 2016). Im Rahmen akuter wie chronischer kardialer Erkrankungen kommt es zu einer Dysbalance dieses Systems zugunsten eines gesteigerten adrenergen Tonus. Dieses neuronale Remodeling spielt eine tragende Rolle in der Genese von ventrikulären Herzrhythmusstörungen und dem plötzlichen Herztod (Ng, 2016, Herring et al., 2019). Mittlerweile ist bekannt, dass die autonome kardiale Innervation komplexer ist als eine bloße reziproke Innervation durch Sympathikus und Parasympathikus (Ardell et al., 2016). Ein System zentraler und peripherer Neurone interagiert synergistisch miteinander und steht in ständiger Wechselwirkung mit sensorischen Afferenzen (McAllen et al., 2011, Ardell et al., 2016). Auf Organebene bilden autonome Neurone das intrinsische kardiale autonome Nervensystem (ICANS) (Beaumont et al., 2013, Shivkumar et al., 2016). Die Neurone des ICANS bilden ein dichtes neuronales Netzwerk und sind vor allem (v. a.) in Form von Ganglienplexus (GPs) im epikardialen Fettgewebe organisiert (Armour et al., 1997, Shen und Zipes, 2014). Es ist bekannt, dass das ICANS als Teil autonomer Reflexwege mit kurzer Latenz die *Beat-to-Beat*-Modulation beeinflusst und der Integration zentraler Efferenzen sowie sensorischer Afferenzen in die regionale Regulation der Herzaktivität dient (Fukuda et al., 2015, Ardell et al., 2016). Ferner ist bekannt, dass das ICANS Einfluss auf die Entstehung von supraventrikulären Herzrhythmusstörungen nimmt (Hou et al., 2007, Wickramasinghe und Patel, 2013). Die Bedeutung des ICANS für die ventrikuläre Elektrophysiologie und die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien ist bisher noch nicht abschließend verstanden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des ICANS für die ventrikuläre Elektrophysiologie und die ventrikuläre Arrhythmogenese in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus zu untersuchen. Hierzu wurde ein kombiniertes *in-vivo* und *ex-vivo* Modell zur standardisierten elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) etabliert.

#### **Hypothese:**

Die Neurone des ICANS in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus beeinflussen unabhängig von übergeordneten autonomen Zentren die elektrophysiologischen Eigenschaften der Ventrikel sowie die Induzierbarkeit von ventrikulären Arrhythmien.

## 2. Einleitung

### 2.1 Physiologische Grundlagen

#### 2.1.1 Grundlagen der autonomen Regulation

Das ANS moduliert über autonome Reflexe die vegetativen Körperfunktionen und ist damit von zentraler Bedeutung für die Homöostase des Organismus (Shields Jr, 1993). Zentral für diese Funktion ist die Zweigliederung des ANS in Sympathikus und Parasympathikus (siehe Abbildung 1) (Langley, 1921, Gibbins, 2013). Diese beiden Systeme agieren nicht rein antagonistisch, wie lange angenommen, sondern sind vielmehr peripher und zentral bidirektional miteinander verbunden und stehen in ständiger Interaktion miteinander (Ondicova und Mravec, 2010).

Sympathikus und Parasympathikus sind jeweils aus einer Kette von zwei in Serie geschalteten Neuronen aufgebaut, die über Synapsen miteinander verbunden sind (Wehrwein et al., 2016). Die *Somata* der Primärneurone liegen zentral im Hirnstamm beziehungsweise (bzw.) im Rückenmark und entsenden ihre Axone in die Peripherie (Gibbins, 2013). Peripher erreichen die Axone die Sekundärneurone, die in Ganglien organisiert sind, und werden dort auf postganglionäre Fasern umgeschaltet. Die postganglionären Fasern innervieren die Zielorgane (Shields Jr, 1993, Gibbins, 2013).

Die Umschaltung im ersten Ganglion erfolgt im sympathischen wie im parasympathischen Nervensystem durch Bindung von Acetylcholin an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren an der Postsynapse (Jänig, 2010, Sherwood, 2010).

##### 2.1.1.1 Sympathikus

Das sympathische Nervensystem hat aktivierende Einflüsse auf den Körper. Eine Steigerung des Sympathikotonus bereitet den Organismus auf eine vermehrte Belastung vor und passt die vegetativen Funktionen dementsprechend an (Wehrwein et al., 2016). Sympathische Efferenzen steigern unter anderem (u. a.) die Herzfrequenz, erhöhen die Schlagkraft des Herzens, erweitern die Bronchien und dämpfen die enterale Verdauungsaktivität (Palma und Benarroch, 2014, Wehrwein et al., 2016).

Der Sympathikus wird als thorakolumbales System bezeichnet, da die *Somata* der präganglionären Neurone im thorakalen (T1–T12) und oberen lumbalen (L1–L2) Rückenmark in der intermediolateralen Zellsäule liegen (Gibbins, 2013, Wehrwein et al., 2016). Die präganglionären Fasern erreichen über die Vorderwurzeln und die

*Rami communicantes albi* die Sekundärneurone in den paravertebralen Grenzsträngen bzw. in den prävertebralen abdominellen Ganglien (Jänig und McLachlan, 1992, Gibbins, 2013). Die postganglionären Fasern der Grenzstrangganglien ziehen in den *Rami communicantes grisei* und in speziellen Nerven zu den zervikalen, thorakalen und abdominellen Zielorganen. Die postganglionären Axone der prävertebralen sympathischen Ganglien erreichen über Nervenplexus die abdominellen Organe. Die sympathische Innervation der Organe ist segmental gegliedert (Wehrwein et al., 2016).

Am Zielorgan vermittelt der Sympathikus seine Wirkung über die Ausschüttung von Katecholaminen, vornehmlich Noradrenalin, aus synaptischen Vesikeln. Es gibt zwei Klassen von Katecholaminrezeptoren ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren), die jeweils subklassifiziert sind. Alle adrenergen Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren, initiieren aber, da sie mit unterschiedlichen G-Proteinen gekoppelt sind, verschiedenartige Signalkaskaden (Brodde und Michel, 1999).  $\alpha_1$ -Rezeptoren sind  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren, die v. a. an peripheren Gefäßen durch Kontraktion glatter Muskelzellen eine Verengung der Gefäße vermitteln.  $\alpha_2$ -Rezeptoren sind vornehmlich an der Präsynapse exprimiert und  $G_i$ -gekoppelt. Über einen Abfall der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wird eine weitere Freisetzung von Noradrenalin unterbunden. Dies dient als negativer *Feedback*-Mechanismus (Brodde und Michel, 1999, Shields Jr, 1993).  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptoren sind jeweils  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren und vermitteln einen intrazellulären cAMP-Anstieg. Am Herzen sowie an den Nieren sind v. a.  $\beta_1$ -Rezeptoren exprimiert.

### 2.1.1.2 Parasympathikus

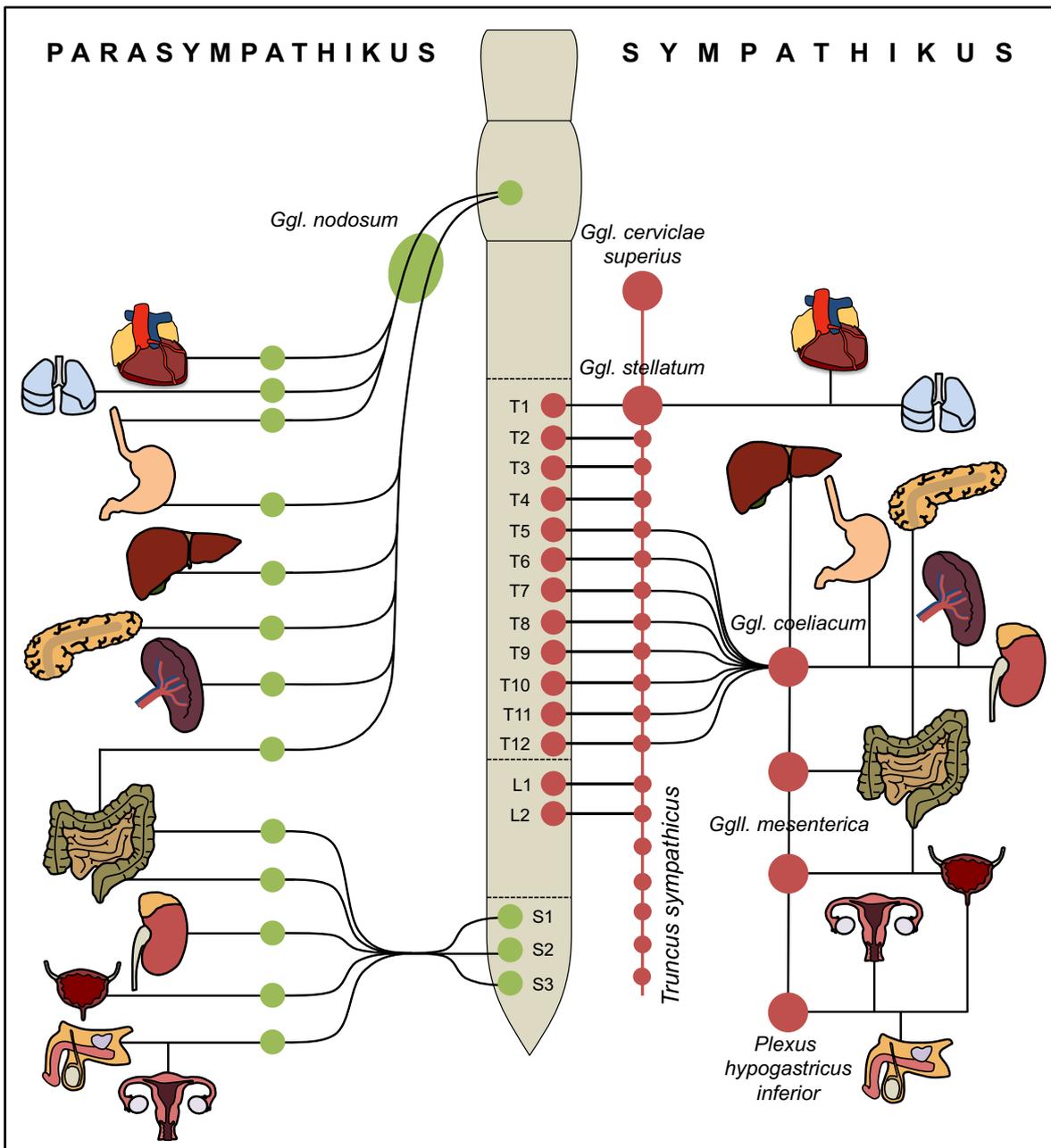
Der Parasympathikus vermittelt v. a. trophotrope Effekte. Die parasympathische Innervation senkt u. a. die Herzfrequenz, verengt die Bronchien und fördert enterale Verdauungsprozesse (Palma und Benarroch, 2014, Wehrwein et al., 2016).

Die *Somata* der Ursprungsneurone liegen im Hirnstamm in den Kernen des *Nervus oculomotorius* (III), des *Nervus facialis* (VII), des *Nervus glossopharyngeus* (IX) und des *Nervus vagus* (X) sowie in der intermediolateralen Zellsäule von S1 bis S3 (Shields Jr, 1993, Gibbins, 2013). Daher wird der Parasympathikus auch als kraniosakrales System bezeichnet. Die Fasern von III, VII und IX innervieren die glatte Muskulatur und das Drüsengewebe

## Einleitung

---

im Kopfbereich. Die Fasern von X versorgen die gesamten Thoraxorgane sowie Magen, Dünndarm, Dickdarm (bis zur *Flexura colica sinistra*), Pankreas und Leber. (Schweighöfer et al., 2016) Die präganglionären Fasern, die ihren Ursprung im Sakralmark haben, ziehen als *Nervi splanchnici pelvici* zu den Zielorganen (Shields Jr, 1993). Im Gegensatz zu den sympathischen präganglionären Fasern sind die präganglionären Faserzüge des Parasympathikus lang und werden erst in organnahen Ganglien umgeschaltet (Jänig, 2010, Wehrwein et al., 2016). Am Erfolgsorgan vermittelt die Aktivierung von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (M1 – M5) den parasympathischen Einfluss (Jänig, 2010, Sherwood, 2010). Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren sind im Gegensatz zu nikotineren Acetylcholinrezeptoren metabotrope Rezeptoren: M<sub>1</sub>-, M<sub>3</sub>- und M<sub>5</sub>-Rezeptoren sind G<sub>q</sub>-gekoppelt, M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren sind G<sub>i</sub>-gekoppelt. Kardiomyozyten exprimieren v. a. M<sub>2</sub>-Rezeptoren, die bei Bindung von Acetylcholin einen Abfall der cAMP-Konzentration induzieren (Brodde und Michel, 1999).



**Abbildung 1: Das autonome Nervensystem**

Schematische Darstellung des autonomen Nervensystems. Die parasympathischen Fasern (grün) zur Innervation der thorakalen und abdominellen Organe haben ihren Ursprung im Hirnstamm und Sakralmark (S1–S3). Diese Fasern werden organnah umgeschaltet. Die sympathischen Fasern (rot) ziehen, nach organferner Umschaltung, über den *Truncus sympathicus*, ausgehend vom thorakalen (T1–T12) und lumbalen (L1–L2) Rückenmark, zu den Zielorganen. Ggl: *Ganglion*. Modifiziert nach Craven (Craven, 2011).

### 2.1.1.3 Intrinsische Ganglienplexus

Neben Sympathikus und Parasympathikus sind intrinsische GPs von Bedeutung für die organspezifische autonome Innervation. Die Neurone der GPs stehen über sympathische und parasympathische Fasern in Verbindung mit dem zentralen Nervensystem (ZNS) und modulieren in Abhängigkeit zentraler sowie peripherer Reflexe die Organfunktion (Furness et al., 2014).

Intrinsische GPs als Teil der organspezifischen autonomen Innervation sind bereits seit über 100 Jahren bekannt. Auch das Herz verfügt über ein intrinsisches autonomes Nervensystem, das bereits im 19. Jahrhundert beschrieben wurde (Mills, 1886, Keng, 1893). Das ICANS ist ein wesentlicher Teil der autonomen Innervation des Herzens und von grundlegender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion (Armour et al., 1997, Wake und Brack, 2016).

### 2.1.2 Autonome kardiale Innervation und Regulation

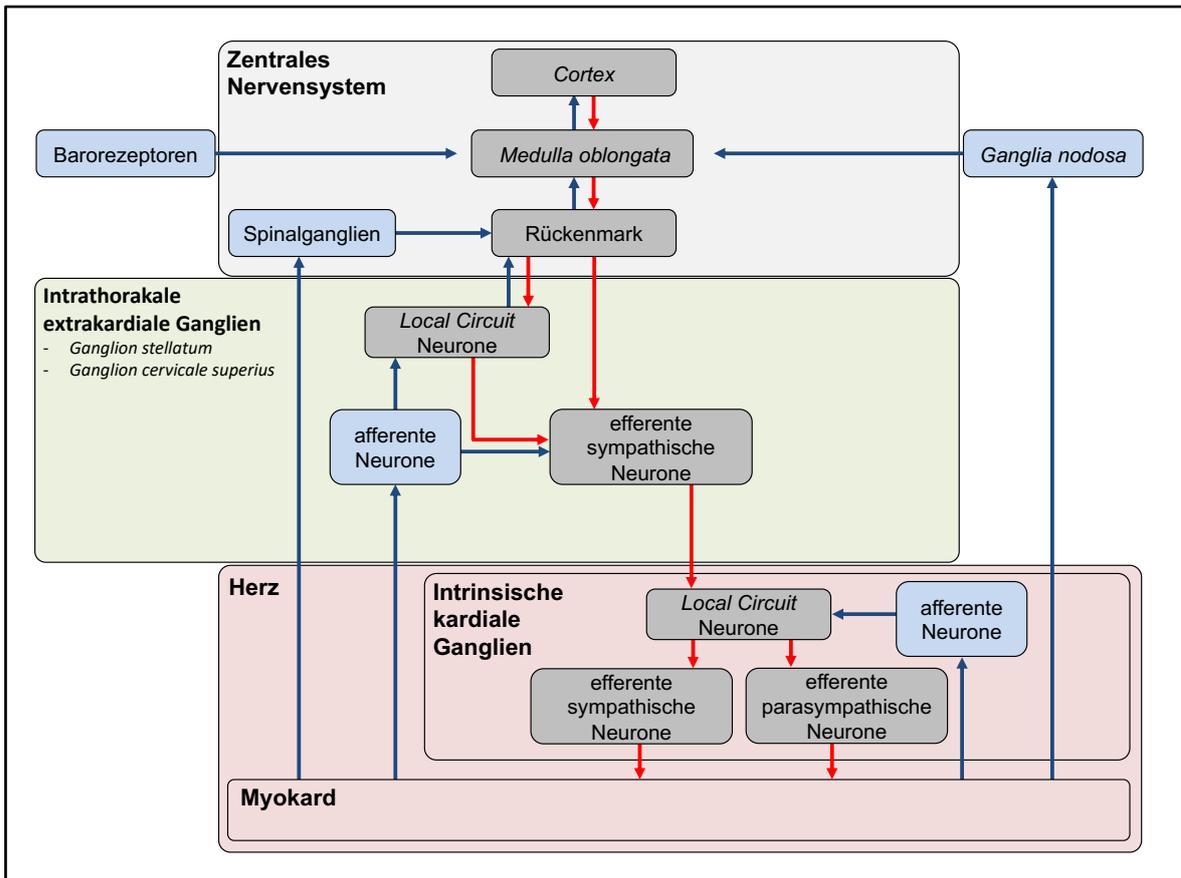
Das ANS moduliert die gesamte Herzaktion. Die autonome Innervation reguliert die Erregbarkeit der atrialen wie ventrikulären Kardiomyozyten und hat damit Einfluss auf Herzfrequenz, Erregungsüberleitung und Kontraktionskraft des Herzens. (Palma und Benarroch, 2014).

Die autonome kardiale Innervation ist ein System verschiedener Ebenen, die synergistisch miteinander interagieren und in ständiger Wechselwirkung mit sensorischen Afferenzen stehen (siehe Abbildung 2) (Armour, 2004, Ardell et al., 2016).

Die afferenten Neurone sind in den Spinalganglien, den *Ganglia nodosa*, den intrathorakalen extrakardialen Ganglien und den intrinsischen kardialen Ganglien des ICANS lokalisiert (Ardell et al., 2016). Sie informieren kardiale Motoneurone über das lokale physikalische und chemische Milieu in den verschiedenen Herzregionen und in den großen thorakalen Gefäßen (Jänig, 2016, Shivkumar et al., 2016). In Abhängigkeit von diesen Afferenzen wird die regionale Herzaktivität durch regionsspezifische Motoneurone moduliert (Armour, 2004, Wake und Brack, 2016). Auf Ebene der intrathorakalen extrakardialen und intrinsischen kardialen Ganglien sind parasympathische und sympathische Anteile der autonomen Innervation funktionell eng miteinander verbunden (Ardell et al., 2016). Auf Organebene bilden diese heterogenen Efferenzen in Vernetzung mit lokalen

## Einleitung

Afferenzen und Interneuronen ein dichtes Netzwerk von Nerven und Plexus. Dieses System dient nicht nur der Fortleitung zentraler Efferenzen, sondern ist vielmehr als Integrationselement von peripheren und lokalen Afferenzen sowie autonomer Efferenzen in die regionale Funktionskontrolle zu verstehen (Ardell et al., 2016, Herring et al., 2019).



**Abbildung 2: Autonome Innervation des Herzens**

Schematische Darstellung der Hierarchie der autonomen Innervation des Herzens (Afferenzen: blau, Efferenzen: rot). Afferenzen, ausgehend von Mechano- und Chemorezeptoren im Herzen und den thorakalen Gefäßen, interagieren mit Anteilen des zentralen Nervensystems (ZNS), intrathorakalen extrakardialen Ganglien und intrinsischen kardialen Ganglien. Das ZNS erreichen diese Afferenzen über Neurone in den *Ganglia nodosa*, den Spinalganglien und den Barorezeptoren. Auf Ebene der intrathorakalen extrakardialen und intrinsischen kardialen Ganglien werden Efferenzen über *Local Circuit* Neurone oder direkt über efferente sympathische Neurone beziehungsweise efferente parasympathische Neurone weitergeleitet. Modifiziert nach Herring et al. (Herring et al., 2019).

### 2.1.3 Das intrinsische kardiale autonome Nervensystem

Das ICANS in Säugetieren wird maßgeblich durch Ganglien gebildet (Armour, 2004). Die Mehrzahl dieser Ganglien ist in Form von Plexus organisiert, die v. a. im epikardialen Fettgewebe und vereinzelt intramural lokalisiert sind (Shen und Zipes, 2014). Das ICANS besteht im humanen Herzen aus durchschnittlich 43000 bis 94000 Neuronen in einer interindividuell sehr verschiedenen Anzahl von Ganglien (700 bis 1500) (Armour et al., 1997, Pauza et al., 2000, Wake und Brack, 2016).

#### 2.1.3.1 Anatomischer Aufbau

Die Einteilung der GPs erfolgt anhand deren anatomischer Lage. Die Arbeitsgruppen um Armour und Pauza beschreiben für das humane Herz linkskoronare und rechtskoronare GPs sowie Ansammlungen von Ganglien um die Wurzel der *Aorta ascendens* (AO) und des *Truncus pulmonalis* (TP) (Armour et al., 1997, Pauza et al., 2000). Von diesen GPs ziehen Fasern über die Vorhöfe und entlang der *Sulci coronarii* auf anteriorer und posteriorer Seite in Richtung *Apex cordis* und erreichen sowohl das Myokard der Atrien, als auch das septale und ventrikuläre Arbeitsmyokard (Armour, 2004, Saburkina et al., 2014).

Nach Armour et al. werden fünf atriale und fünf ventrikuläre GPs unterschieden (siehe Abbildung 3), die jeweils über mediastinale Nerven miteinander verbunden sind (Armour et al., 1997).

Atriale GPs:

- (1) Superiorer rechtsatrialer GP (SRAGP) im Bereich des *Ostium* der *Vena cava superior* (VCS),
- (2) superiorer linksatrialer GP (SLAGP) zwischen den Pulmonalvenen (PVs),
- (3) posteriorer rechtsatrialer GP (PRAGP) auf der posterioren Seite des rechten Vorhofs,
- (4) posteromedialer linksatrialer GP (PMLAGP) auf der posteromedialen Oberfläche des linken Vorhofs und
- (5) posterolateraler linksatrialer GP (PLLAGP) auf Höhe der Basis des linken Vorhofs im *Sulcus atrioventricularis*.

Der PRAGP und der PMLAGP vereinigen sich auf der Ventralseite im Bereich des *Septum interatriale* zum interatrialen septalen GP, der die meisten Ganglien beinhaltet (Armour, 2004).

## Einleitung

---

Ventrikuläre GPs:

- (1) Aortenwurzel-GP (AOGP) um die Aortenwurzel,
- (2) anteriorer absteigender GP (ADGP) im Bereich des *Ramus interventricularis anterior*,
- (3) posteriorer absteigender GP (PDGP) im Bereich des *Ramus interventricularis posterior*,
- (4) rechtmarginaler GP (RMGP) auf der rechtsventrikulären Wand unterhalb des Koronarsinus (CS) und
- (5) linksmarginaler GP (LMGP) unterhalb des CS und des linken Herzohres (LAA) (Armour et al., 1997).

Pauza et al. unterscheiden sieben GPs, deren Lage ähnlich der ist, die durch Armour et al. beschrieben wurden (Armour et al., 1997, Pauza et al., 2000):

- (1) Linkskoronarer GP (LCGP) im Bereich des *Conus arteriosus*,
- (2) rechtskoronarer GP (RCGP) um die AO,
- (3) linksdorsaler GP (LDGP) im Bereich der Hinterwand des linken Ventrikels (v. a. im *Sulcus interventricularis posterior*),
- (4) dorsaler rechtsatrialer GP (DRAGP) im Bereich der posterioren Wand des rechten Vorhofs,
- (5) mittlerer dorsaler GP (MDGP) im Bereich der posterioren Wand des linken Vorhofs,
- (6) ventraler linksatrialer GP (VLAGP) und
- (7) ventraler rechtsatrialer GP (VRAGP), jeweils auf der superioren Ventralseite der Vorhöfe.

Unabhängig von den abweichenden Darstellungen der Topographie der GPs beschreiben beide Autoren, dass die Konzentration der Ganglien im Bereich der Atrien am dichtesten ist und dort etwa 80 % der Ganglien gelegen sind (Armour et al., 1997, Pauza et al., 2000).

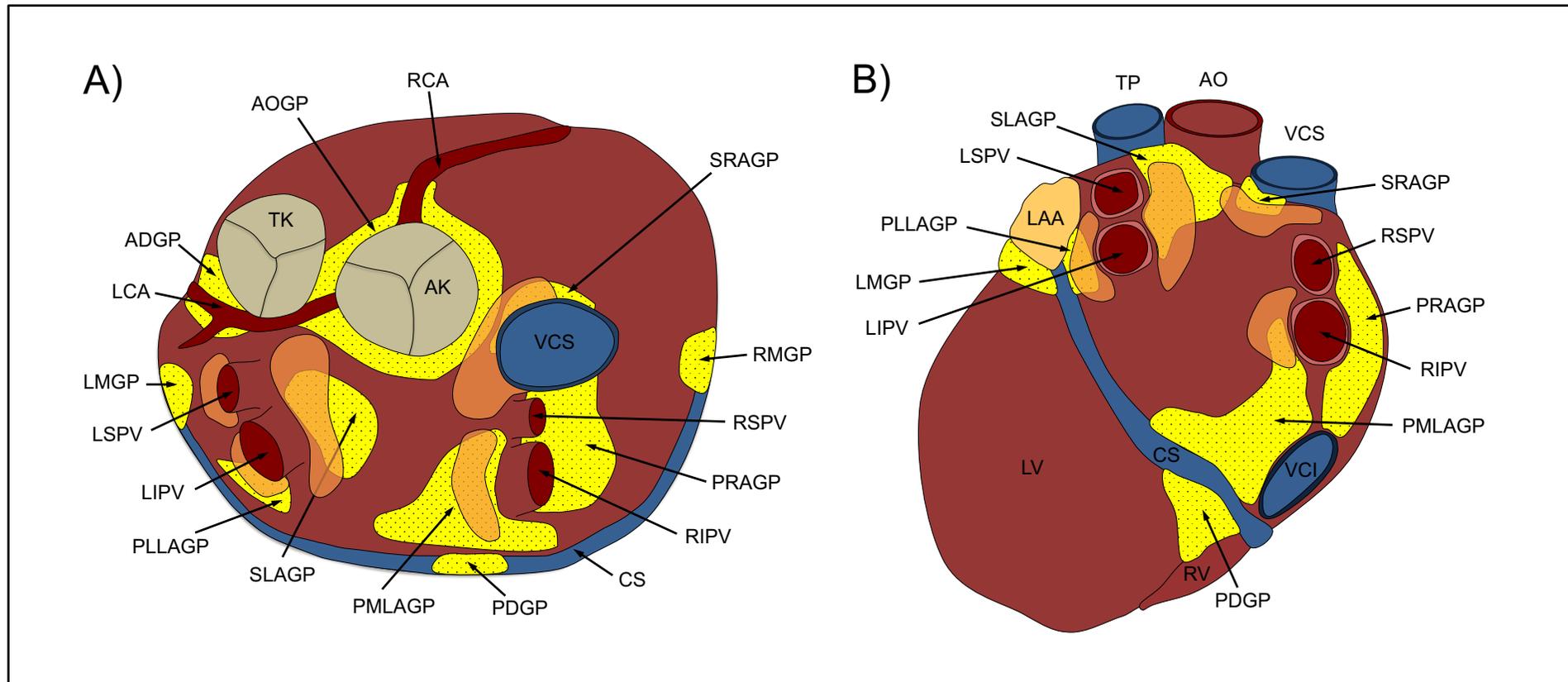
Die Ganglien empfangen über mediastinale Nerven sympathische und parasymphatische Efferenzen (Wake und Brack, 2016). Diese extrinsischen kardialen Nerven erreichen das ICANS über das *Hilum*. Das *Hilum* des Herzens ist in einen arteriellen (AO und TP) und einen venösen (VCS und PVs) Anteil gegliedert (Pauza et al., 1997, Pauza et al., 2000). Über den arteriellen Hilusanteil ziehen die Nerven über den linken und rechten ventralen *Sulcus coronarius* auf die ventrale Ventrikeloberfläche. Fasern, die über den venösen Hilusanteil das Herz erreichen,

## **Einleitung**

---

ziehen zu den Vorhöfen. Die Nerven ziehen nicht unmittelbar in das Myokard, sondern erreichen die epikardialen GPs und bilden im Epikard einen Teil des ICANS (Pauza et al., 2000).

Die Architektur des ICANS des Menschen ist in Grundzügen mit dem ICANS kleinerer Säugetiere zu vergleichen (siehe Abbildung 3) (Wake und Brack, 2016). Die Neurone des ICANS kleinerer Säugetiere, wie beispielsweise der Maus, sind ebenso in GPs organisiert, werden durch sympathische und parasympathische Fasern erreicht und sind damit Teil der autonomen kardialen Innervation (Rysevaite et al., 2011, Pauza et al., 2013). Das ICANS in kleineren Säugetieren zeigt jedoch eine deutlich geringere Innervationsdichte, auch sind die GPs stark räumlich begrenzt verteilt, wogegen in größeren Säugetieren die GPs breit über das Epikard verteilt und reich innerviert sind. So besteht das ICANS in der Maus nur aus durchschnittlich 1000 Neuronen, gruppiert in durchschnittlich 19 GPs (Wake und Brack, 2016).



**Abbildung 3: Ganglienplexus des humanen und des murinen Herzens**

Schematische Darstellung des Herzens mit Hervorhebung der epikardialen Ganglienplexus (GPs) (Gelb: Human, Orange transparent: Murin).  
**A)** Ansicht von kranial, **B)** Ansicht von dorsal. SRAGP: Superiorer rechtsatrialer GP, RMGP: Rechtsmarginaler GP, PRAGP: Posteriorer rechtsatrialer GP, PDGP: Posteriorer absteigender GP, PMLAGP: Posteromedialer linksatrialer GP, SLAGP: Superiorer linksatrialer GP, PLLAGP: Posterolateraler atrialer GP, LMGP: Linksmarginaler GP, ADGP: Anteriorer absteigender GP, AOGP: Aortenwurzel-GP, LV: Linker Ventrikel, RV: Rechter Ventrikel, LAA: Linkes Vorhofsohr LCA: Linke Koronararterie, RCA: Rechte Koronararterie, TK: Trikuspidalklappe, AK: Aortenklappe, TP: *Truncus pulmonalis*, AO: *Aorta ascendens*, VCS: *Vena cava superior*, VCI: *Vena cava inferior*, CS: Koronarsinus, LSPV: Linke superiore Pulmonalvene, LIPV: Linke inferiore Pulmonalvene, RSPV: Rechte superiore Pulmonalvene, RIPV: Rechte inferiore Pulmonalvene. Modifiziert nach Armour et al. sowie nach Rysevaite et al. (Armour et al., 1997, Rysevaite et al., 2011).

### 2.1.3.1 Funktion

Lange Zeit wurde das ICANS als reine Relaisstation verstanden, die parasymphatische Efferenzen auf postganglionäre Fasern umschaltet (Randall, 2000). Mittlerweile ist bekannt, dass das ICANS aus einer heterogenen Neuronenpopulation besteht und ein bedeutender Teil der autonomen Innervation des Herzens ist (Hoover et al., 2009). Das ICANS ist ein komplexes System von Neuronen verschiedenen neurochemischen Phänotyps. Motoneurone, afferente Neurone und *Local Circuit* Neurone (LCN) sind in Ganglien organisiert (Armour, 2008, Beaumont et al., 2013). Die Motoneurone sind cholinergen als auch adrenergen Phänotyps, mit über 50 % dominieren die cholinergen Neurone (Rysevaite et al., 2011, Wake und Brack, 2016). Daneben sind im ICANS u. a. auch Stickstoffmonoxid produzierende Neurone zu finden, die häufig mit cholinergen Zellen kolokalisiert sind (Wake und Brack, 2016). Die autonomen Neurone erhalten Informationen von Mechano- und Chemorezeptoren aus dem Herzen sowie den großen thorakalen Gefäßen und leiten diese an die LCN weiter (Beaumont et al., 2013, Ardell et al., 2016). Die LCN fungieren als Interneurone und verbinden die Ganglien untereinander und vermitteln die Interaktion zwischen den Afferenzen und den Motoneuronen des ICANS (Armour, 2004, Beaumont et al., 2013). Dies dient der Integration lokaler und peripherer Afferenzen in die Kontrolle der Herzaktion (Ardell et al., 1991, McAllen et al., 2011). Die Motoneurone der GPs erhalten Information aus definierten Regionen des Herzens und innervieren ihrerseits definierte Herzregionen (Armour, 2008, Liao et al., 2015). Diese lokalen Reflexe zeigen eine kurze Latenz von 20 bis 40 ms und dienen u. a. der schnellen *Beat-to-Beat*-Modulation (Ardell et al., 1991, Armour, 2008). Neben diesen lokalen Einflüssen ist das ICANS auch an der Modulation des Herzrhythmus über mehrere Schläge mit einer Latenz von > 100 ms beteiligt. Dies wird durch die Integration von Efferenzen ausgehend von intrathorakalen extrakardialen Ganglien bzw. von zentralen Neuronenpopulationen realisiert (Armour, 2008). Darüber hinaus erfahren die Neurone einen tonischen Einfluss durch zentrale Neurone und zirkulierende Katecholamine (Armour, 2008, Shivkumar et al., 2016). Es besteht eine ständige Interaktion zwischen allen Ebenen der autonomen Innervation des Herzens (Armour, 2004, Armour, 2008). Der Output ist das Resultat des Neuronenphänotyps und der Integration lokaler, peripherer und zentraler autonomer Afferenzen durch die LCN (Wake und Brack, 2016, Shivkumar et al., 2016).

Dass die Neurone des ICANS einen Einfluss auf die Funktion der Kardiomyozyten haben, ist bereits seit über 20 Jahren bekannt (Ardell et al., 1991). Der genaue funktionelle Zusammenhang zwischen den ventrikulären Kardiomyozyten und dem ICANS sowie die Bedeutung des ICANS für die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien ist bisher noch nicht vollständig verstanden (He et al., 2013c, Wang et al., 2015, Jungen et al., 2017).

### 2.1.4 Einfluss der autonomen Innervation auf die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien

Grundlage der Initiation und Perpetuation von ventrikulären Arrhythmien bilden vornehmlich zwei Pathomechanismen: (1) Fokale abnormale Impulsbildung (*triggered Activity, Automaticity*) und (2) Reentry-Mechanismen (Antzelevitch und Burashnikov, 2011, Tse, 2016).

Die fokale abnormale Impulsbildung beschreibt eine Depolarisation von Herzmuskelzellen mit konsekutiver Störung der Gewebeerregung (Antzelevitch und Burashnikov, 2011). Ist die abnormale Impulsbildung durch eine Nachdepolarisation der Zellmembran bedingt, die das Schwellenpotenzial zur Auslösung eines Aktionspotenzials (AP) überschreitet, ist diese als getriggertes AP definiert (Tse, 2016). Tritt die Nachdepolarisation nach Repolarisation und vor erneueter Depolarisation der Zellmembran auf, wird diese als *Delayed Afterdepolarization* (DAD) bezeichnet (Antzelevitch und Burashnikov, 2011). Grundlage von DADs ist eine gestörte intrazelluläre Calcium( $\text{Ca}^{2+}$ )-Homöostase, die eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischem Retikulum fördert. Dies aktiviert calciumsensitive Ionenkanäle, die einen Nettoeinstrom von Ionen tragen, der die Zellmembran depolarisiert (Tse, 2016). Ist die Amplitude der Membrandepolarisation ausreichend groß, werden spannungsabhängige Natrium( $\text{Na}^+$ )-Kanäle aktiviert. Der vermehrte Einstrom von  $\text{Na}^+$  depolarisiert die Membran (Tse, 2016).

Wenn Herzgewebe lokal verzögert depolarisiert, können Reentry-Tachykardien entstehen. Reentry-Mechanismen beschreiben eine abnormale Aktivierung von Kardiomyozyten mit pathologischer Erregungsfortleitung (Antzelevitch und Burashnikov, 2011). Reentry-Arrhythmien entstehen bei Vorliegen eines anatomischen oder funktionellen Hindernisses (Allessie et al., 1977). Die entstehende Erregungsfront erreicht das umliegende Gewebe unabhängig von der

## Einleitung

---

physiologischen Erregung, wenn die Kardiomyozyten bereits wieder erregbar sind, und depolarisiert diese verfrüht in Relation zur nächsten Sinusknotendepolarisation (Antzelevitch, 2001).

Das ANS spielt in der Genese von ventrikulären Arrhythmien eine bedeutende Rolle (Ng, 2014, Fukuda et al., 2015). Im Rahmen transienter und chronischer myokardialer Ischämie sowie im Zuge struktureller Herzerkrankungen kommt es zu einer adrenergen Hyperinnervation mit konsekutiver autonomer Dysbalance und vermehrtem Auftreten von ventrikulären Arrhythmien (Ng, 2016, Kalla et al., 2016). Dies ist v. a. auf eine Beeinflussung der Membranleitfähigkeit für Kalium ( $K^+$ ) und  $Ca^{2+}$  zurückzuführen (Kalla et al., 2016). Ein vermehrter Ausstrom von  $K^+$  durch eine gesteigerte Aktivierung des  $I_{KS}$  führt zu einer Verkürzung der Aktionspotenzialdauer (APD) und ist damit prädisponierend für das Auftreten von Reentry-Tachykardien, da nicht nur die APD verkürzt ist, sondern diese Verkürzung auch inhomogen über das Gewebe verteilt ist (Tse, 2016, Winter et al., 2018). Des Weiteren führt eine übersteigerte adrenerge Innervation zu einer gestörten kardialen  $Ca^{2+}$ -Homöostase mit konsekutiver Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Tse, 2016). Wie bereits beschrieben, ist eine erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration Grundlage für DADs (Herring et al., 2019). Ein pathologisch erhöhter adrenerger Tonus kann somit u. a. über eine Störung der Membranleitfähigkeit und der  $Ca^{2+}$ -Homöostase ventrikuläre Arrhythmien bedingen und aufrechterhalten (Ng, 2016, Kalla et al., 2016). Dem entgegen steht der cholinerge Einfluss auf die Arrhythmogenese. Mittlerweile ist nicht nur bekannt, dass auch die Ventrikel von cholinergen Neuronen innerviert sind, sondern auch, dass die parasympathische Innervation antiarrhythmische Effekte auf das ventrikuläre Myokard hat (Coote, 2013, Herring et al., 2019). Dem liegen im Wesentlichen sechs Mechanismen zugrunde: (1) Suppression des adrenergen Tonus, (2) Reduktion der Herzfrequenz, (3) Verlängerung der APD, (4) Verlängerung der Refraktärzeit, (5) Suppression der Zytokinlevel und (6) Induktion einer vermehrten Stickstoffmonoxidfreisetzung (Ng, 2016).

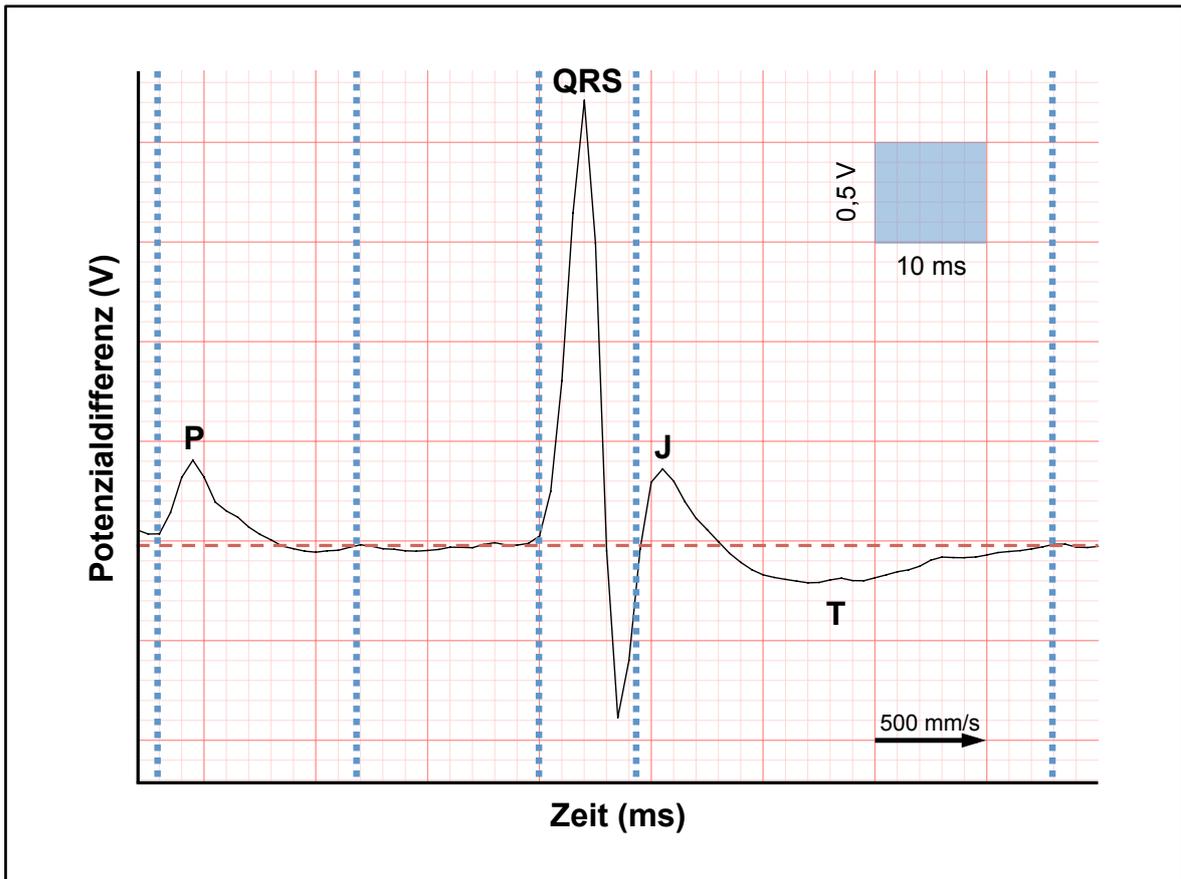
## 2.2 Methodische Grundlagen

### 2.2.1 Das Elektrokardiogramm der Maus

Die kardiale Elektrophysiologie der Maus unterscheidet sich von der des Menschen im Wesentlichen in der Herzfrequenz. Die Herzfrequenz der Maus liegt mit einer mittleren Ruhefrequenz von 550 Schläge/min fast zehnfach höher als die des menschlichen Herzens (Edvardsson et al., 1984, Kass et al., 1998). Dies ist der geringen Körpermasse der Tiere geschuldet (McMahon, 1975, Noujaim et al., 2004). Eine geringere Körpermasse korreliert negativ mit dem Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, das wiederum positiv mit dem basalen Metabolismus korreliert: Mit fallender Körpermasse steigt der basale Metabolismus. Dies manifestiert sich u. a. in einer steigenden Herzfrequenz. Dementsprechend finden sich auf zellulärer Ebene Unterschiede hinsichtlich der Expression der Ionenkanäle, die sich im murinen Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG) (siehe Abbildung 4) niederschlagen (Noujaim et al., 2004).

Der initiale Aufstrich wird ebenso wie im menschlichen Herzen von einem  $\text{Na}^+$ -Einstrom getragen (Nerbonne, 2004b). Dieser Depolarisation folgt in der Maus jedoch keine Plateauphase wie im Menschen, sondern unmittelbar eine schnelle Repolarisation der Zelle (Bondarenko et al., 2004, Sabir et al., 2008). Letztere wird v. a. durch einen spannungsabhängigen Ionenkanal ( $I_{\text{Kslow1}}$ ) getragen, der in dieser Form nicht im menschlichen Myokard exprimiert wird (Boukens et al., 2014).

Diese frühe Repolarisation wird im Oberflächen-EKG durch eine J-Welle repräsentiert, ein isoelektrischer Anteil der ST-Strecke wie im humanen Oberflächen-EKG fehlt (Liu et al., 2004, Boukens et al., 2014). Die J-Welle schließt sich unmittelbar dem QRS-Komplex an. Dieser endet mit Erreichen des Niveaus der isoelektrischen Linie der S-Zacke (Boukens et al., 2014). Die T-Welle geht aus der J-Welle hervor und läuft in der isoelektrischen Linie aus (Boukens et al., 2014). Das Intervall zwischen Beginn der Q-Zacke und Ende der T-Welle ist in beiden Spezies als QT-Zeit definiert und beschreibt die Depolarisation und die darauffolgende Repolarisation der Ventrikel. Die QT-Zeit ist frequenzabhängig und verkürzt sich mit steigender Frequenz (Boukens et al., 2014).



**Abbildung 4: Murines Oberflächen-Elektrokardiogramm**

Darstellung eines Ausschnitts eines murinen Elektrokardiogramms (EKG). Die Skalierung der Achsen (x-Achse: Zeit, y-Achse: Potenzialdifferenz) ist durch den blauen Kasten angegeben. Die Schreibgeschwindigkeit beträgt 500 mm/s. Die einzelnen Abschnitte des murinen Oberflächen-EKG sind durch blau gestrichelte Linien voneinander getrennt. Die rote gestrichelte Linie markiert die isoelektrische Linie. Die Vorhofdepolarisation, ausgehend von den Zellen des Sinusknoten, ist im Oberflächen-EKG durch die P-Welle (P) repräsentiert (Nerbonne, 2004a). Da bei vollständiger Vorhoferregung und Überleitung der Erregung auf die Ventrikel keine Potenzialdifferenz zu messen ist, zeigt das Oberflächen-EKG zwischen P-Welle und Ventrikelerregung (QRS) keinen Ausschlag (isoelektrische Linie) (Nerbonne, 2004a). Das Aktionspotenzial des murinen Arbeitsmyokards zeigt nach der initialen Depolarisation keine Plateauphase, sondern geht umgehend über in die Repolarisationsphase (Liu et al., 2004). Diese frühe Repolarisation der Zellen ist durch das Fehlen einer klar abgegrenzten T-Welle (T) wie im humanen Oberflächen-EKG und einer J-Welle (J) repräsentiert (Liu et al., 2004). Nach der J-Welle fällt die EKG-Linie unter die isoelektrische Linie (T), um vor erneuter Vorhofdepolarisation (P) zu dieser zurück zu kehren (Liu et al., 2004).

### 2.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung des Herzens

Die invasive EPU ist eine kathetergestützte diagnostische Methodik zur Erhebung der elektrischen Eigenschaften des Herzens, die bereits seit über 40 Jahren Anwendung findet (Josephson et al., 1978a, Wellens, 2008). Über eingeführte Elektrodenkatheter kann intrakardial das Elektromyogramm (EMG) abgeleitet und das Myokard stimuliert werden (Luderitz, 2008). Einsatz findet die EPU u. a. bei elektrophysiologischen Fragestellungen im Rahmen der Diagnostik von ventrikulären Arrhythmien (Josephson et al., 1978a, Wellens, 2008). Die aktuellen klinischen Protokolle zur elektrischen Untersuchung des Herzens orientieren sich an den Arbeiten von Mark E. Josephson (Josephson et al., 1978a, Josephson et al., 1978b).

Grundlage ist die programmierte Stimulation, die u. a. eine Bestimmung der ventrikulären Refraktärperiode (VRP) sowie die Induktion und Termination von Tachykardien ermöglicht. Das Ventrikelmyokard wird mit einer Frequenz von 80 bis 250 /min stimuliert. An dieses Basisintervall mit einer Zykluslänge von 750 bis 240 ms werden Stimuli mit verkürzten Stimulationsintervallen angehängt. Das Basisintervall der Stimulation wird als S1-S1-Intervall bezeichnet, die applizierten Stimuli dementsprechend als S1-Stimuli. Stimuli, die an diesen Stimulationszug angehängt werden und von dem S1-S1-Intervall abweichen, werden als S2-, S3-Stimuli et cetera (etc.) bezeichnet (Josephson et al., 1978a). Zur Erhebung der VRP wird das S1-S2-Intervall sukzessive verkürzt, bis auf den S2-Stimulus keine Ventrikelantwort mehr folgt. Die VRP definiert Josephson als „längstes S1-S2-Intervall, das es nicht mehr vermag, eine ventrikuläre Depolarisation auszulösen“ (Josephson et al., 1978a).

Zur Induktion ventrikulärer Tachykardien im Rahmen der EPU werden spätdiastolisch während Sinusrhythmus bzw. endokardialer Stimulation Extrastimuli appliziert (Josephson et al., 1978a). Wird das Myokard vor der vollständigen Repolarisation depolarisiert, kann dies zu kreisenden Erregungen und damit zu Tachykardien führen (Tse, 2016). Initial wird lediglich ein S2-Stimulus angekoppelt und das S1-S2-Intervall bis zur VRP bzw. dem Auftreten einer Tachykardie verkürzt. Bleibt die Induktion einer Tachykardie aus, werden zwei Extrastimuli (S2, S3) mit einem festen S1-S2-Intervall ( $VRP + 50\text{--}100\text{ ms}$ ) appliziert. Das S2-S3-Intervall wird ebenfalls verkürzt, bis die Depolarisation des ventrikulären Myokards ausbleibt bzw. eine Tachykardie induziert wird. Danach wird auch das S1-S2-Intervall bis zur

Refraktärzeit verkürzt (Josephson et al., 1978a). Treten Tachykardien auf, werden diese durch Überstimulation beendet (Josephson et al., 1978a).

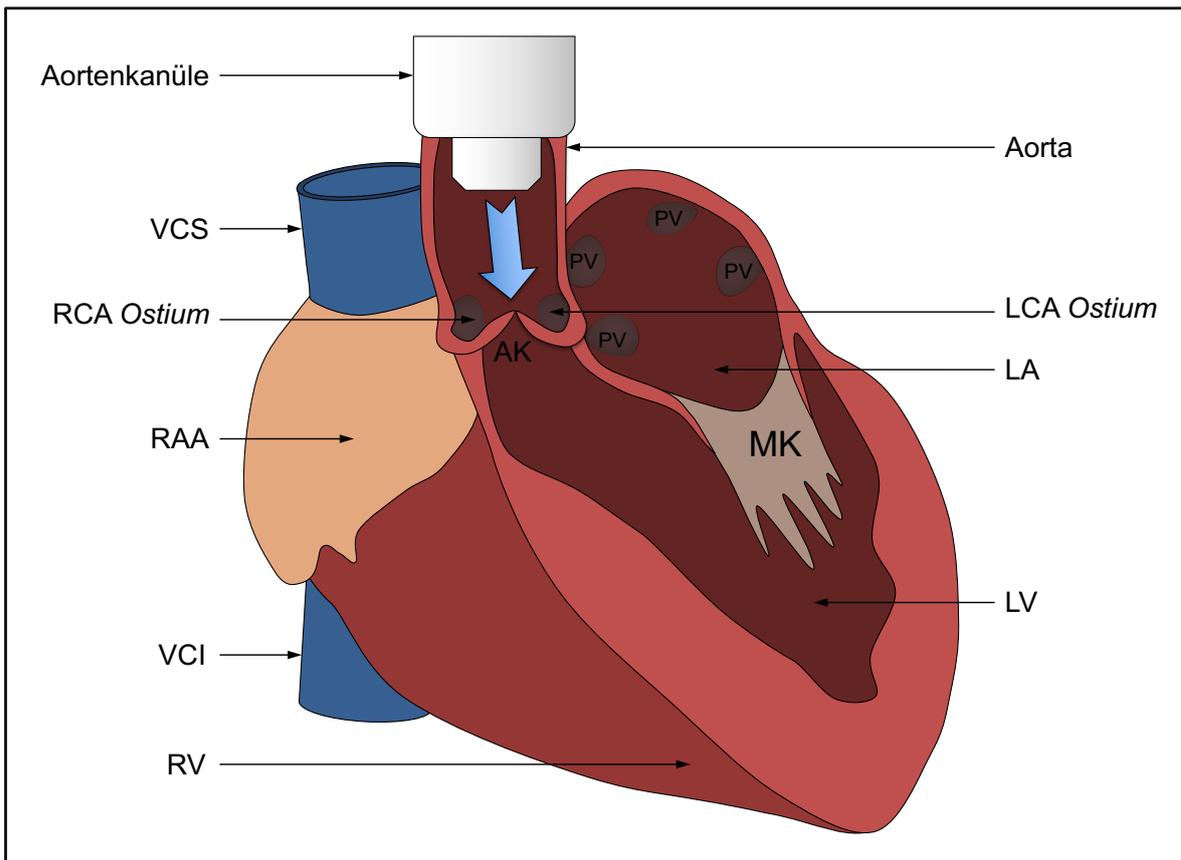
Für die Untersuchung des murinen Herzens stehen angepasste, von Berul et al. etablierte Protokolle zur Verfügung (Berul et al., 1996). Diese beruhen auf den oben vorgestellten klinischen Protokollen. Grundlage dieser Protokolle ist ebenfalls die programmierte Stimulation durch Elektrokatheter (Berul et al., 1996). Zykluslängen und Ankopplungszeiten sind entsprechend der deutlich höheren Herzfrequenz der Maus angepasst (Berul et al., 1996, Kass et al., 1998).

### 2.2.3 Das isolierte Herz nach Oscar Langendorff

Das Grundprinzip des isolierten, retrograd perfundierten Säugetierherzens basiert auf den Arbeiten von Oscar Langendorff, der diese Methode bereits 1895 beschrieb (Langendorff, 1895).

Das Herz wird explantiert und eine Kanüle in die AO eingebracht (siehe Abbildung 5) (Bell et al., 2011, Sutherland et al., 2003). Über die Kanüle wird dem Herzen retrograd eine erwärmte Perfusionslösung zugeführt (Bell et al., 2011). Die Aortenklappe wird durch den kardiopetal gerichteten Fluss verschlossen. Die Perfusionslösung erreicht über die Koronararterien das Myokard. Mithilfe dieses Versuchsaufbaus kann das isolierte Organ über mehrere Stunden vital gehalten werden (Bell et al., 2011).

Dem Herzen vorgeschaltet ist ein Windkessel, dessen Aufgabe es ist, eine konstante Perfusion des Herzens zu ermöglichen und mögliche Luftembolien zu vermeiden (Liao et al., 2012). Die Perfusion der Koronararterien ist abhängig von (1) dem Perfusionsdruck ( $\Delta p$ ), (2) dem Perfusionsfluss ( $\Phi$ ) und (3) dem Strömungswiderstand ( $R$ ) (Döring und Dehnert, 1988). Nach dem Ohm'schen Gesetz sind  $\Delta p$ ,  $\Phi$  und  $R$  voneinander abhängig:  $\Phi = \Delta p/R$  (Busse, 2010). Weiterhin ist  $R$  nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz abhängig von dem Gefäßradius ( $r$ ), der Länge des Gefäßsystems ( $l$ ) und der Viskosität der durchströmenden Flüssigkeit ( $\eta$ ) (Busse, 2010). Im Langendorff-Modell sind  $l$  und  $\eta$  als konstant anzunehmen, daher gilt:  $R \sim 1/r$  (Döring und Dehnert, 1988). Im apparativen Versuchsaufbau können  $\Delta p$  und  $\Phi$  angepasst werden, um eine adäquate Perfusion der Koronararterien zu ermöglichen. Die myogenen Mechanismen zur Autoregulation der Koronararterien sind das letzte Stellglied der myokardialen Perfusion (Döring und Dehnert, 1988).



**Abbildung 5: Retrograd perfundiertes Herz**

Schematische Darstellung der anatomischen Verhältnisse des isolierten retrograd perfundierten Herzens. Der Pfeil (hellblau) zeigt die Fließrichtung der Perfusionslösung durch die *Aorta ascendens* in Richtung der Aortenklappe (AK) sowie der Koronararterien an. VCS: *Vena cava superior*, VCI: *Vena cava inferior*, RCA: Rechte Koronararterie, LCA: Linke Koronararterie, RAA: Rechtes Vorhofohr, RV: Rechter Ventrikel, LV: Linker Ventrikel, LA: Linkes Atrium, MK: Mitralklappe, PV: Pulmonalvene.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Tiermodell und Versuchstierhandhabung

Für das vorliegende Modell wurden ausschließlich männliche C57Bl/6-Wildtyp-Mäuse im Alter von 14 bis 28 Wochen und einem Gewicht zwischen 25 und 32 g untersucht. Insgesamt wurden 63 Tiere in die Untersuchungen eingeschlossen.

Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen bei 24 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h gehalten. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

Das Mausmodell ist aufgrund einer mit dem Menschen vergleichbaren kardialen Anatomie und Physiologie in der kardiovaskulären Forschung bereits seit einigen Jahrzehnten von besonderer Bedeutung (Doevendans et al., 1998, Kaese und Verheule, 2012). In der jüngeren Vergangenheit wurde dieses Tiermodell vermehrt auch zur Beantwortung elektrophysiologischer Fragestellungen erfolgreich herangezogen (Kaese und Verheule, 2012, Kaese et al., 2013). Darüber hinaus ist eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden aus der humanen Anwendung auf das Mausmodell übertragbar (Berul et al., 1996, Doevendans et al., 1998).

Die *in-vivo* Untersuchungen sowie ein Teil der Untersuchungen am isolierten Herzen wurden an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Weiter wurden ergänzende Untersuchungen am isolierten Herzen am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Untersuchungen und deren Umfang wurden nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes durch die Bezirksregierung der Stadt Düsseldorf sowie der Stadt Hamburg genehmigt und unterstanden der Kontrolle des jeweiligen Tierschutzbeauftragten. Die Beschaffung, Haltung und veterinärmedizinische Betreuung unterlag den Instituten für Versuchstierkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

### 3.2 Apparativer Versuchsaufbau

Die Methodik der EPU wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo* als auch im isolierten Herzen im Langendorff-Modell *ex-vivo* angewandt.

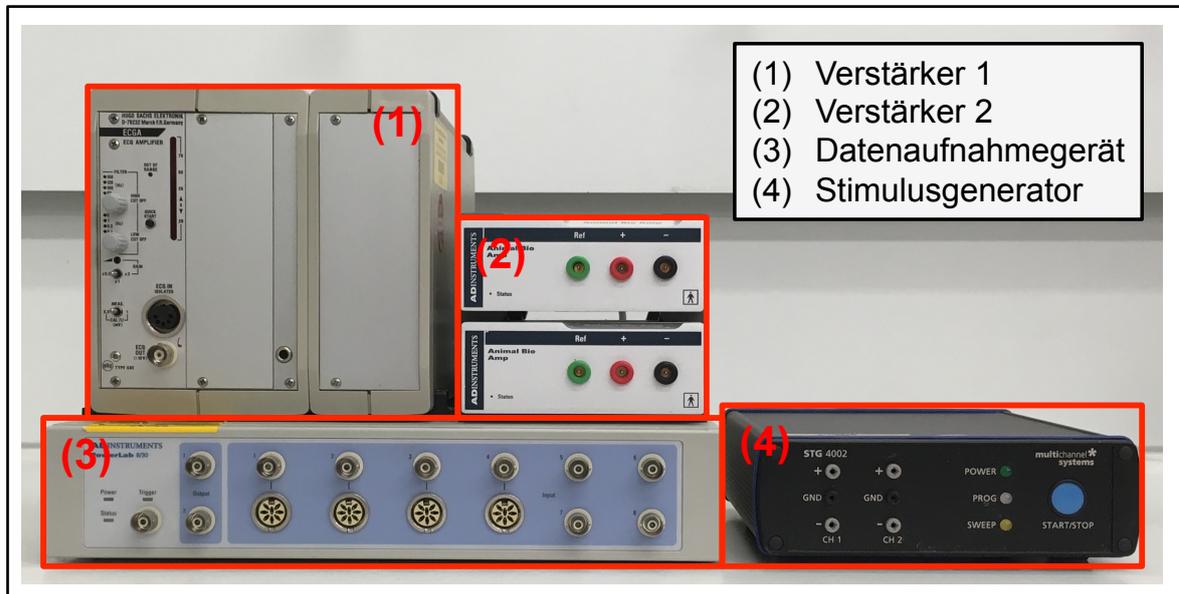
Zur Durchführung der Versuche der vorliegenden Arbeit wurde ein apparativer Versuchsaufbau bestehend aus den folgenden Materialien gewählt (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7):

- (1) Ein Elektrodenkatheter (CIB'ER Mouse Electrophysiology Catheter, NuMED, Hopkinton, USA),
- (2) ein Verstärker zur Erfassung und Amplifikation des intrakardialen EMG (Animal BioAmp FE136, ADInstruments, Oxford, Großbritannien),
- (3) ein Verstärker zur Erfassung und Amplifikation des Oberflächen-EKG bzw. des epikardialen EMG (ECG Amplifier, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland),
- (4) ein Datenaufnahmegerät (PowerLab 8/30, ADInstruments, Oxford, Großbritannien),
- (5) ein programmierbarer Stimulusgenerator (STG 4002, Multi Channels Systems, MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland) und
- (6) ein Computer zur Aufzeichnung und Verarbeitung der Daten.

Der verwendete Elektrodenkatheter verfügte über insgesamt acht Ringelektroden aus Platin (distal nach proximal: e1–e8) (Berul, 2003). Der Außendurchmesser des Katheters betrug 2,0 F (0,65 mm), der Inter-Elektrodenabstand 0,5 mm und die Elektrodenlänge 0,5 mm. Dieser Aufbau ermöglichte eine schonende Katheterisierung und eine umfangreiche Abbildung der elektrischen Herzaktivität durch Projektion der Elektroden auf die gesamte Herzachse (siehe Abbildung 7). Das intrakardiale EMG konnte zwischen zwei beliebigen der acht Elektroden bipolar abgeleitet werden. Durch die Anordnung der Ringelektroden konnte parallel über die proximalen Elektroden (e6–e8) das Elektro-Atrio-Gramm und über die distalen Elektroden (e1–e3) das Elektro-Ventrikulo-Gramm abgeleitet werden (siehe Abbildung 8). Die erfassten Signale wurden durch einen Verstärker aufgenommen und amplifiziert.

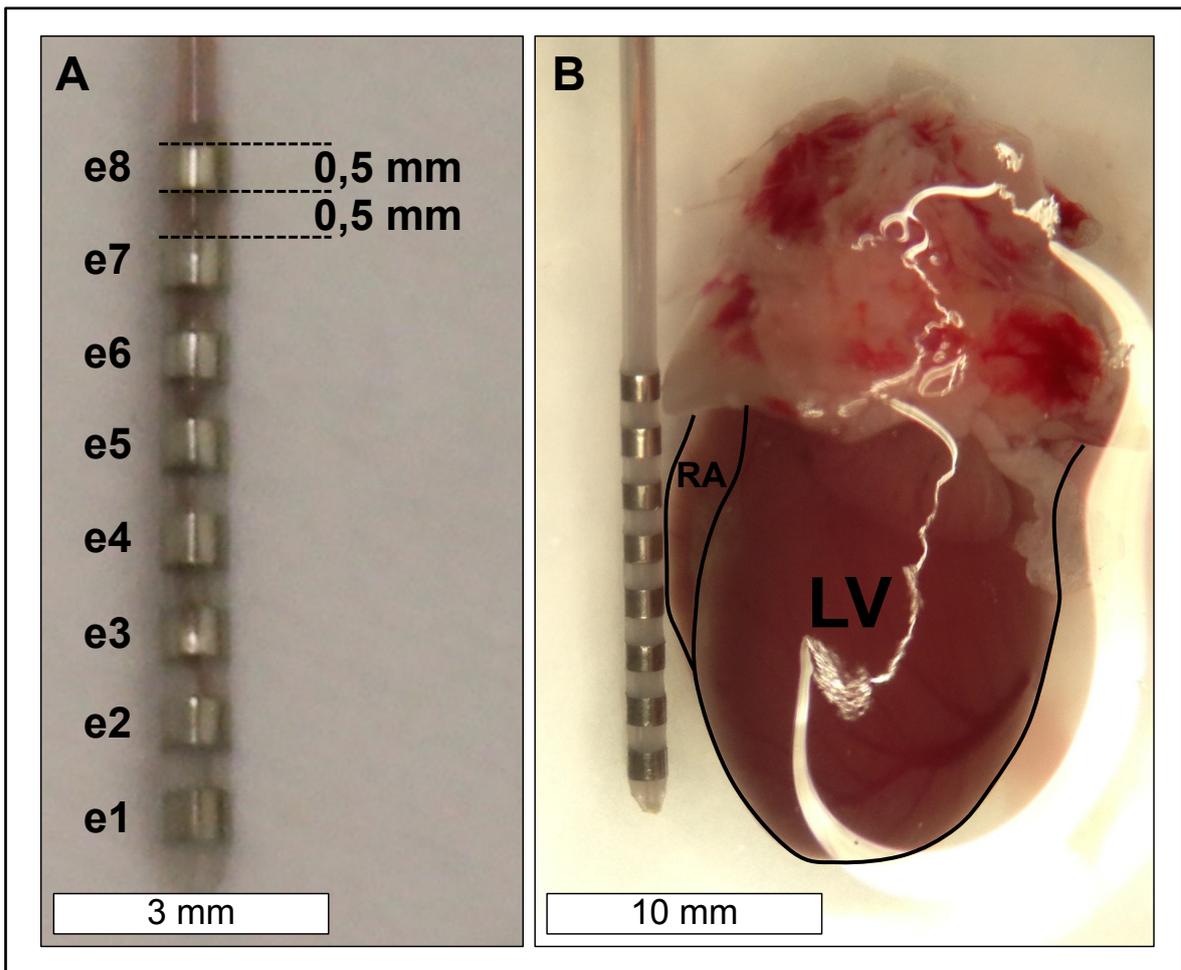
## Material und Methoden

Neben der intrakardialen Ableitung über den Elektrodenkatheter wurde das Oberflächen-EKG *in-vivo* bzw. das epikardiale EMG des isolierten Herzens *ex-vivo* abgeleitet. Zur Amplifikation wurde ebenfalls ein Verstärker verwendet.



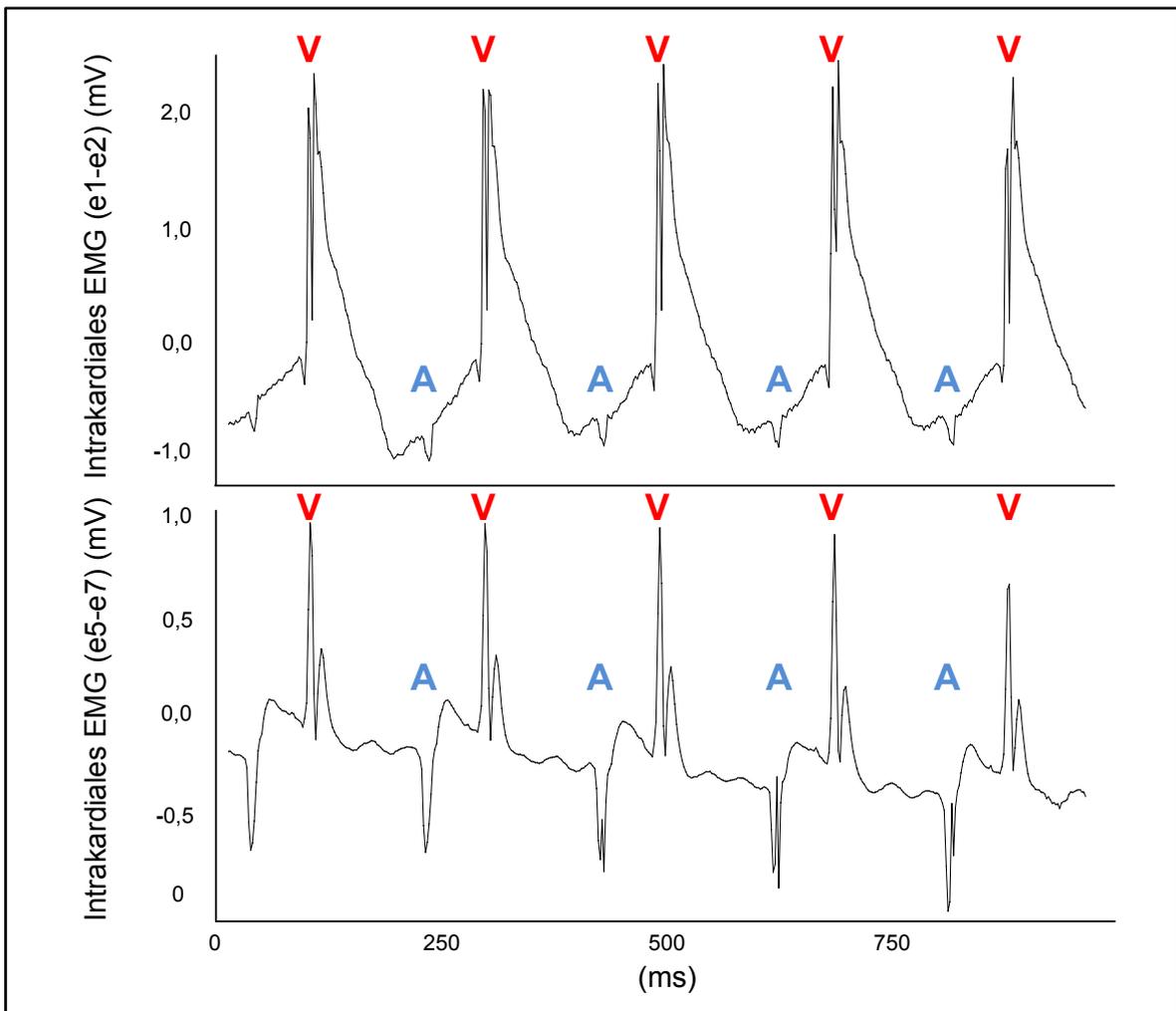
**Abbildung 6: Apparativer Versuchsaufbau**

Darstellung einer exemplarischen Anordnung der für die elektrophysiologische Untersuchung verwendeten Geräte: (1) Verstärker zur Amplifikation des Oberflächen-Elektrokardiogramms *in-vivo* bzw. des epikardialen Elektromyogramms (EMG) *ex-vivo* (ECG Amplifier, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland), (2) Verstärker zur Amplifikation des intrakardialen EMG (Animal BioAmp FE136, ADInstruments, Oxford, Großbritannien), (3) zentrales Datenaufnahmegerät (PowerLab 8/30, ADInstruments, Oxford, Großbritannien), (4) programmierbarer Stimulusgenerator (STG 4002, Multi Channels Systems, MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland). Die Kabelverbindungen der Geräte wurden zugunsten der Übersichtlichkeit entfernt.



**Abbildung 7: Elektrodenkatheter im Verhältnis zum murinen Herzen**

**A)** Detailansicht des Elektrodenkatheters (CIB'ER Mouse Electrophysiology Catheter, NuMED, Hopkinton, USA). Die acht Ringelektroden (distal nach proximal: e1–e8) waren jeweils 0,5 mm lang und 0,5 mm weit auseinander stehend (jeweils markiert durch die gestrichelten Linien). Der Maßstab ist durch den weißen Balken repräsentiert. **B)** Murines Herz neben dem verwendeten Elektrodenkatheter. Die Ringelektrode e1 projiziert sich etwa auf Höhe des *Apex cordis* und Ringelektrode e8 etwa auf Höhe der Atrien. Das Herz befindet sich in einer Salinelösung. Thymus und epikardiales Fettgewebe wurden im Rahmen der Präparation nicht entfernt. Der Maßstab ist durch den weißen Balken repräsentiert. RA: Rechter Vorhof, LV: Linker Ventrikel.



**Abbildung 8: Intrakardiales Elektromyogramm**

Darstellung des murinen intrakardialen Elektromyogramms (EMG). Dargestellt sind bipolare Ableitungen des intrakardialen EMG über einen Zeitraum von circa 1 s. In der ersten Zeile ist das Elektro-Ventrikulo-Gramm dargestellt (erfasst über die Elektroden e1 und e2). In der zweiten Zeile ist das Elektro-Atrio-Gramm dargestellt (erfasst über die Elektroden e5 und e7). Das ventrikuläre Signal (V) sowie das atriale Signal (A) sind jeweils in beiden Ableitungen markiert.

Neben der Ableitung des EMG war es möglich, über die Ringelektroden das Myokard bipolar zu stimulieren. Die Applikation der Stimuli wurde durch einen programmierbaren Stimulusgenerator ermöglicht. Der Stimulusgenerator verfügte über zwei Kanäle, die einzeln angesteuert und programmiert werden konnten. Die aufgezeichneten Daten wurden zentral durch das PowerLab 8/30 aufgenommen und an den Computer weitergeleitet. Das PowerLab 8/30 verfügte über acht Input-Kanäle, über die Daten verschiedener Quellen erfasst, aufgezeichnet und an den Computer übermittelt werden konnten. Die Zuweisung der Quellen zu den einzelnen Kanälen des PowerLab 8/30 und deren Einstellungen war beliebig möglich.

### 3.3 Software

#### 3.3.1 LabChart 8.1

Zur Aufnahme, Aufzeichnung und Auswertung der abgeleiteten Daten wurde die Software LabChart 8.1 (ADInstruments, Oxford, Großbritannien) verwendet. Diese Software ermöglichte, den Dateneingang aller Kanäle des PowerLab 8/30 in Echtzeit auszulesen, grafisch darzustellen und zu analysieren. Die Bezeichnung und die Anzahl der aufgezeichneten Kanäle konnte vor Versuchsbeginn festgesetzt werden. Die Anzahl der Kanäle war begrenzt durch die Anzahl der physischen Kanäle des PowerLab 8/30. Um eine suffiziente Aufzeichnung und Auswertung der Daten zu ermöglichen, konnten die Amplituden, die Skalierung, die SI-Einheiten und die Filtereinstellungen aller Kanäle gesondert in Abhängigkeit von der jeweiligen Quelle angepasst und die grafische Darstellung modifiziert werden.

#### 3.3.2 Mc\_Stimulus II

Zur Programmierung des Stimulusgenerators wurde die Software Mc\_Stimulus II (Multi Channels Systems, MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland) verwendet. Mithilfe dieser Software war es möglich, komplexe Stimulationen durchzuführen. Hierzu konnten die zwei Kanäle des Stimulusgenerators unabhängig voneinander angesteuert werden. Mithilfe von Mc\_Stimulus II konnten Dauer, Spannung und Form eines jeden applizierten Stimulus eingestellt werden. Darüber hinaus konnte das Intervall zwischen zwei Stimuli bis auf 1 ms genau definiert werden.

### 3.4 Stimulationsprotokoll

Das angewendete Stimulationsprotokoll (siehe Tabelle 1) basierte auf etablierten Protokolle, die entsprechend für die Untersuchung des murinen Herzens angepasst wurden (Berul et al., 1996, Schrickel et al., 2007). Weitere Ergänzungen bzw. Änderungen wurden auf Basis von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe vorgenommen (Clasen et al., 2018). Der Elektrodenkatheter wurde in den rechten Vorhof und den rechten Ventrikel eingebracht. Zur Stimulation des Myokards wurde ein Impuls mit einer Dauer von 1 ms appliziert (Schrickel et al., 2007).

Initial wurde die ventrikuläre Reizschwelle (VRS) bestimmt, indem über die ventrikulär gelegenen Elektroden 30 ventrikuläre Stimuli mit einer Basiszykluslänge von 100 ms appliziert wurden, beginnend mit einer Spannung von 500 mV. Die Spannung wurde sukzessive um 50 mV reduziert. Die VRS wurde definiert als

## Material und Methoden

---

geringste Spannung, der eine ventrikuläre Reizantwort folgte. Alle weiteren Stimulationsschritte wurden mit einer Spannung entsprechend der doppelten VRS durchgeführt, um eine regelhafte Annahme der applizierten Stimuli zu gewährleisten (Berul et al., 1996). Zur Erhebung der VRP wurde ein Stimulationszug von zwölf S1-Stimuli mit einer Basiszykluslänge von 100 ms appliziert. An die S1-Stimuli wurde ein einzelner S2-Stimulus in einem S1-S2-Intervall von 50 ms angehängt. Das S1-S2-Intervall wurde in Schritten von 2 ms verkürzt, bis dem S2-Stimulus keine ventrikuläre Reizantwort mehr folgte (Schrickel et al., 2007). Jeder Stimulationszug wurde dreimal wiederholt, um die VRP exakt zu bestimmen.

Der Protokollabschnitt zur Arrhythmieinduktion umfasste drei Schritte:

- (1) Programmierte Extrastimulation (PES) (Schrickel et al., 2007),
- (2) Miniburststimulation (MBS) (Clasen et al., 2018) und
- (3) ventrikuläre Burststimulation (VBS) (Schrickel et al., 2007).

Die PES wurde durch Applikation von acht S1-Stimuli mit einem S1-S1-Intervall von 100 ms durchgeführt. Ein einzelner S2-Stimulus mit einer Zykluslänge von  $VRP + 20$  ms wurde den S1-Stimuli angehängt. Dem S2-Stimulus folgte ein S3-Stimulus mit einem Abstand von 60 ms (S2-S3-Intervall). Das S2-S3-Intervall wurde sukzessive um 2 ms bis auf 20 ms reduziert (Schrickel et al., 2007). Der PES folgend wurde die MBS durchgeführt. Die MBS wurde von unserer Arbeitsgruppe im Rahmen von Vorversuchen etabliert und als Erweiterung dem Protokoll hinzugefügt (Clasen et al., 2018). Zwanzig S1-Stimuli mit einer Basiszykluslänge von 100 ms wurden, gefolgt von zehn S2-Stimuli, appliziert. Das S2-S2-Intervall wurde sukzessive um 2 ms in einem Intervall von 60 bis 20 ms verkürzt. Nach der MBS wurde die VBS durchgeführt. Die VBS basierte nicht auf der Verkürzung des Intervalls zwischen Extrastimuli, sondern auf der Verkürzung des S1-S1-Intervalls bei konstanter ventrikulärer Stimulation über eine Dauer von 5 s. Zunächst wurden 100 S1-Stimuli mit einem S1-S1-Intervall von 50 ms appliziert. Diese Zykluslänge wurde in den folgenden Stimulationsschritten jeweils um 10 ms (bis 10 ms) verkürzt und die Anzahl der applizierten S1-Stimuli dem entsprechend erhöht (bis 500 S1-Stimuli) (Schrickel et al., 2007). Jeder Stimulationszug wurde dreimal wiederholt.

### Tabelle 1: Stimulationsprotokoll

Übersicht des verwendeten Protokolls zur programmierten endokardialen Stimulation. Die Zeilen entsprechen der Reihenfolge der durchgeführten Stimulationsschritte.

Stimulation	Beschreibung	
VRS	30 x S1 (100 ms)	
VRP	12 x S1 (100 ms) + 1 x S2 (50–X ms)	
programmierte Ventrikelstimulation	PES	8 x S1 (100 ms) + 1 x S2 (VRP + 20 ms) + 1 x S3 (60–20 ms)
	MBS	20 x S1 (100ms) + 10 x S2 (60–20 ms)
	VBS	100 x S1 (50 ms)
		125 x S1 (40 ms)
166 x S1 (30 ms)		
250 x S1 (20 ms)		
	500 x S1 (10 ms)	

VRS: Ventrikuläre Reizschwelle, VRP: Ventrikuläre Refraktärperiode, PES: Programmierte Extrastimulation, MBS: Miniburststimulation, VBS: Ventrikuläre Burststimulation, S: Stimulus,

## 3.5 Narkose, Monitoring und Instrumentierung

### 3.5.1 Untersuchung der Maus *in-vivo*

Sämtliche untersuchten Tiere wurden über die gesamte Versuchsdauer mit Isofluran *per inhalationem* narkotisiert. Isofluran ist ein volatiles Anästhetikum, das der Gruppe der Flurane zugeordnet wird. Isofluran wirkt zentral und vermittelt durch das Gamma-Aminobuttersäure(GABA)-System seine Wirkung (Brohan und Goudra, 2017).

Zur Einleitung der Narkose wurde eine Isoflurankonzentration von 3 % gewählt. Diese wurde zur Aufrechterhaltung der Narkose über die Versuchsdauer zwischen 2 und 2,5 % gehalten. Die Narkose mit dem volatilen Anästhetikum war sicher zu steuern und der Einfluss des Flurans auf das Herzkreislaufsystem im Vergleich mit anderen Anästhetika gering (Chaves et al., 2003, Janssen et al., 2004, Constantinides et al., 2011). Das Gasgemisch (Luft (400 ml/min), Sauerstoff (O<sub>2</sub>) (200 ml/min) und Isofluran) wurde konstant über eine Narkosemaske appliziert (siehe Abbildung 9). Die Narkosemaske war so konzipiert, dass das Gasgemisch dem Tier unmittelbar zugeführt wurde. Ferner wurde das

## Material und Methoden

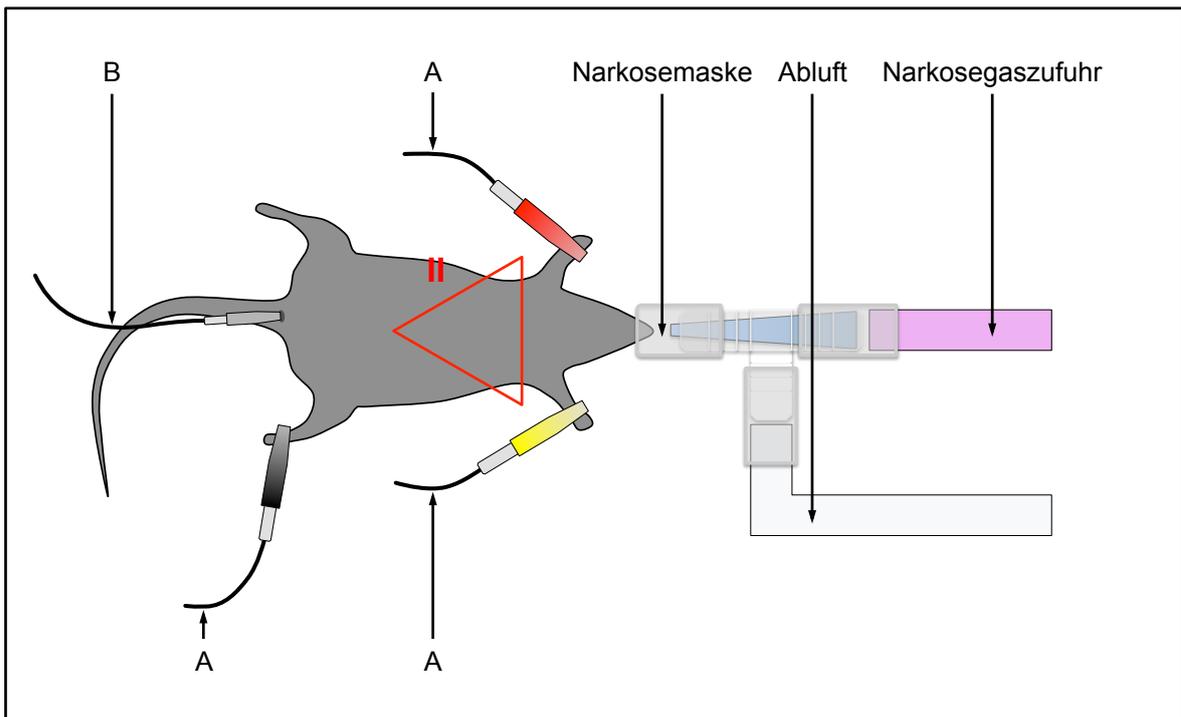
---

Expirationsgasgemisch über einen Abluftschlauch kontinuierlich abgeleitet, um eine Rückatmung mit Kumulation von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und des volatilen Anästhetikums zu verhindern.

Neben den bereits beschriebenen Elementen des apparativen Versuchsaufbaus der EPU war der Arbeitsplatz für die Untersuchungen *in-vivo* zusätzlich mit einem beheizbaren Operationstisch (Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) ausgestattet, der ein Auskühlen der Maus über die Versuchsdauer verhinderte. Die Körperkerntemperatur wurde über eine rektale Temperatursonde (T-Type Pod, ADInstruments, Oxford, Großbritannien) kontinuierlich erhoben. Darüber hinaus wurde über die gesamte Versuchsdauer das Oberflächen-EKG aufgezeichnet (siehe Abbildung 10). Hierzu wurden insgesamt drei Klemmelektroden (Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) an den Vorderläufen bzw. am linken Hinterlauf platziert. Weiter wurden durch den oben beschriebenen Elektrodenkatheter kontinuierlich das Elektro-Atrio-Gramm sowie das Elektro-Ventrikulo-Gramm durch die entsprechend platzierten Elektroden aufgezeichnet.

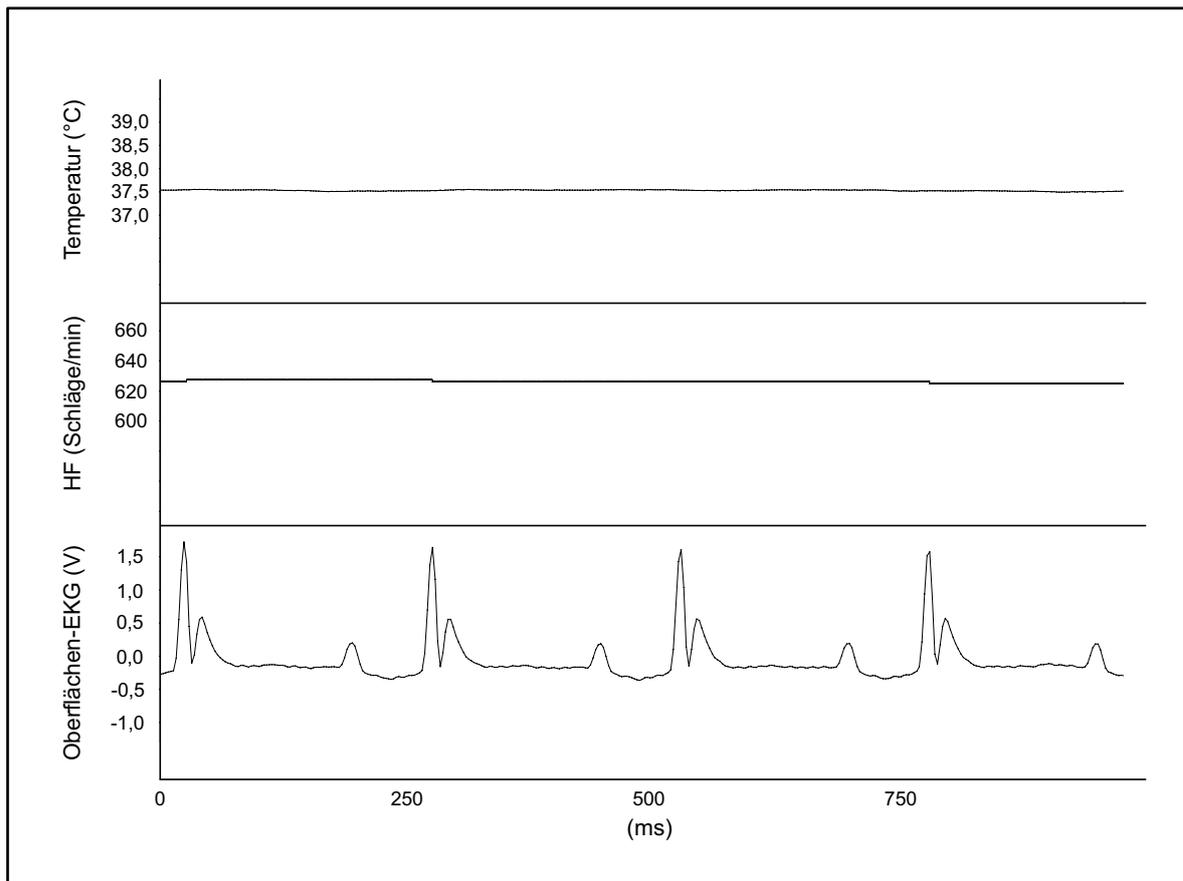
Für die Aufzeichnung wurden die folgenden Filtereinstellungen für eine möglichst artefaktarme Darstellung verwendet:

- (1) Temperatur (°C): Abtastfrequenz 1 kHz, *Range* 500 mV,
- (2) Oberflächen-EKG (V): Abtastfrequenz 1 kHz, *Range* 10 V und
- (3) intrakardiales EMG (mV): Abtastfrequenz 1 kHz, *Range* 100 mV.



**Abbildung 9: Messung der Körperkerntemperatur und Aufzeichnung des Oberflächen-Elektrokardiogramms der narkotisierten Maus**

Schematische Darstellung der Maus im Versuchsaufbau. Über drei Klemmelektroden (A, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) wurde Ableitung II nach Einthoven des Oberflächen-Elektrokardiogramms abgeleitet (Einthoven et al., 1913). Mithilfe einer rektalen Temperatursonde (B, ADInstruments, Oxford, Großbritannien) wurde kontinuierlich die Körperkerntemperatur gemessen. Die Tiere wurden im Rahmen der Untersuchungen *per inhalationem* mit Isofluran narkotisiert. Hierzu wurde eine Narkosemaske verwendet, in dieser die Maus mit der Schnauze auf dem Rücken liegend platziert wurde. Über die Narkosegaszufuhr (magenta) wurde das Gasgemisch der Maus zugeführt. Ein Schlauch (blau) leitete das Narkosegas direkt zu den oberen Atemwegen des Tieres. Ein Abluftschlauch (hellblau) leitete das Expirationsgasgemisch ab, um eine Kumulation dieses zu verhindern.



**Abbildung 10: Ableitung von Körperkerntemperatur, Herzfrequenz und Oberflächen-Elektrokardiogramm *in-vivo***

Darstellung von Körperkerntemperatur (Temperatur (°C)), Herzfrequenz (HF (Schläge/min)) und des Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG (V)) über einen Zeitraum von circa 1 s, während der Untersuchungen der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo*. Die Parameter wurden kontinuierlich über die Versuchsdauer erhoben und die HF automatisch durch die Software (LabChart 8.1, ADInstruments, Oxford, Großbritannien) anhand des RR-Intervalls ermittelt.

Zur Katheterisierung wurde die *Vena jugularis interna dextra* stumpf präpariert (Schrickel et al., 2007). Wenn sich die Vene vollständig von Fettgewebe befreit und ohne Kontakt zum umliegenden Gewebe darstellte, wurden eine kaudale sowie eine kraniale Ligatur um das Gefäß gelegt. Die kraniale Ligatur wurde bis zur vollständigen Gefäßokklusion zugezogen, um den kardiopetalen Fluss zu unterbinden und einen weiteren Blutverlust zu vermeiden. Die kaudale Ligatur wurde nicht vollständig zugezogen, da diese der Orientierung und der Katheterfixierung diene. Der Katheter wurde über einen kleinen Schnitt in die Vene eingebracht. Während der Katheterisierung wurde über die distalen Elektroden e1 und e2 kontinuierlich das EMG abgeleitet, um die Platzierung des Katheters unter Vorschub verfolgen zu können. Ein hohe Amplitude des ventrikulären EMG

verifizierte die adäquate Position des Katheters im rechten Ventrikel. War die gewünschte Lage erreicht, wurde der Katheter in seiner Position fixiert.

Zur autonomen Ganglienblockade wurden die Tiere mit Hexamethonium behandelt. Hexamethonium ist eine quartäre Amoniumverbindung und wirkt v. a. antagonistisch an den nikotinergen Acetylcholinrezeptoren der autonomen Ganglien (Starke, 2017). Das Pharmakon wurde den Tieren nach 10-minütiger Ruhe-EKG-Phase gewichtsadaptiert intraperitoneal appliziert (15 mg/kg Körpergewicht) (Rohrer et al., 1998, Li et al., 2010).

### 3.5.2 Untersuchung des isolierten Herzens

Vor Entnahme der Herzen wurden die Tiere mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg Körpergewicht), die jeweils intraperitoneal appliziert wurden, narkotisiert (Pachon et al., 2015). Ketamin ist ein dissoziatives Anästhetikum. Es vermittelt über einen Antagonismus am zentralen N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptor eine stark hypnotische und analgetische Wirkung bei Erhalt der Schutzreflexe (Engelhard und Werner, 2017). Xylazinhydrochlorid ist ein peripherer sowie zentraler  $\alpha_2$ -Rezeptor-Agonist. Durch die Bindung an den Rezeptor vermittelt Xylazinhydrochlorid sedierende, analgetische und muskelrelaxierende Effekte (Greene und Thurmon, 1988). Um die Entstehung von Thromben während der Explantation zu verhindern, wurden nach Anästhesie 250 IE unfraktionierten Heparins intraperitoneal appliziert (Liao et al., 2012, Merx et al., 2014).

Zur autonomen Ganglienblockade wurden die Tiere vor Explantation der Herzen mit Hexamethonium behandelt. Hierzu wurde das Pharmakon gewichtsadaptiert intraperitoneal appliziert (15 mg/kg) (Rohrer et al., 1998, Li et al., 2010).

Zur cholinergen Ganglienblockade wurden die Herzen mit Atropin behandelt. Atropin wirkt parasympatholytisch durch einen kompetitiven Antagonismus am muskarinergen Acetylcholinrezeptor (Starke, 2017). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Atropin in der Maus wurde das Pharmakon nicht intraperitoneal, sondern nach Explantation kontinuierlich mit Versuchsbeginn über die Perfusionslösung in einer Konzentration von 100 nM appliziert (Maier et al., 2003, Jungen et al., 2017).

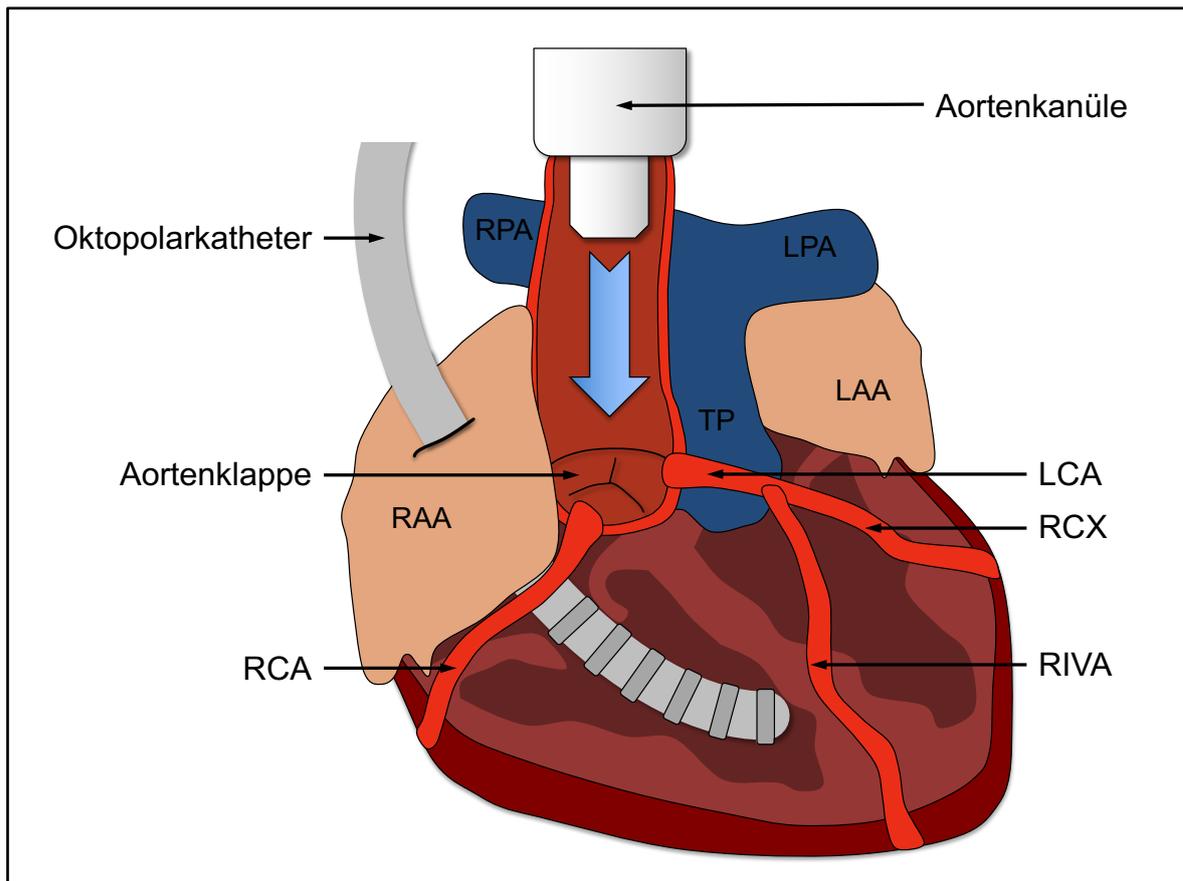
Nachdem eine suffiziente Wirkung der Anästhesie durch eine Schmerzreiztestung überprüft wurde, wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Das Herz

## Material und Methoden

---

wurde durch einen transversalen epigastrischen Schnitt und Auftrennung des Diaphragmas unter Belassung des epikardialen Fettgewebes wie auch des *Oesophagus*, der *Trachea* und des *Thymus* aus dem Thorax entfernt und in ein auf 4 °C gekühltes Bad aus Perfusionslösung überführt (Bell et al., 2011, Liao et al., 2012, Merx et al., 2014). *Oesophagus*, *Trachea* und *Thymus* wurden entfernt. Das epikardiale Fettgewebe ist v. a. im Bereich der *Fascia dorsalis* auf Höhe der Atrien lokalisiert (Hoover et al., 2009). Zur Ablation der GPs wurde eine partielle atriale Denervation (PAD) mit chirurgischer Entfernung des epikardialen Fettgewebes vor Kanülierung der Aorta durchgeführt. Bedingt durch die Größe des murinen Herzens war eine Differenzierung der einzelnen GPs und ihrer Lokalisation makroskopisch und auch lichtmikroskopisch nicht möglich. Dementsprechend wurde das gesamte Fettgewebe vor Beginn der EPU entfernt (Jungen et al., 2017).

Ein kleiner Einschnitt in das rechte Herzohr (RAA) ermöglichte die spätere Katheterisierung und ein problemloses Einbringen des Elektrodenkatheters. Die Aorta wurde gekürzt und für die Kanülierung vorbereitet. Eine entsprechende Kanüle wurde platziert und über eine Fadenligatur in ihrer Position fixiert. Der Elektrodenkatheter wurde über den zuvor gemachten Einschnitt im RAA in die vorgesehene rechtsventrikuläre Lage gebracht und mithilfe eines Klebestreifens oberhalb der Kanüle fixiert (siehe Abbildung 11) (Jungen et al., 2017).



**Abbildung 11: Retrograd perfundiertes Herz mit eingebrachtem Elektrodenkatheter**

Schematische Darstellung der anatomischen Verhältnisse des retrograd perfundierten Herzens. Über einen Schnitt im rechten Vorhofsohr (RAA) wurde der Elektrodenkatheter (CIB'ER Mouse Electrophysiology Catheter, NuMED, Hopkinton, USA) rechtsventrikulär eingebracht. Der Pfeil (hellblau) zeigt die Fließrichtung der Perfusionslösung durch die *Aorta ascendens* in Richtung der Aortenklappe sowie der Koronararterien an. LAA: Linkes Vorhofsohr, TP: *Truncus pulmonalis*, RPA: Rechte Pulmonalarterie, LPA: Linke Pulmonalarterie, RCA: Rechte Koronararterie, LCA: Linke Koronararterie, RCX: *Ramus circumflexus*, RIVA: *Ramus interventricularis anterior*.

## **Material und Methoden**

---

Zur Untersuchung des isolierten Herzens wurde ein System zur retrograden Perfusion (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) verwendet (siehe Abbildung 12).

Das verwendete System bestand aus:

- (1) Einem thermokonstanten Perfusatreervoir mit einem Umwälzthermostat,
- (2) einer Rollerpumpe,
- (3) einem Wärmetauscher,
- (4) einer feuchten Kammer,
- (5) einer elektromagnetische Flussmessung,
- (6) einem Überdruckventil und
- (7) einem Windkessel.

Das thermokonstante Perfusatreervoir bestand aus einem Umwälzthermostat und einem Wärmebad, in dem die Perfusionslösung konstant auf 39 °C gehalten und permanent mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) begast wurde (Bell et al., 2011, Merx et al., 2014). Das Herz befand sich in der feuchten Kammer des Systems, in der ein konstant temperiertes und feuchtes Milieu herrschte. Um Milieuschwankungen zu minimieren, zirkulierte kontinuierlich Wärmebadlösung (39 °C) in der Doppelwand der feuchten Kammer. Dem Herzen vorgeschaltet war ein Windkessel, in dem sich die zulaufende Perfusionslösung sammelte (Döring und Dehnert, 1988, Liao et al., 2012). Die Perfusionslösung erreichte den Windkessel über den Wärmetauscher, der in der Doppelwand der feuchten Kammer eingelassen war. Der Wärmetauscher bestand aus einer Metallspirale, die kontinuierlich mit Wärmebadlösung umspült wurde, um einen Temperaturabfall der Perfusionslösung zu verhindern. Der kontinuierliche Perfusatfluss wurde durch eine Rollerpumpe sichergestellt. Die Temperatur des Herzens wurde durch mehrfache Messungen über den Versuchsverlauf mithilfe eines Laserthermometers überwacht. Der Fluss über die Aorta (ml/min) wurde kontinuierlich über eine elektromagnetische Flussmessung erfasst, die den Perfusateinlauf in den Windkessel aufzeichnete. Des Weiteren wurde über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich die Nachlast (mmHg) als Surrogatparameter des Perfusionsdruckes erhoben. Das elektrokardiographische Monitoring erfolgte (wie in den Untersuchungen der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo*) endokardial über den entsprechenden Elektrodenkatheter, der kontinuierlich das Elektro-Atrio-Gramm sowie das

## Material und Methoden

---

Elektro-Ventrikulo-Gramm aufzeichnete. Weiter wurde durch epikardiale Platzierung eines zweiten baugleichen Elektrodenkatheters das epikardiale EMG abgeleitet. Es wurden folgende Filtereinstellungen verwendet:

- (1) Endokardiales EMG (mV): Abtastfrequenz 1 kHz, *Range* 100 mV,
- (2) epikardiales EMG (mV): Abtastfrequenz 1 kHz, *Range* 100 mV,
- (3) Aortenfluss (ml/min): Abtastfrequenz 1 kHz, *Range* 10 V und
- (4) Nachlast (mmHg): Abtastfrequenz 1 kHz, *Range* 10 V.

Zur Perfusion des Herzens wurde eine nach Merx et al. modifizierte Perfusionslösung (siehe Tabelle 2) verwendet (Merx et al., 2014, Jungen et al., 2017). Zur Herstellung der Perfusionslösung wurden zunächst 4 l Reinstwasser Typ 1 in ein Becherglas der entsprechenden Größe gefüllt. Die zuvor abgewogenen Substanzen wurden mit Ausnahme des Calciumchlorids ( $\text{CaCl}_2$ ) in das Becherglas gegeben. Die Lösung wurde über einen Zeitraum von 15 min unter ständigem Rühren mit Carbogen begast. Anschließend wurde das  $\text{CaCl}_2$  hinzugegeben und die Lösung weiterhin kontinuierlich bis zur vollständigen Lösung des  $\text{CaCl}_2$  begast und gerührt. Die Lösung wurde darauf in ein Vakuumfiltersystem überführt und durch einen Sterilfilter filtriert (Milipore Type 0,45  $\mu\text{m}$  HA MF-Membrane Filter, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Die fertige Perfusionslösung wurde bis zum Versuchsbeginn bei 4 °C gelagert.

## Material und Methoden

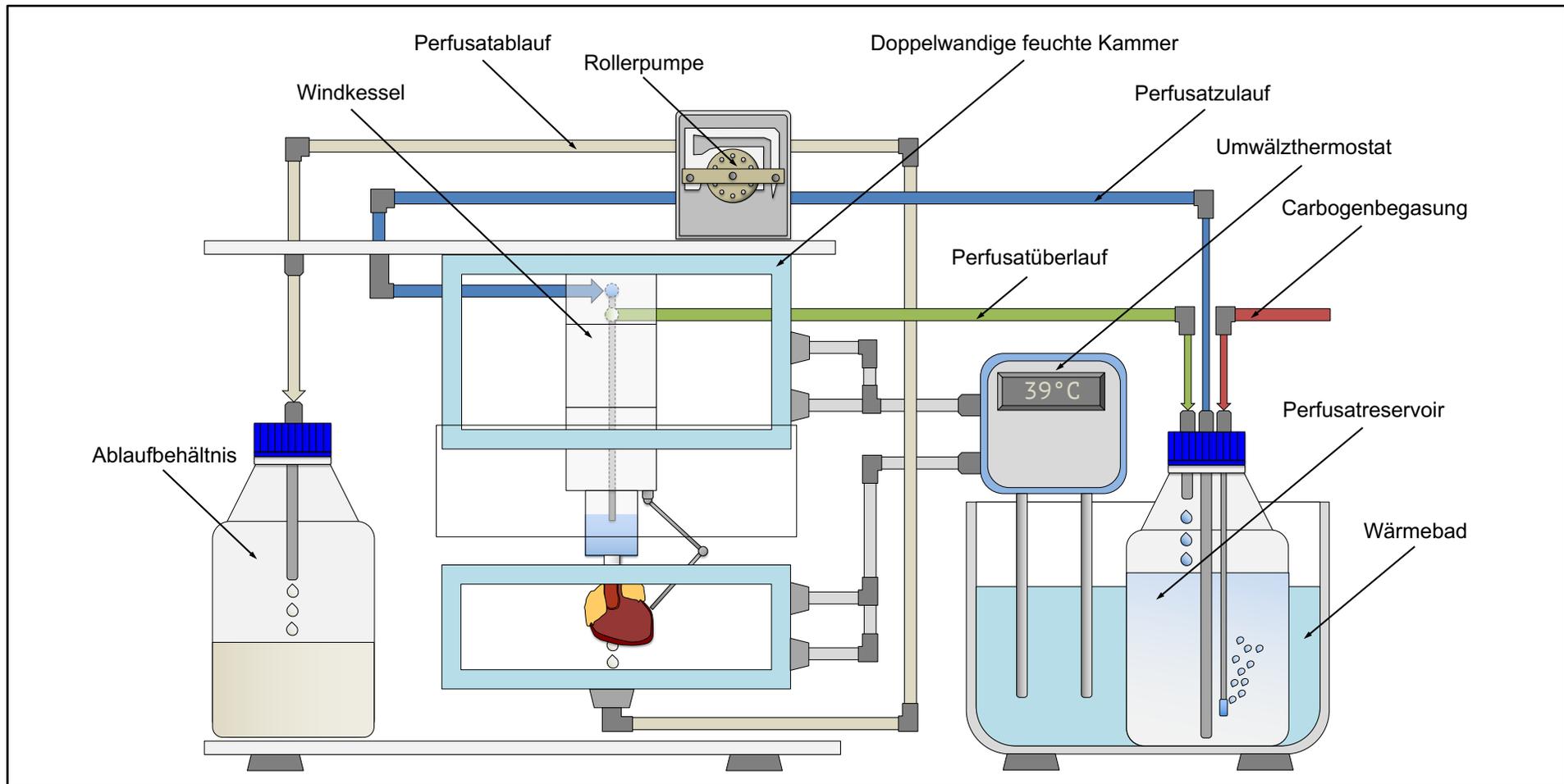
---

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Perfusionslösung**

Übersicht der verwendeten Stoffe zur Herstellung von 4 l Perfusionslösung zur retrograden Perfusion des isolierten Herzens. Modifiziert nach Merx et al. (Merx et al., 2014).

Chemikalie	Masse (g)	Molarität (mM)	Firma, Hauptsitz
NaCl	27,6 g	118	KMF Optichem, Leipzig, Deutschland
KCl	1,4 g	4,7	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgSO <sub>4</sub>	0,8 g	0,8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaHCO <sub>3</sub>	8,36 g	25	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,64 g	1,2	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	3,6 g	5,0	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	0,88 g	1,0	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CaCl <sub>2</sub>	1,48g	2,5	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

NaCl: Natriumchlorid, KCl: Kaliumchlorid, MgSO<sub>4</sub>: Magnesiumsulfat,  
NaHCO<sub>3</sub>: Natriumhydrogencarbonat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Kaliumdihydrogenphosphat, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>: Glukose,  
C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>: Natriumpyruvat, CaCl<sub>2</sub>: Calciumchlorid.



**Abbildung 12: Übersichtsdarstellung der Langendorff-Anlage**

Schematische Darstellung der verwendeten Anlage (Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland). Rot: Carbogenbegasung des Perfusats, Blau: Perfusatzulauf über einen Wärmetauscher in der Doppelwand der feuchten Kammern und über den Windkessel zum isolierten Herzen, Grün: Perfusatüberlauf aus dem Windkessel zurück in das Reservoir, Beige: Ablauf des verbrauchten Perfusats. Die Perfusionslösung wurde in einem Wärmebad auf 39 °C erwärmt und zirkulierte mithilfe einer kontinuierlich arbeitenden Rollerpumpe.

### 3.6 Versuchsablauf

#### 3.6.1 Untersuchung der Maus *in-vivo*

Im Rahmen der Untersuchungen der C57Bl/6-Wildtyp-Mäuse *in-vivo* wurde nicht nur eine invasive EPU mit Bestimmung der VRP und der Arrhythmieinduzierbarkeit durchgeführt, sondern auch die Herzfrequenz einer Kohorte zur Basischarakterisierung unter kontinuierlichem Anstieg der Körperkerntemperatur erhoben.

Hierzu wurde nach Einleitung der Narkose und Platzierung der Maus auf dem Operationstisch die Körperkerntemperatur des Tieres kontinuierlich bis 41 °C erhöht. Über die gesamte Versuchsdauer wurde das Oberflächen-EKG aufgezeichnet, um anhand dessen die Herzfrequenz in Relation zum Anstieg der Temperatur auswerten zu können. Die Untersuchung zur Erfassung der Herzfrequenz unter sukzessiver Erhöhung der Körperkerntemperatur dauerte circa (ca.) 40 min.

Zur Durchführung einer kombinierten nicht-invasiven wie invasiven EPU wurde nach adäquater Narkose, Platzierung der Maus auf dem Operationstisch und Initiierung des oben beschriebenen Monitorings eine 30-minütige Ruhe-EKG-Phase aufgezeichnet. Nach der Aufzeichnung des Ruhe-EKG erfolgte die Präparation und Katheterisierung. Nachdem der Katheter in den rechten Ventrikel eingebracht war, wurde die EPU entsprechend des oben beschriebenen Protokolls durchgeführt. Die gesamte Versuchsdauer betrug ca. 100 min.

#### 3.6.2 Untersuchung des isolierten Herzens

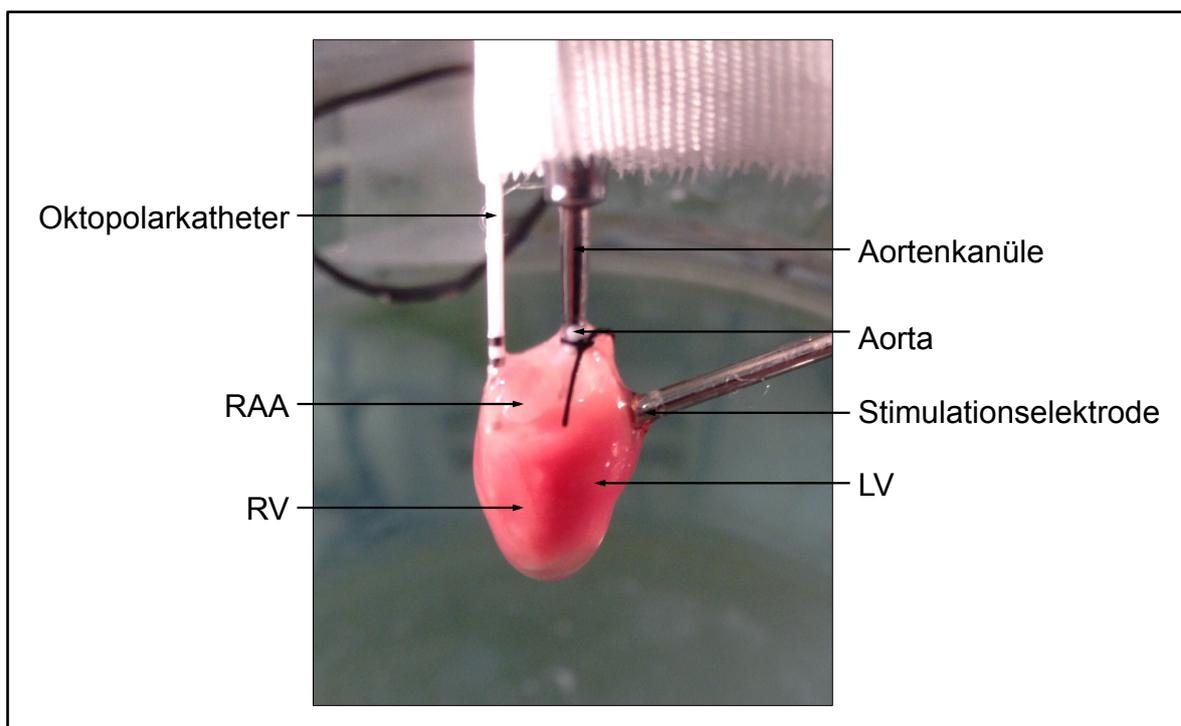
Auch im Rahmen der Untersuchungen des isolierten Herzens wurde eine invasive EPU mit Bestimmung der VRP und der Arrhythmieinduzierbarkeit entsprechend des oben beschriebenen Stimulationsprotokolls durchgeführt.

Vor Versuchsbeginn wurde das Wärmebad auf eine Temperatur von 39 °C eingestellt und die Perfusionslösung unter kontinuierlicher Begasung mit Carbogen erwärmt. Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung wurde das Herz explantiert und für den Versuch vorbereitet. Sobald das Herz kanüliert und in die feuchte Kammer überführt war, wurde das Herz epikardial stimuliert, um über die gesamte Versuchsdauer eine konstante Herzfrequenz aufrecht zu halten (siehe Abbildung 13) (Merx et al., 2014, Jungen et al., 2017). Der Präparation, Kanülierung und Katheterisierung schloss sich eine 20-minütige Äquilibrilierungsphase an. Über die

## Material und Methoden

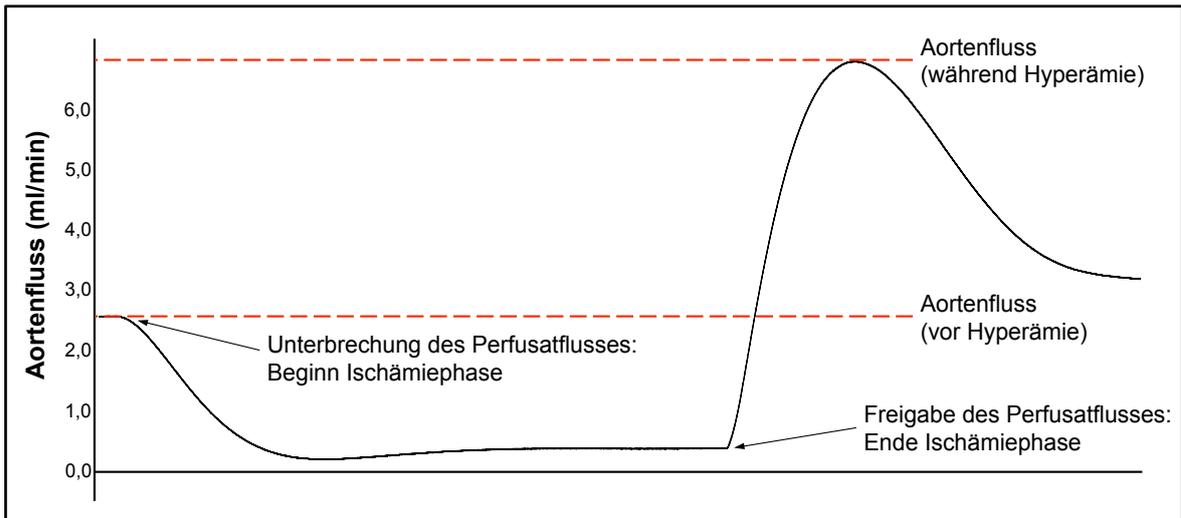
---

Zeit der Äquilibration pendelte der Koronarfluss, bis dieser nach etwa 18 bis 20 min ein stabiles Niveau erreichte und mit der Hyperämietestung fortgeföhren werden konnte (Döring und Dehnert, 1988, Merx et al., 2014, Jungen et al., 2017). Die Hyperämietestung diente der Überprüfung der Koronarvitalität. Für 20 s wurde der Koronarfluss unterbrochen. Waren die Koronararterien vital, zeigten diese als Reaktion auf Sauerstoffmangel und akkumulierende Metaboliten eine Dilatation und einen damit einhergehenden Flussanstieg auf mindestens 150 % (siehe Abbildung 14) (Kingsbury et al., 2001). War der Flussanstieg adäquat, wurde das oben beschriebene Stimulationsprotokoll durchgeführt.



**Abbildung 13: Kanüliertes isoliertes Herz**

Detailansicht des isolierten Herzens. Der Elektrodenkatheter wurde zur kontinuierlichen Ableitung des intrakardialen Elektromyogramms durch einen Einschnitt im rechten Vorhofsohr (RAA) rechtsventrikulär platziert. Die Stimulationselektrode wurde epikardial auf dem linken Ventrikel (LV) platziert. RV: Rechter Ventrikel.

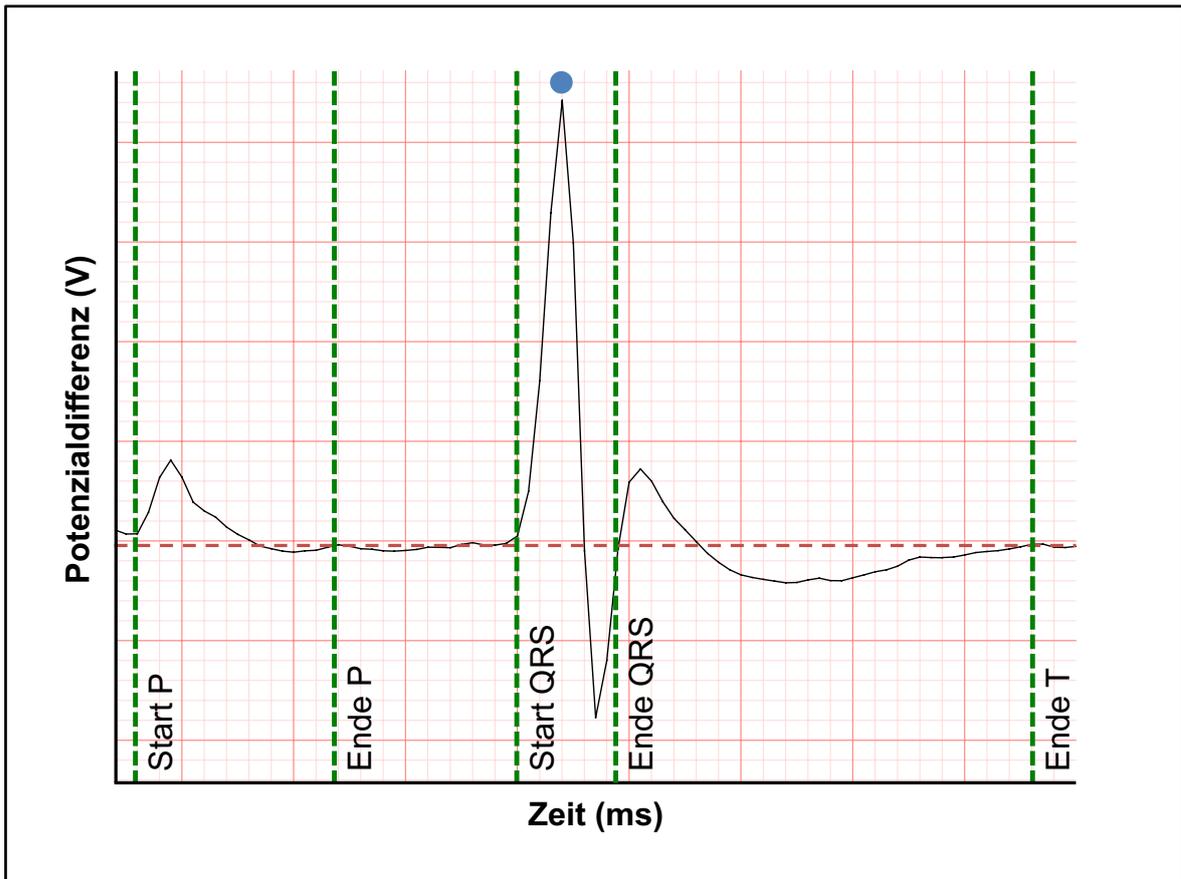


**Abbildung 14: Verlauf des Aortenflusses im Rahmen der Hyperämietestung**

Darstellung einer Übersicht der Hyperämietestung im Rahmen der Versuche am isolierten Herzen. Nach Unterbrechen des Perfusatzuflusses, fiel der aortale Fluss von circa (ca.) 2,5 ml/min rapide ab. Die Ischämiephase wurde für eine Dauer von 20 s gehalten. Nach erneuter Freigabe des Zuflusses, stieg der Fluss auf ca. 7 ml/min an. Dies entsprach einem Flussanstieg auf mehr als 150 % des Ausgangsniveaus (2,5 ml/min), daher wurde davon ausgegangen, dass das Herz vital war.

### 3.7 Auswertung des Oberflächen-Elektrokardiogramms

Zur Auswertung des Oberflächen-EKG wurden 50 aufeinanderfolgende Schläge nach etwa 20-minütiger Ruhe-EKG-Phase herangezogen und gemittelt. Hierzu wurde LabChart 8.1 verwendet. Die Analysesoftware definierte innerhalb eines durch den Untersucher festgelegten Intervalls die R-Zacken und mittelte anhand der ausgewählten Schläge die Daten. In einem zweiten Schritt wurden durch den Untersucher Beginn und Ende der P-Welle, des QRS-Komplexes und das Ende der T-Welle definiert (siehe Abbildung 15). Wie bereits beschrieben, fehlt dem murinen Oberflächen-EKG eine konkret umschriebene positive T-Welle, da die ventrikuläre Depolarisation unmittelbar ohne Plateauphase in die Repolarisation übergeht (Liu et al., 2004, Boukens et al., 2014). Das Ende der T-Welle des murinen Oberflächen-EKG wurde als Punkt definiert, an dem die Potenzialdifferenz nach dem QRS-Komplex wieder die isoelektrische Linie erreichte (Verheule et al., 1999, Boukens et al., 2014). Zur Frequenzkorrektur der QT-Zeit im Mausmodell wurde die QTc-Zeit (frequenzkontrollierte QT-Zeit) nach Mitchell et al. durch die Analysesoftware anhand der folgenden Formel errechnet:  $QTc = QT_0 / (RR_0 / 100)^{1/2}$  (Mitchell et al., 1998, Boukens et al., 2014).



**Abbildung 15: Auswertung des murinen Oberflächen- Elektrokardiogramms**

Darstellung eines Ausschnitts eines murinen Oberflächen-Elektrokardiogramms (EKG). Dargestellt ist eine vollständige elektrische Herzaktion mit P-Welle (P), QRS-Komplex (QRS) und T-Welle (T) (x-Achse: Zeit (ms), y-Achse: Potenzialdifferenz (V)). Die einzelnen Abschnitte des murinen EKG sind durch grün gestrichelte Linien voneinander getrennt, die rote gestrichelte Linie markiert die isoelektrische Linie. Zur Auswertung des murinen Oberflächen-EKG wurden 50 Herzaktionen übereinandergelegt und gemittelt. Die R-Zacken der QRS-Komplexe (markiert durch den blauen Punkt) wurden durch die Software LabChart 8.1 (ADInstruments, Oxford, Großbritannien) definiert. Start- und Endpunkte (markiert durch die senkrechtstehenden gestrichelten grünen Linien) der EKG-Abschnitte wurden durch den Untersucher definiert (wie in der obenstehenden Abbildung exemplarisch gezeigt). Die orangefarbene Linie repräsentiert die isoelektrische Linie des EKG.

### 3.8 Arrhythmiequantifizierung

Um die Auswertung der induzierten Arrhythmien zu standardisieren, wurden die Arrhythmien anhand der von Curtis et al. überarbeiteten *Lambeth Conventions* definiert (Curtis et al., 2013). Die *Lambeth Conventions* wurden als Werkzeug zur standardisierten Untersuchung und Auswertung von experimentell induzierten Herzrhythmusstörungen etabliert und sind unabhängig von dem Modell sowie der untersuchten Spezies (Walker et al., 1988). Curtis et al. optimierten und erweiterten diese Leitlinien auf Basis des aktuellen Wissensstandes (Curtis et al., 2013).

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung ventrikulärer Arrhythmien. Die *Lambeth Conventions* differenzieren zwischen sechs verschiedenen relevanten ventrikulären Arrhythmien:

- (1) Ventrikuläre Extrasystole (VES),
- (2) Bigemini,
- (3) Salven,
- (4) ventrikuläre Tachykardie (VT),
- (5) *Torsade de pointe* (TdP) und
- (6) Kammerflimmern.

VES wurden definiert als verfrüht einfallende ventrikuläre Komplexe, die sich in Form und Amplitude von dem vorhergehenden ventrikulären Komplex unterschieden. Bigemini wurden definiert als Sequenz: VES – Sinusschlag – VES, wobei die VES in Form, Amplitude und zeitlichem Abstand zum vorhergehenden Sinusschlag identisch waren. Zwei oder mehr aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe wurden als Salve definiert. Curtis et al. definierten VTs als vier oder mehr aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, unabhängig davon, ob es sich bei diesen um VES handelte (Curtis et al., 2013). Des Weiteren wurde zwischen monomorphen und polymorphen VTs unterschieden. Die Komplexe einer monomorphen VT unterschieden sich nicht in Form, Amplitude oder Intervall. Die Komplexe einer polymorphen VT variierten dagegen in Form und / oder Amplitude und / oder Intervall. Als Sonderform der polymorphen VT wurde die TdP beschrieben. Diese wurde als vier oder mehr aufeinanderfolgende ventrikulären Komplexe definiert, deren Amplituden spindelförmig variierten. Kammerflimmern wurde definiert als vier oder mehr aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, die sich in Form, Amplitude und Intervall in unregelmäßiger Weise voneinander

unterschieden (Curtis et al., 2013). Um die induzierten Arrhythmien quantifizieren zu können, wurden Arrhythmie-Scoring-Systeme verwendet. Ein Scoring-System zur Quantifizierung ventrikulärer Arrhythmien in der Maus wurde durch Faggioni et al. beschrieben (Faggioni et al., 2013). Dieses Scoring-System wies den einzelnen Tieren in Abhängigkeit von der schwersten aufgetretenen ventrikulären Arrhythmie einen vorher festgelegten Punktwert zu. Traten keine bzw. nur vereinzelte VES auf, entsprach dies dem Punktwert null. Waren gehäuft VES oder Bigemini zu sehen, wurde ein Punkt vergeben. Bei Auftreten eines Couplets, das als zwei aufeinanderfolgende VES definiert wurde, erhielt das untersuchte Tier zwei Punkte. Das Auftreten von VTs wurde mit drei Punkten bewertet (siehe Tabelle 3) (Faggioni et al., 2013).

Neben dem Scoring von Faggioni et al. wurde auch ein Arrhythmie-Scoring-System der eigenen Arbeitsgruppe zur Arrhythmiequantifizierung verwendet (Faggioni et al., 2013, Clasen et al., 2018). Dieses Scoring-System quantifizierte die Arrhythmieinduzierbarkeit nicht anhand der schwersten ventrikulären Arrhythmie, sondern kumulierte die Punkte der einzelnen Rhythmusstörungen einer Untersuchung (Clasen et al., 2018). Die Definition der ventrikulären Arrhythmien erfolgte auf Basis der *Lambeth Conventions* (Curtis et al., 2013). Eingeschlossen wurden VES, Couplets, Triplets und VTs. Couplets waren definiert als zwei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, dementsprechend waren Triplets als drei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe definiert (Curtis et al., 2013). VES wurden mit je einem Punkt bewertet. Das Auftreten eines Couplets entsprach drei und das Auftreten eines Triplets vier Punkten. VTs wurden anhand ihrer Dauer weiter differenziert und dahingehend unterschiedlichen Punktwerten zugeordnet. VTs mit einer Dauer von weniger als 1 s wurden mit fünf Punkten, VTs mit einer Dauer von 1 s oder länger wurden mit sechs Punkten bewertet (siehe Tabelle 4). Unabhängig von dem verwendeten Arrhythmie-Scoring-System wurden die ventrikulären Arrhythmien innerhalb eines Zeitraumes von 5 s nach jedem Stimulationszug der PES, der MBS sowie der VBS ausgewertet.

**Tabelle 3: Arrhythmie-Scoring-System nach Faggioni et al. (Faggioni et al., 2013)**

Übersicht der durch Faggioni et al. eingeschlossenen ventrikulären Arrhythmien einschließlich entsprechender Punkte (Faggioni et al., 2013).

Arrhythmie	Punkte
VES (keine bzw. vereinzelt)	0
VES (häufig) oder Bigemini	1
Couplet	2
VT	3

VES: Ventrikuläre Extrasystole, Couplet: Zwei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, VT: Ventrikuläre Tachykardie (mindesten vier aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe)

**Tabelle 4: Arrhythmie-Scoring-System zur kumulativen Quantifizierung**

Übersicht der im kumulativen Arrhythmie-Scoring-System eingeschlossenen ventrikulären Arrhythmien einschließlich entsprechender Punkte.

Arrhythmie	Punkte
VES	1
Couplet	3
Triplet	4
VT < 1 s	5
VT ≥ 1 s	6

VES: Ventrikuläre Extrasystole, Couplet: Zwei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, Triplet: Drei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, VT: Ventrikuläre Tachykardie (mindesten vier aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe)

### 3.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Alle kontinuierlichen Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, alle diskreten Werte sind als n-Zahlen oder in % angegeben.

Zur Testung auf Normalverteilung der vorliegenden Stichproben wurde ein Shapiro-Wilk-Test gerechnet.

Abhängig von der Verteilung der Daten wurde bei parametrisch verteilten Daten eine One-way-ANOVA bzw. bei nicht-parametrischer Verteilung ein Kruskal-Wallis-Test zur Berechnung von signifikanten Unterschieden zwischen mehreren Kohorten gerechnet.

Der statistische Zusammenhang zwischen zwei einzelnen Kohorten wurde bei parametrischer Verteilung der Daten durch einen ungepaarten zweiseitigen t-Test bzw. bei nicht-parametrischer Datenverteilung durch einen ungepaarten zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test untersucht.

Zur Berechnung der Korrelation zweier Parameter wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Bei einem Korrelationskoeffizienten von  $r > 0,8$  wurde von einer hohen Korrelation der betrachteten Parameter ausgegangen. Der lineare Zusammenhang der Parameter wurde mithilfe eines Streudiagramms gesichert. Für alle verwendeten Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt, womit alle  $p$ -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) unter 0,05 als statistisch signifikant angenommen wurden.

### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Elektrophysiologische Untersuchung der Maus *in-vivo*

Im Rahmen der Untersuchung der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo* konnte erfolgreich eine standardisierte Methodik zur kombinierten nicht-invasiven und invasiven EPU etabliert und angewendet werden. Neben einer elektrophysiologischen Basischarakterisierung des untersuchten Mausstammes konnte erfolgreich die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien mithilfe programmierter Ventrikelstimulation untersucht werden. Insgesamt wurden 22 Untersuchungen eingeschlossen (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Anzahl der eingeschlossenen Versuche der elektrophysiologischen Untersuchung der Maus *in-vivo***

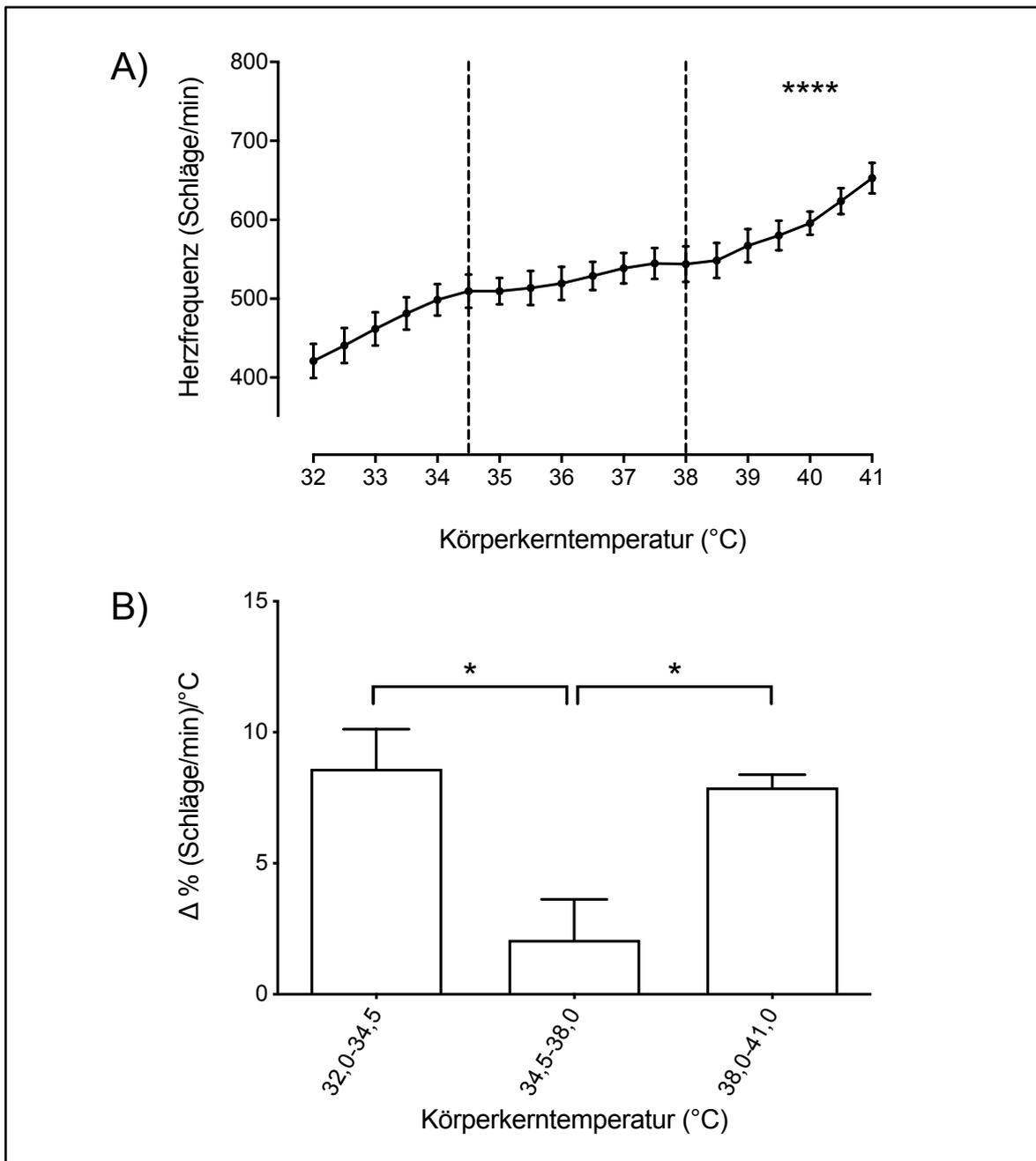
		Elektrophysiologische Basischarakterisierung			Programmierte Ventrikelstimulation
		Temperatur	EKG	VRP	
<b>Kontrolle</b>	16	5	11	11	5
<b>Autonome Ganglienblockade</b>	6	-	6	6	6

EKG: Elektrokardiogramm, VRP: Ventrikuläre Refraktärperiode

### 4.1.1 Einfluss der Körperkerntemperatur auf die kardiale Elektrophysiologie

Zur Bestimmung des Einflusses der Körperkerntemperatur auf die kardiale Elektrophysiologie mit dem Ziel einer Standardisierung der EPU der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo*, wurde der Herzfrequenzverlauf unter steigender Körperkerntemperatur erhoben.

In allen untersuchten Tieren stieg die Herzfrequenz bei Erhöhung der Körperkerntemperatur an. Abbildung 16A zeigt die Abhängigkeit der Herzfrequenz von der Körperkerntemperatur. Beide Parameter korrelierten in dem vorliegenden Versuchsaufbau im betrachteten Intervall der Körperkerntemperatur (32–41 °C) signifikant positiv miteinander ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,9712$ ). In den untersuchten Tieren verlief der Anstieg der Herzfrequenz im Betrachtungsintervall nicht proportional zum Anstieg der Körperkerntemperatur. Zwischen 34,5 und 38,0 °C flachte der Anstieg der Herzfrequenz bei weiterhin steigender Körperkerntemperatur in ein Plateau ab. Die prozentuale Änderung der Herzfrequenz pro °C ( $\Delta \% (\text{Schläge/min})/^\circ\text{C}$ ) war während dieser Plateauphase ( $2,08 \pm 1,543 \Delta \%$ ) signifikant niedriger als das  $\Delta \%$  zwischen 32,0 und 34,5 °C ( $8,60 \pm 1,514 \Delta \%$ ,  $p = 0,0317$ ) als auch zwischen 38,0 und 41,0 °C ( $7,89 \pm 0,488 \Delta \%$ ,  $p = 0,0317$ ) (siehe Abbildung 16B). Die prozentuale Änderung der Herzfrequenz pro °C zeigte im Vergleich zwischen den Intervallen 32,0 bis 34,5 °C und 38,0 bis 41,0 °C keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,904$ ).



**Abbildung 16: Abhängigkeit von Herzfrequenz und Körperkerntemperatur**

Die Herzfrequenz wurde während einer kontinuierlichen Erhöhung der Körperkerntemperatur in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus in Narkose mit Isofluran erhoben. **A)** Körperkerntemperatur (°C, x-Achse) und Herzfrequenz (Schläge/min, y-Achse) korrelierten signifikant positiv miteinander ( $n = 5$ ,  $p < 0,0001$ ,  $r = 0,9712$ , Pearson-Korrelation). Die senkrecht stehenden Linien markieren die Dreigliederung des Herzfrequenzverlaufs zwischen 32 und 41 °C Körperkerntemperatur. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. **B)** Der prozentuale Anstieg der Herzfrequenz pro °C ( $\Delta \% (\text{Schläge/min})/^\circ\text{C}$ , y-Achse) zeigte einen dreiphasigen Verlauf in Abhängigkeit von der Körperkerntemperatur (°C, x-Achse). Im Intervall von 32,0 bis 34,5 °C ( $p = 0,0317$ ) und von 38,0 bis 41,0 °C ( $p = 0,0317$ , Mann-Whitney-U-Test (ungepaart, zweiseitiger)) war das  $\Delta \%$  signifikant größer als im Intervall von 34,5 bis 38 °C. Die  $\Delta \%$  in den Intervallen von 32,0 bis 34,5 °C und von 38,0 bis 41,0 °C zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,904$ , Mann-Whitney-U-Test (ungepaart, zweiseitiger)). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 4.1.2 Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die kardiale Elektrophysiologie *in-vivo*

Durch Standardisierung der Bedingungen konnte ein reproduzierbares Modell zur Untersuchung und elektrophysiologischen Basischarakterisierung der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo* etabliert werden. Die Daten der Basischarakterisierung der nicht-invasiven EPU sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6: Elektrophysiologische Basischarakterisierung *in-vivo***

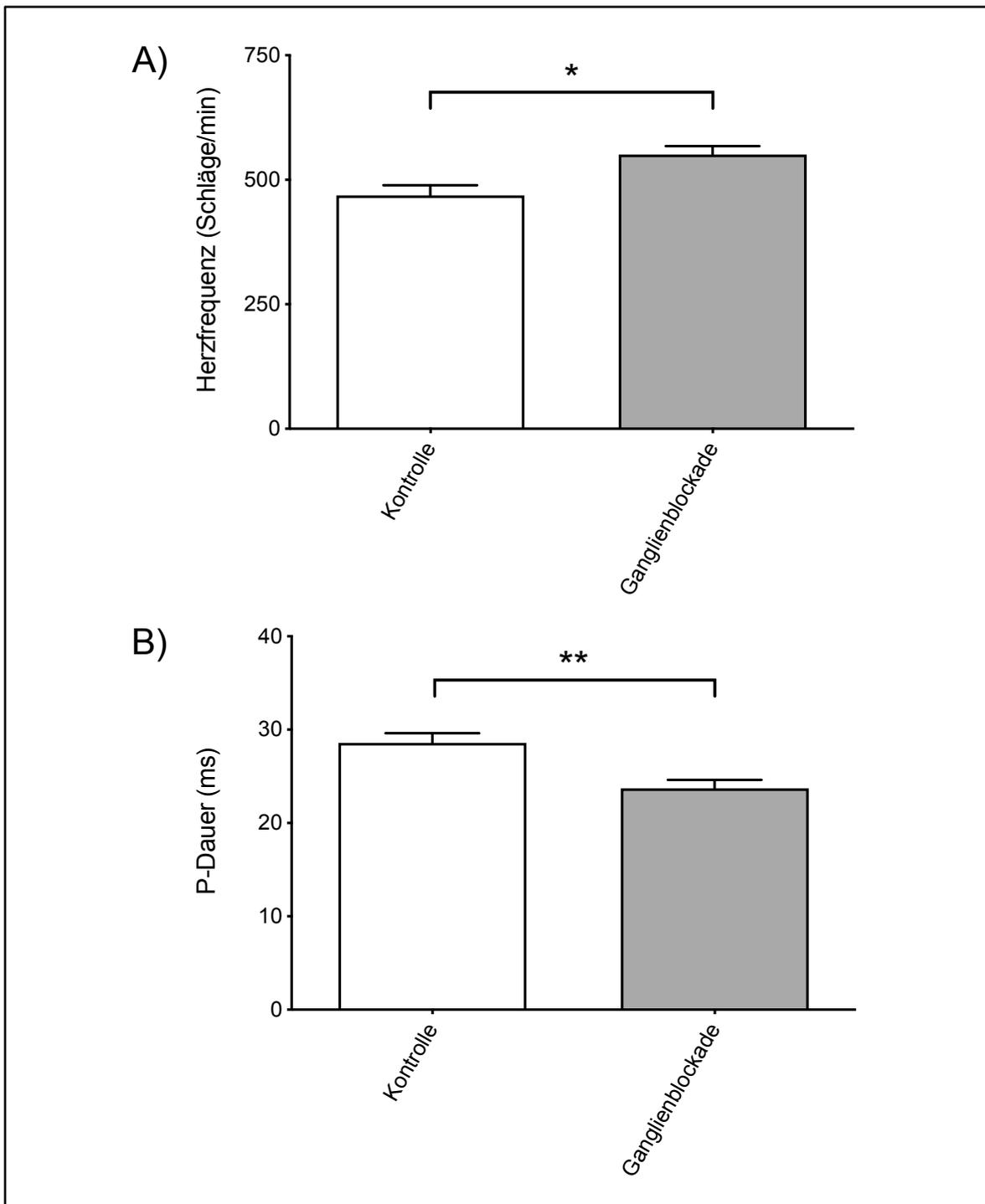
Die aufgeführten Parameter des Oberflächen-Elektrokardiogramms wurden in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus in Narkose mit Isofluran erhoben (Körperkerntemperatur: 34,5 bis 38,0 °C). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

<b>RR-Intervall</b>	130,28 $\pm$ 5,29 ms
<b>Herzfrequenz</b>	469,13 $\pm$ 19,38 Schläge/min
<b>PR-Intervall</b>	37,36 $\pm$ 0,83 ms
<b>P-Dauer</b>	28,59 $\pm$ 0,97 ms
<b>QRS-Dauer</b>	10,31 $\pm$ 0,64 ms
<b>QTc-Zeit</b>	48,8 $\pm$ 4,03 ms

QTc-Zeit: frequenzkontrollierte QT-Zeit

Neben der elektrophysiologischen Basischarakterisierung des untersuchten Mausstammes wurden die Parameter des Oberflächen-EKG auch unter autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium erhoben.

Unter autonomer Ganglienblockade war die Herzfrequenz *in-vivo* signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle (551,1  $\pm$  15,34 Schläge/min versus (vs.) 469,13  $\pm$  19,38 Schläge/min,  $p = 0,011$ ) (siehe Abbildung 17A). Des Weiteren war die Dauer der P-Welle unter autonomer Ganglienblockade im Vergleich zur Kontrolle signifikant kürzer (23,72  $\pm$  0,81 ms vs. 28,59  $\pm$  0,97 ms,  $p = 0,008$ ) (siehe Abbildung 17B). Das PR-Intervall (37,36  $\pm$  0,83 ms vs. 37,86  $\pm$  1,33 ms,  $p = 0,759$ ), die QRS-Dauer (10,31  $\pm$  0,64 ms vs. 8,74  $\pm$  0,214 ms,  $p = 0,19$ ) sowie die QTc-Zeit (48,8  $\pm$  4,03 ms vs. 49,85  $\pm$  3 ms,  $p = 0,9784$ ) waren unter autonomer Ganglienblockade im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert.



**Abbildung 17: Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die Herzfrequenz und die atriale Erregung *in-vivo***

Das Oberflächen-Elektrokardiogramm wurden in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus in Narkose mit Isofluran aufgezeichnet (Körperkerntemperatur: 34,5 bis 38,0 °C). **A)** Unter autonomer Ganglienblockade (n = 8) (Hexamethonium 15 mg/kg) war die Herzfrequenz (Schläge/min, y-Achse) im Vergleich zur Kontrolle (n = 11) signifikant höher ( $p = 0,011$ , Mann-Whitney-U-Test (ungepaart, zweiseitig)). **B)** Die P-Dauer (ms, y-Achse) zeigte sich unter autonomer Ganglienblockade (n = 5) (Hexamethonium 15 mg/kg) signifikant kürzer als in der Kontrolle (n = 6) ( $p = 0,008$ , Mann-Whitney-U-Test (ungepaart, zweiseitig)). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### 4.1.3 Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die ventrikuläre Repolarisation *in-vivo*

Der nicht-invasiven EPU folgte die invasive Untersuchung mit Erhebung der VRP zur Vervollständigung der oben genannten Basischarakterisierung.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass eine Bestimmung der VRP *in-vivo* suffizient und reproduzierbar möglich war. Unter standardisierten Versuchsbedingungen war die VRP des untersuchten Mausstammes *in-vivo* in der Kontrolle  $27,4 \pm 1,54$  ms lang.

Unter autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der VRP ( $30,67 \pm 2,76$  ms,  $p = 0,413$ ).

### 4.1.4 Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien *in-vivo*

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus wurde eine programmierte Ventrikelstimulation auf Basis des oben beschriebenen Stimulationsprotokolls zur Arrhythmieinduktion durchgeführt (Clasen et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass eine Induktion ventrikulärer Arrhythmien *in-vivo* in dem untersuchten Modell möglich ist (siehe Tabelle 7).

#### Tabelle 7: Anzahl induzierter ventrikuläre Arrhythmien *in-vivo*

Die ventrikulären Arrhythmien wurden durch programmierte Ventrikelstimulation in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus in Narkose mit Isofluran induziert ( $n = 5$ ) (Körperkerntemperatur:  $34,5$  bis  $38,0$  °C). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

<b>VES</b>	$1 \pm 0,4$
<b>Couplet</b>	$0,4 \pm 0,22$
<b>Triplet</b>	$0 \pm 0$
<b>VT &lt; 1 s</b>	$1 \pm 0,57$
<b>VT <math>\geq</math> 1 s</b>	$0 \pm 0$

VES: Ventrikuläre Extrasystole, Couplet: Zwei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, Triplet: Drei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, VT: Ventrikuläre Tachykardie (mindestens vier oder mehr aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe)

## Ergebnisse

---

Unter autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium konnten *in-vivo* im Vergleich zur Kontrolle statistisch nicht signifikant mehr ventrikuläre Arrhythmien durch programmierte Ventrikelstimulation induziert werden ( $2,83 \pm 1,72$  n vs.  $2,4 \pm 0,72$  n,  $p = 0,849$ ).

### 4.2 Elektrophysiologische Untersuchung des isolierten Herzens

Im Rahmen der Untersuchungen des isolierten Herzens konnte eine Methodik zur EPU *ex-vivo* sowie zur Untersuchung des ICANS erfolgreich etabliert und angewendet werden. Auf Grundlage dessen wurde eine Basischarakterisierung der ventrikulären Elektrophysiologie *ex-vivo* durchgeführt und erfolgreich die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien mithilfe programmierter Ventrikelstimulation untersucht. Insgesamt wurden 41 Untersuchungen eingeschlossen (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Anzahl der eingeschlossenen Versuche der elektrophysiologischen Untersuchung des isolierten Herzens**

		VRP	Programmierte Ventrikelstimulation
<b>Kontrolle</b>	10	10	4
<b>PAD</b>	11	11	5
<b>Autonome Ganglienblockade</b>	5	5	-
<b>Muskarinerge Blockade</b>	5	5	5
<b>PAD + autonome Ganglienblockade</b>	5	5	-
<b>PAD + muskarinerge Blockade</b>	5	5	5

VRP: Ventrikuläre Refraktärperiode, PAD: Partielle atriale Denervation

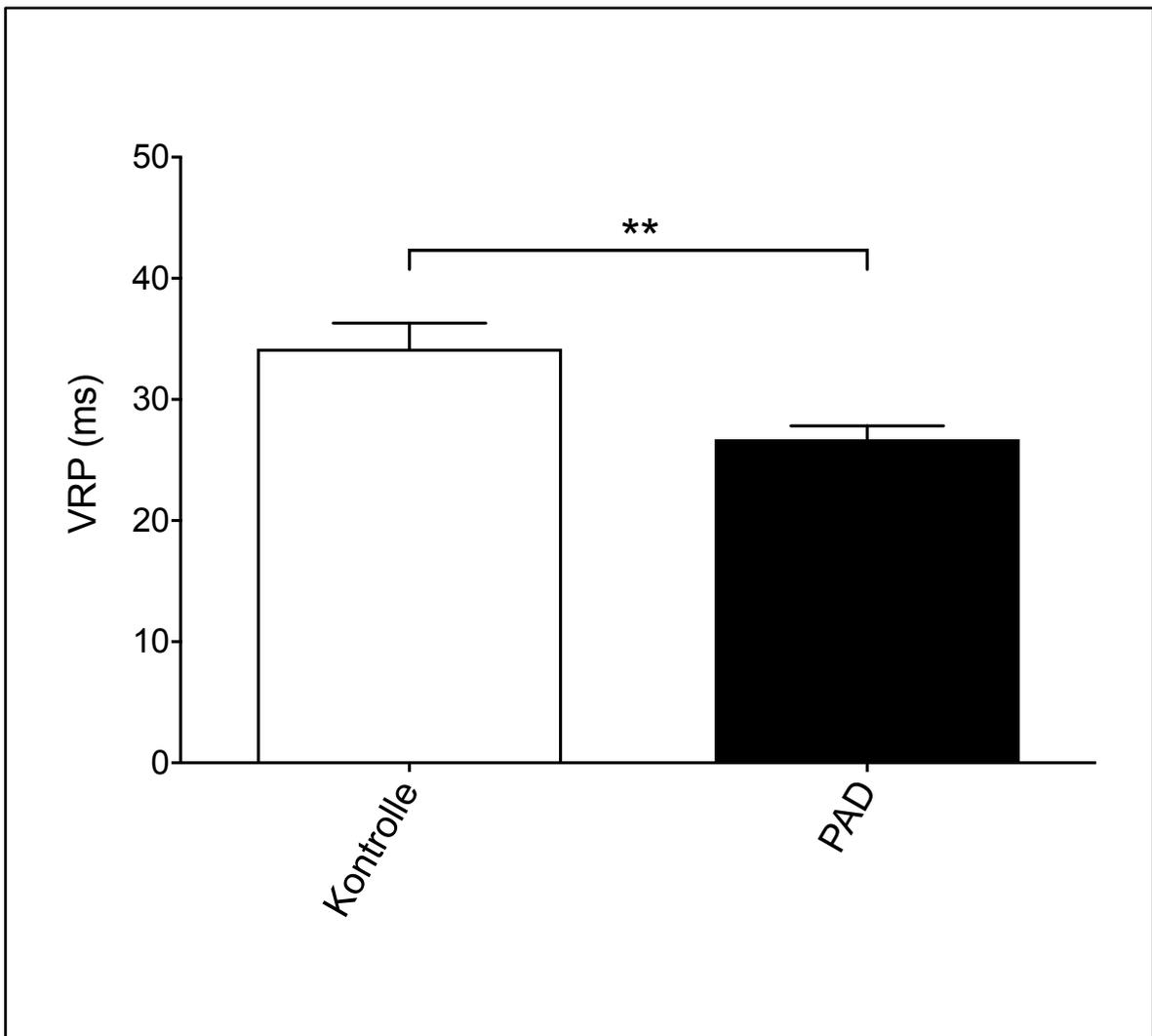
### 4.2.1 Einfluss einer kardialen Denervation auf die ventrikuläre Repolarisation des isolierten Herzens

Zur Basischarakterisierung der ventrikulären Elektrophysiologie des isolierten Herzens konnten die oben beschriebenen Protokolle der invasiven EPU reproduzierbar auf das Modell des isolierten Organs übertragen und die VRP erhoben werden. Die VRP der Herzen der Kontrolle war  $34,2 \pm 1,99$  ms lang.

Im Weiteren konnte das Modell der PAD zur kardialen Denervation des isolierten Herzens erfolgreich zur Untersuchung des ICANS angewendet werden.

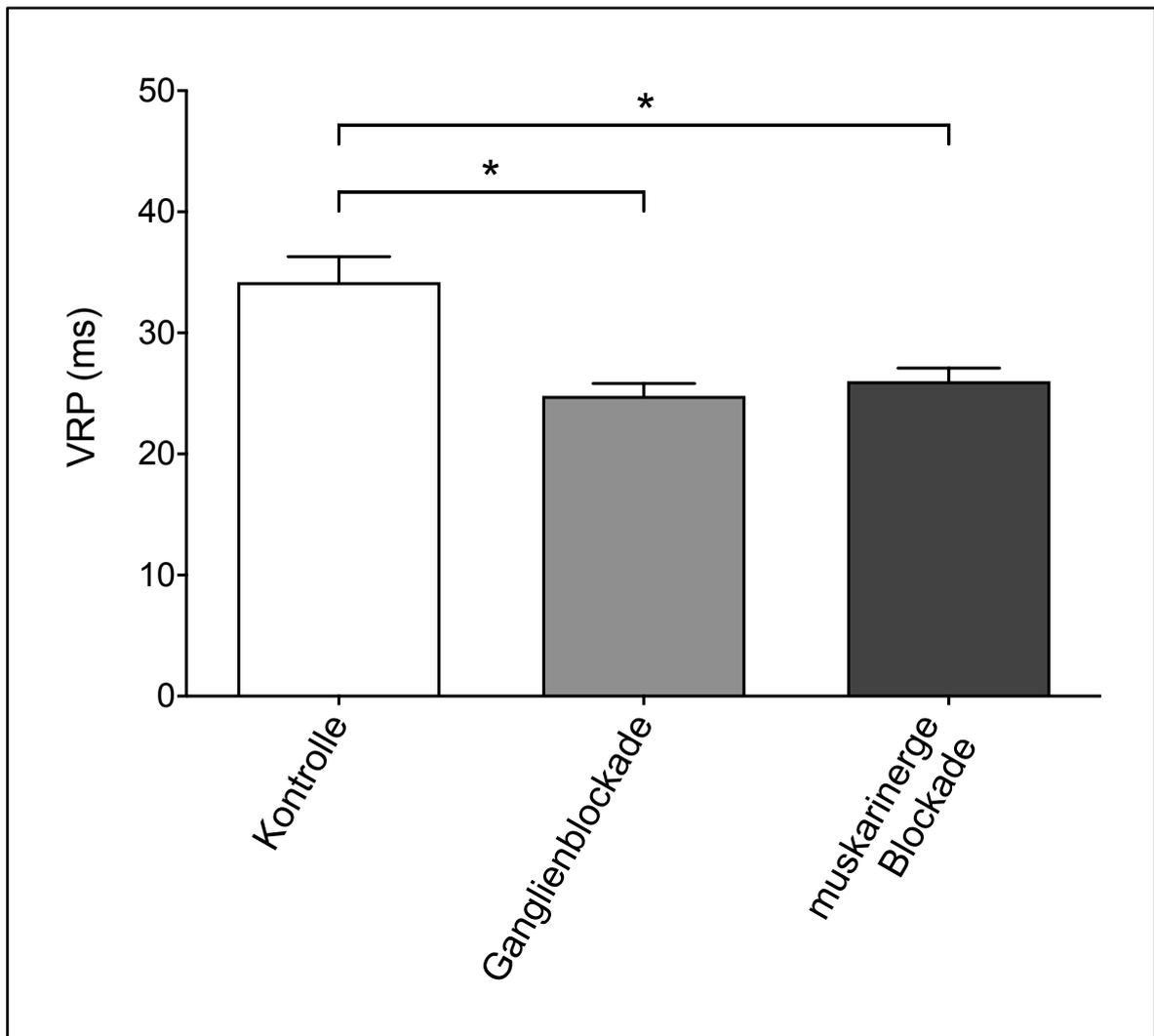
Nach PAD zeigte sich *ex-vivo* eine signifikant kürzere VRP im Vergleich zur Kontrolle ( $26,73 \pm 1,09$  ms vs.  $34,2 \pm 1,99$  ms,  $p = 0,004$ ) (siehe Abbildung 18). Es zeigte sich weiter, dass nach autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium ( $24,8 \pm 0,91$  ms,  $p = 0,019$ ) sowie nach muskarinerge Blockade mit Atropin ( $26 \pm 0,98$  ms,  $p = 0,032$ ) die VRP im isolierten Organ im Vergleich zur Kontrolle signifikant verkürzt war (siehe Abbildung 19).

Nach PAD ( $26,73 \pm 1,09$  ms) zeigte sowohl eine autonome Ganglienblockade ( $23,6 \pm 1,82$  ms,  $p = 0,285$ ) als auch eine muskarinerge Blockade ( $24,8 \pm 0,72$  ms,  $p = 0,274$ ) keinen signifikanten Einfluss auf die VRP (siehe Abbildung 20).



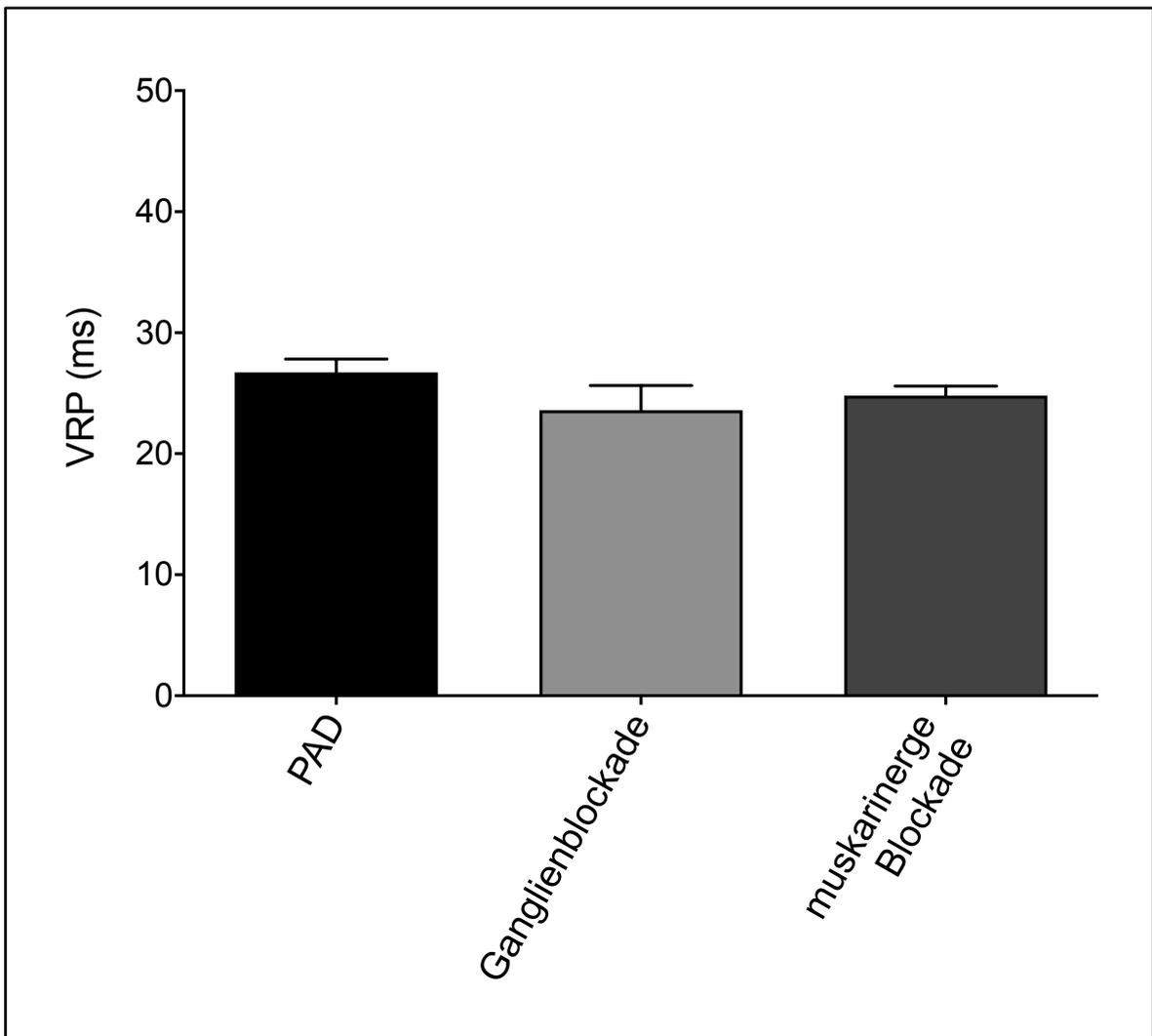
**Abbildung 18: Einfluss einer partieller atrialer Denervation auf die ventrikuläre Refraktärperiode im isolierten Herzen**

Nach partieller atrialer Denervation (PAD) ( $26,73 \pm 1,09$  ms,  $n = 11$ ) zeigte sich die ventrikuläre Refraktärperiode (VRP) signifikant verkürzt im Vergleich zur Kontrolle ( $34,2 \pm 1,99$  ms,  $n = 10$ ,  $p = 0,004$ ,  $t$ -Test (ungepaart, zweiseitig)). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler;  $**p < 0,01$ .



**Abbildung 19: Einfluss einer autonomen Ganglienblockade sowie einer muskarinergen Blockade auf die ventrikuläre Refraktärperiode im isolierten Herzen**

Nach autonomer Ganglienblockade (Hexamethonium 15 mg/kg) ( $24,8 \pm 0,91$  ms,  $n = 5$ ,  $p = 0,019$ ) und nach muskarinerner Blockade (Atropin 100 nM) ( $26 \pm 0,98$  ms,  $n = 5$ ,  $p = 0,032$ ) war die ventrikuläre Refraktärperiode (VRP) im isolierten Organ signifikant verkürzt im Vergleich zur Kontrolle ( $34,2 \pm 1,99$  ms,  $n = 10$ , Mann-Whitney-U-Test (ungepaart, zweiseitig)). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; \*  $p < 0,05$ .



**Abbildung 20: Einfluss einer autonomen Ganglienblockade sowie einer muskarinergen Blockade auf die ventrikuläre Refraktärperiode nach partieller atrialer Denervation im isolierten Herzen**

Nach partieller atrialer Denervation (PAD) ( $26,73 \pm 1,09$  ms,  $n = 11$ ) zeigte eine autonome Ganglienblockade (Hexamethonium 15 mg/kg) ( $23,6 \pm 1,82$  ms,  $n = 5$ ,  $p = 0,285$  (Mann-Whitney-U-Test (ungepaart, zweiseitig))) sowie eine muskarinerge Blockade (Atropin 100 nM) ( $24,8 \pm 0,72$  ms,  $n = 5$ ,  $p = 0,274$  (Mann-Whitney-U-Test (ungepaart, zweiseitig))) keinen Einfluss auf die ventrikuläre Refraktärperiode (VRP) im isolierten Organ. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

### 4.2.2 Einfluss einer kardialen Denervation auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien im isolierten Herzen

Um den Einfluss des ICANS auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien zu untersuchen, konnte erfolgreich das Protokoll zur Arrhythmieinduktion mittels programmierter Ventrikelstimulation auf das isolierte Organ übertragen werden. Auch im isolierten Herzen der C57Bl/6-Wildtyp-Maus war eine Induktion ventrikulärer Arrhythmien möglich (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Anzahl induzierter ventrikuläre Arrhythmien im isolierten Herzen**

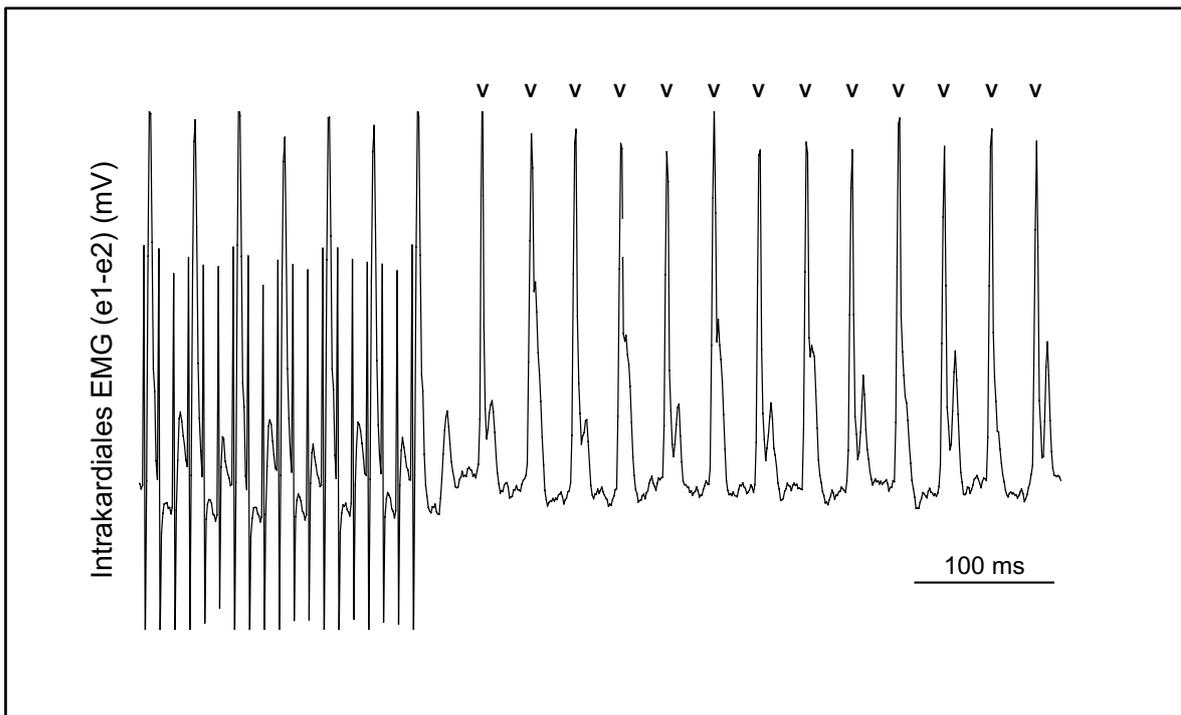
Die ventrikulären Arrhythmien wurden durch programmierte Ventrikelstimulation im isolierten Herzen der C57Bl/6-Wildtyp-Maus induziert (n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

<b>VES</b>	44 $\pm$ 5,58
<b>Couplet</b>	1,5 $\pm$ 0,56
<b>Triplet</b>	0,25 $\pm$ 0,22
<b>VT &lt; 1 s</b>	0 $\pm$ 0
<b>VT <math>\geq</math> 1 s</b>	0 $\pm$ 0

VES: Ventrikuläre Extrasystole, Couplet: zwei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, Triplet: drei aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe, VT: Ventrikuläre Tachykardie (mindestens vier oder mehr aufeinanderfolgende ventrikuläre Komplexe)

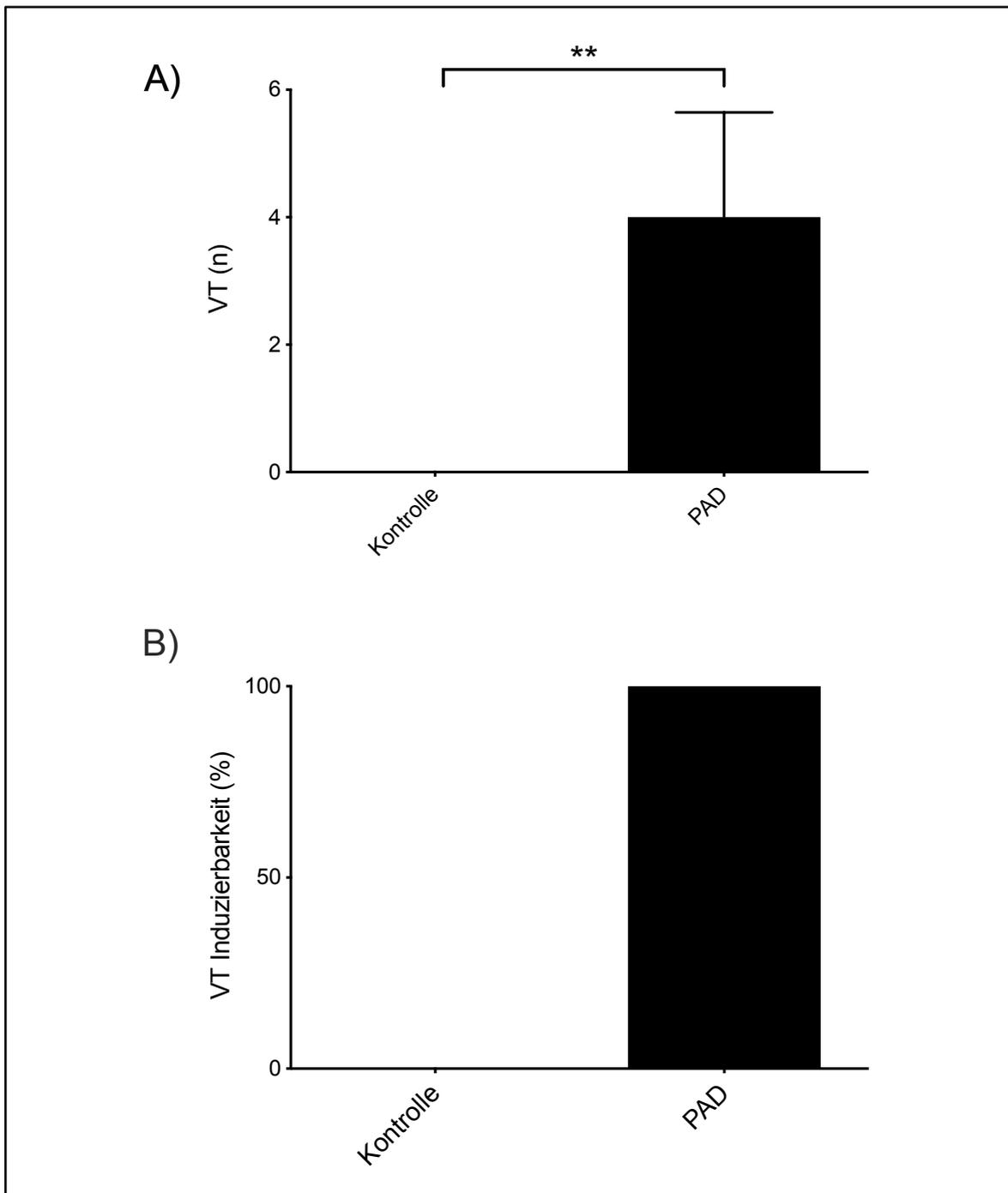
Nach PAD war die Anzahl induzierter ventrikulärer Arrhythmien im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant erhöht (55,6  $\pm$  10,5 n vs. 46  $\pm$  5,85 n,  $p = 0,556$ ).

In der Subgruppenanalyse zeigte sich, dass nach PAD im Gegensatz zur Kontrolle reproduzierbar VTs induzierbar waren (siehe Abbildung 21). Die Anzahl induzierter VTs nach PAD war signifikant höher als in der Kontrolle (4,0  $\pm$  1,64 n vs. 0  $\pm$  0 n,  $p = 0,008$ ) (siehe Abbildung 22A). Unter Verwendung desselben Stimulationsprotokolls konnten in 100 % der untersuchten Herzen nach PAD VTs induziert werden, dagegen waren in der Kontrolle in 0 % der Untersuchungen VTs zu induzieren (siehe Abbildung 22B).



**Abbildung 21: Induzierte ventrikulären Tachykardie im isolierten Herzen**

Exemplarische Darstellung einer ventrikulären Tachykardie (VT, Zykluslänge circa 28 ms) induziert durch programmierte ventrikuläre Burststimulation (Zykluslänge 10 ms, Dauer 5 s) im isolierten Herzen der C57Bl/6-Wildtyp-Maus, V: Ventrikuläres Signal während VT.



**Abbildung 22: Einfluss einer partiellen atrialen Denervation auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien isolierten Herzen**

**A)** Nach partieller atrialer Denervation (PAD,  $4,0 \pm 1,64$  n, n = 5) war die Anzahl induzierter ventrikulärer Tachykardien (VTs) nach programmierter Ventrikelstimulation im isolierten Herzen der C57Bl/6-Wildtyp-Maus signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle ( $0 \pm 0$  n, n = 4,  $p = 0,008$ , Mann-Whitney-U-Test (ungepaart, zweiseitig)). **B)** Nach PAD (n = 5) konnten in 100 % der Untersuchungen VTs durch programmierte Ventrikelstimulation im isolierten Herzen der C57Bl/6-Wildtyp-Maus induziert werden im Vergleich zu 0 % der Untersuchungen der Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler;  $**p < 0,01$ .

Eine muskarinerge Blockade mit Atropin zeigte keine signifikante Änderung der Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien im Vergleich zur Kontrolle ( $56,4 \pm 9,02$  n vs.  $46 \pm 5,85$  n,  $p = 0,73$ ). In der Subgruppenanalyse zeigte sich, dass nach muskarinenger Blockade signifikant mehr VTs induziert werden konnten als in der Kontrolle ( $1,2 \pm 0,49$  n vs.  $0 \pm 0$  n,  $p = 0,033$ ). Weiterhin waren nach muskarinenger Blockade in 75 % der Untersuchungen VTs zu induzieren, dagegen konnten in 0 % der Herzen der Kontrolle VTs induziert werden.

Nach PAD zeigte eine muskarinerge Blockade keinen signifikanten Einfluss auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien ( $54,8 \pm 18,8$  n vs.  $55,6 \pm 10,5$  n,  $p = 0,794$ ). In der Subgruppenanalyse zeigte sich weiter kein signifikanter Unterschied der Induzierbarkeit von VTs nach PAD mit additiver muskarinenger Blockade im Vergleich zur alleinigen PAD ( $2,8 \pm 1,64$  n vs.  $4,0 \pm 1,64$  n,  $p = 0,3$ ).

Die Induzierbarkeit von VTs durch programmierte Ventrikelstimulation nach PAD ( $4,0 \pm 1,64$  n), unter alleiniger muskarinenger Blockade mit Atropin ( $1,2 \pm 0,49$  n) und nach PAD mit additiver muskarinenger Blockade ( $2,8 \pm 1,64$  n) war im Vergleich dieser Gruppen ohne signifikanten Unterschied ( $p = 0,365$ ).

### 4.3 Quantifizierung induzierter ventrikulärer Arrhythmien

Zur Etablierung eines Scoring-Modells zur Quantifizierung induzierter ventrikulärer Arrhythmien wurde zum einen das Scoring-System nach Faggioni et al. als auch ein kumulatives Scoring-System verwendet und diese gegenübergestellt (Faggioni et al., 2013). Im Folgenden sind die Ergebnisse der Arrhythmiequantifizierung *in-vivo* und *ex-vivo* getrennt voneinander dargestellt.

#### 4.3.1 Arrhythmiequantifizierung *in-vivo*

Im direkten Vergleich der beiden Scoring-Systeme zeigte sich, dass das Scoring-Modell nach Faggioni et al. und das kumulative Scoring angewendet auf die induzierten Arrhythmien *in-vivo* nicht in positiver Korrelation zueinander standen, weder im Vergleich der Daten der Kontrolle ( $p = 0,068$ ,  $r = 0,85$ ) noch der Daten unter autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium ( $p = 0,057$ ,  $r = 0,798$ ) (Faggioni et al., 2013).

Ferner zeigten sich in der vergleichenden Auswertung der induzierten Arrhythmien in der Kontrolle und unter autonomer Ganglienblockade unter Verwendung des Scoring Modells nach Faggioni et al. ( $1,6 \pm 0,68$  vs.  $0,67 \pm 0,42$ ,  $p = 0,275$ ) sowie

des kumulativen Scoring ( $5,8 \pm 2,65$  vs.  $3,5 \pm 2,37$ ,  $p = 0,424$ ) jeweils kein signifikanter Unterschied (Faggioni et al., 2013).

### 4.3.2 Arrhythmiequantifizierung *ex-vivo*

Der Vergleich der beiden Scoring-Systeme, angewendet auf die Daten erhoben in den *ex-vivo* Untersuchungen, zeigte, dass das Scoring-System nach Faggioni et al. und das kumulative Scoring-System auch *ex-vivo* nicht positiv miteinander korrelierten ( $p = 0,693$ ,  $r = 0,307$ ) (Faggioni et al., 2013).

Die Arrhythmiequantifizierung nach Faggioni et al. zeigte nach PAD ( $3,0 \pm 0,0$ ,  $p = 0,008$ ), unter muskarinenger Blockade ( $2,8 \pm 0,2$ ,  $p = 0,04$ ) als auch nach PAD mit additiver muskarinenger Blockade ( $2,8 \pm 0,2$ ,  $p = 0,04$ ) einen signifikant höheren Score im Vergleich zur Kontrolle ( $1,75 \pm 0,25$ ) (Faggioni et al., 2013).

Die Quantifizierung durch das kumulative Scoring-System zeigte in den Untersuchungen des isolierten Herzens keinen signifikanten Unterschied der Gruppen untereinander ( $p = 0,807$ ). Auch im direkten Vergleich mit der Kontrolle ( $47,75 \pm 7,33$ ) zeigte sich nach PAD ( $64,0 \pm 15,96$ ,  $p = 0,614$ ), unter muskarinenger Blockade ( $66,8 \pm 12,64$ ,  $p = 0,413$ ) als auch nach PAD mit additiver muskarinenger Blockade ( $68,8 \pm 21,34$ ,  $p = 0,556$ ) kein signifikant höherer Score.

### 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung des ICANS sowohl für die ventrikuläre Elektrophysiologie als auch für die ventrikuläre Arrhythmieinduzierbarkeit im Mausmodell untersucht.

Hierzu konnte erfolgreich ein kombiniertes *in-vivo* und *ex-vivo* Modell zur nicht-invasiven wie invasiven EPU einschließlich Untersuchung der Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien mithilfe programmierter Ventrikelstimulation in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus etabliert werden.

Im Rahmen der *in-vivo* Untersuchungen konnte die Bedeutung der autonomen kardialen Innervation für die ventrikuläre Elektrophysiologie unter bestehender Innervation durch zentrale Efferenzen, periphere Afferenzen sowie weiterer neurohumoraler Einflüsse dargestellt werden (Berul et al., 1996). Dieser Versuchsaufbau bot die Möglichkeit einer Diagnostik im lebenden Organismus. Damit konnte der Einfluss des ANS in seiner funktionellen Gesamtheit untersucht werden.

Im Rahmen der *ex-vivo* Studien am isolierten Herzen wurde das Herz im Zustand der zentralen sowie peripheren Denervation untersucht. So wurde durch Explantation des Herzens die Innervation mit Ursprung außerhalb der Organebene eliminiert (Bell et al., 2011). Diese Methodik eröffnete die Möglichkeit das ICANS und dessen Einfluss auf die ventrikuläre Elektrophysiologie unmittelbar auf Organebene zu untersuchen (Jungen et al., 2017).

In diesen Untersuchungen konnte (1) gezeigt werden, dass eine experimentelle Untersuchung des ICANS und dessen Bedeutung für die kardiale Elektrophysiologie möglich ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass (2) das ICANS unabhängig von übergeordneten autonomen Zentren die ventrikuläre Funktion beeinflussen kann und, dass (3) das ICANS sowohl für die ventrikuläre Elektrophysiologie als auch für die ventrikuläre Arrhythmieinduzierbarkeit von Bedeutung ist.

### 5.1 Elektrophysiologische Untersuchung der Maus *in-vivo*

Im Rahmen der Untersuchungen der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo* wurde die Bedeutung der autonomen Innervation für die elektrophysiologischen Eigenschaften der Ventrikel im lebenden Organismus untersucht. Hierzu konnte auf Grundlage bestehender Methoden ein Modell etabliert werden, das eine standardisierte und reproduzierbare EPU des verwendeten Mausstammes mithilfe nicht-invasiver wie invasiver Diagnostik ermöglichte (Berul et al., 1996, Clasen et al., 2018).

Die durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass (1) die Körperkerntemperatur von grundlegender Bedeutung für kardiale Elektrophysiologie ist und einen bedeutenden, zu monitorierenden Parameter darstellt. Weiterhin wurde gezeigt, dass (2) eine autonome Ganglienblockade mit Hexamethonium *in-vivo* die atriale Erregung, (3) nicht aber die ventrikuläre Repolarisation und die ventrikuläre Arrhythmieinduzierbarkeit beeinflusst.

Die periprozedurale Anästhesie der Tiere erfolgte *per inhalationem* mit Isofluran. Isofluran wirkt u. a. auf das GABAerge System und vermittelt dort durch Bindung an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren seine hypnotische Wirkung (Eckle et al., 2009). Ferner wirkt Isofluran, wie die meisten Anästhetika, in Teilen kardiozirkulatorisch depressiv (Constantinides et al., 2011). Im Vergleich mit anderen Anästhetika fällt dieser Einfluss des Isoflurans geringer aus (Chaves et al., 2003, Janssen et al., 2004). Isofluran reduziert zum einen den Sympathikotonus, zum anderen beeinflusst das Anästhetikum die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und wirkt unmittelbar an der glatten Muskulatur der Gefäße relaxierend. In Folge dessen kommt es zu einem Abfall der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Drucks (MAD) sowie zur peripheren Vasodilatation mit konsekutivem Abfall der Körperkerntemperatur (Sessler und Todd, 2000, Constantinides et al., 2011).

Die Applikation des Anästhetikums erfolgte kontinuierlich in Form eines 2,0 bis 2,5 %igen Gasgemisches mit einem O<sub>2</sub>-Anteil von ca. 47 % und einem Stickstoffanteil von ca. 52 %. In der Literatur wird hervorgehoben, dass der Stickstoffanteil des Inhalationsgases von grundlegender Bedeutung für die hämodynamische Stabilität ist, da der Stickstoffanteil der kardiodepressiven Wirkung des Anästhetikums über Aufrechterhaltung des Sympathikotonus entgegenwirkt (Constantinides et al., 2011). Constantinides et al. empfehlen einen Stickstoffanteil von mindestens 50 %, einen O<sub>2</sub>-Anteil von 25 bis 50 % und einen

Isoflurananteil von 1,5 %, um die kardiodepressiven Effekte der Inhalationsanästhesie möglichst gering zu halten (Constantinides et al., 2011). Von diesen Empfehlungen weicht die in der vorliegenden Arbeit verwendete Anästhesie dahingehend ab, dass die Dosierung des Isoflurans (nach Wirkung titriert) höher gewählt wurde, um eine adäquate Narkosetiefe zu erzielen. Ein Grund für die nach Wirkung titriert höher gewählten Isoflurankonzentrationen könnte die Konstruktion der Narkosemaske gewesen sein. Die Narkosemaske verfügte über einen zusätzlichen Abluftschlauch mit aktiver Absaugung, wodurch die effektiven Isoflurankonzentrationen geringer ausgefallen sein könnten. Die Narkose wurde in den durchgeführten Untersuchungen konstant angewendet, sodass der Einfluss der Anästhesie auf die im Folgenden diskutierten Ergebnisse sicher vorhanden ist, die Ergebnisse untereinander aber vergleichbar sind.

### **5.1.1 Einfluss der Körperkerntemperatur auf die kardiale Elektrophysiologie**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methodik zur standardisierten EPU der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo* auf Grundlage bestehender Methoden erarbeitet (Berul et al., 1996, Clasen et al., 2018). Insbesondere das kontinuierliche Monitoring der Körperkerntemperatur der Maus konnte in das Versuchsprotokoll integriert werden. Hierzu wurde der Einfluss der Körperkerntemperatur auf die kardiale Elektrophysiologie der untersuchten Mauslinie erhoben.

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Körperkerntemperatur und die Herzfrequenz in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus positiv miteinander korrelieren und die Körperkerntemperatur von grundlegender Bedeutung für die kardiale Elektrophysiologie ist.

Dieser Zusammenhang ist bereits in der Literatur beschrieben (Appleton et al., 2004). Die Körperkerntemperatur ist eine entscheidende Stellgröße sowohl kardialen Funktion als auch der kardialen Elektrophysiologie. Bei Abfall der Körperkerntemperatur (Hypothermie) fällt in der Maus nicht nur die Herzfrequenz ab, sondern es zeigen sich vielmehr in der nicht-invasiven wie auch in der invasiven EPU signifikante Änderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten (Appleton et al., 2004). U. a. verlängern sich die ventrikuläre Repolarisation und die atriale Erregungsausbreitung des murinen Herzens. Dies konnten Appleton et al. anhand signifikanter Verlängerung der VRP

## Diskussion

---

sowie der P-Wellen-Dauer unter Hypothermie aufzeigen (Appleton et al., 2004). Dieser Einfluss ist auf eine Änderung der APD der einzelnen Kardiomyozyten unter Abfall der Körperkerntemperatur zurückzuführen (Bjørnstad et al., 1991). Dem zugrunde liegt eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und -Freisetzung des sarkoplasmatischen Retikulums unter Hypothermie (Groban et al., 2002).

Diese Mechanismen führen des Weiteren zu einer vermehrten Neigung zu ventrikulären Arrhythmien. Die gestörte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase mit einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration resultiert, ebenso wie die reduzierte Depolarisationsfrequenz der Kardiomyozyten, in einem vermehrten Auftreten von Nachdepolarisationen und damit spontanem Kammerflimmern während Hypothermie (Groban et al., 2002, Gurabi et al., 2014).

Neben der unmittelbaren Bedeutung einer Hypothermie für die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kardiomyozyten in Mensch und Maus und der damit einhergehenden vermehrten ventrikulären Arrhythmogenese, resultiert eine Hypothermie in einer autonomen Dysbalance mit kompensatorischer Steigerung des Sympathikotonus (Xu et al., 2000).

Der Einfluss einer Hyperthermie scheint in der Maus einen geringeren Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens zu haben (Appleton et al., 2004).

Um für die nicht-invasive EPU einen adäquaten Temperaturbereich für den untersuchten Mausstamm zu erheben, wurde der Einfluss eines sukzessiven Anstieges der Körperkerntemperatur unter Hypo-, Normo- sowie Hyperthermie auf die Herzfrequenz untersucht. Unter steigender Körperkerntemperatur (32 bis 41 °C) zeigte sich kein proportionaler Anstieg der Herzfrequenz, vielmehr stieg die Herzfrequenz zwischen 32,0 und 34,5 °C konstant an, flachte dann zwischen 34,5 und 38,0 °C in ein Plateau ab, um ab 38,0 °C erneut anzusteigen. Die physiologische Körperkerntemperatur der C57/Bl6-Wildtyp-Maus wird in der Literatur als altersabhängig beschrieben (Habicht, 1981, Talan, 1984). Talan et al. beschreiben die durchschnittliche Körperkerntemperatur der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere (14 bis 28 Wochen) mit 36,8 bis 38,5 °C (Talan, 1984).

Diese Daten zeigen, dass standardisierte Versuchsbedingungen respektive ein kontinuierliches Monitoring der Körperkerntemperatur essentiell sind, um reproduzierbare elektrophysiologische Daten erheben zu können. V. a. die Möglichkeit, die Körperkerntemperatur über die gesamte Versuchsdauer nicht nur

zu monitoren, sondern vielmehr zum Beispiel mithilfe eines beheizbaren Untersuchungsfeldes aufrechterhalten zu können, ist von grundlegender Bedeutung (Clasen et al., 2018). Dies ist von besonderem Interesse im Rahmen von EPU des murinen Herzens, da eine Hypothermie nicht nur die elektrophysiologischen Eigenschaften ganz unmittelbar beeinflusst, sondern darüber hinaus auch das ANS und die Arrhythmogenese beeinflusst. Vor diesem Hintergrund wurden die im Folgenden diskutierten Daten der *in-vivo* Untersuchungen im Temperaturintervall von 34,5 bis 38 °C erhoben.

### **5.1.2 Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die kardiale Elektrophysiologie *in-vivo***

Durch die zuvor beschriebene Standardisierung der Untersuchungsbedingungen konnte *in-vivo* erfolgreich eine elektrophysiologische Basischarakterisierung der C57Bl/6-Wildtyp-Maus durchgeführt und der Einfluss der autonomen Innervation auf die kardiale Elektrophysiologie untersucht werden. Hierzu wurde zunächst eine nicht-invasive EPU mit Ableitung des Oberflächen-EKG unter Ruhebedingungen durchgeführt. Um ferner den Einfluss der autonomen Innervation *in-vivo* auf die kardiale Elektrophysiologie darzustellen, wurden die Basischarakteristika auch unter pharmakologischer autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium erhoben. Nach systemischer Blockade der autonomen Ganglien zeigte sich eine relevante Verkürzung des RR-Intervalls unter Sinusrhythmus sowie der P-Wellen-Dauer. Diese Veränderungen sind auf eine erhöhte Frequenz der Depolarisation der Schrittmacherzellen des Sinusknotens sowie eine schnellere Erregungsausbreitung zwischen den atrialen Kardiomyozyten zurückzuführen (Platonov, 2008, Magnani et al., 2009).

Die quartäre Amoniumverbindung Hexamethonium als pharmakologischer Blocker autonomer Ganglien wirkt antagonistisch an den nikotinergen Acetylcholinrezeptoren und inhibiert sowohl sympathische als auch parasympathische postganglionäre Efferenzen (Starke, 2017). Es ist bekannt, dass Hexamethonium nicht im gleichen Maße den Sympathikotonus und den Parasympathikotonus reduziert. Für die Ratte ist beschrieben, dass der sympatholytische kardiale Einfluss stärker ausgeprägt ist als der parasympatholytische Einfluss (Janssen et al., 2000). So fällt nach Hexamethoniumapplikation der MAD als Surrogatparameter für die sympathische

Aktivität signifikant ab (Li et al., 2015). In der Literatur ist ein dominierender Parasympathikotonus in der Maus unter thermoneutralen Bedingungen beschrieben (Swoap et al., 2008). Vor dem Hintergrund des strikten Temperaturmanagements ist davon auszugehen, dass auch in den untersuchten Tieren der parasympathische Tonus den Sympathikotonus überstieg. Zumal eine Narkose mit Isofluran in Teilen den Sympathikotonus supprimiert (Sessler und Todd, 2000, Constantinides et al., 2011).

Die Depolarisation der Schrittmacherzellen des Sinusknoten und die Fortleitung der Erregung durch das atriale Myokard sind von der Offenwahrscheinlichkeit der *Hyperpolarization-activated-cyclic-nucleotide-gated*(HCN)-Kanäle sowie der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle abhängig, deren Aktivität v. a. durch das ANS moduliert wird (Verkerk et al., 2007, Lakatta und Di Francesco, 2009). Eine beta-adrenerge Stimulation resultiert auf molekularer Ebene in einem cAMP-Anstieg mit konsekutiver Phosphorylierung des L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und damit die Depolarisation der Zellen erhöht wird (Lakatta und Di Francesco, 2009). Der Anstieg der Herzfrequenz sowie die Verkürzung der atrialen Erregungsüberleitung in den untersuchten Tieren wird demnach auf eine in Relation zur Suppression des adrenergen Tonus stärkeren relativen Suppression des cholinergen Tonus zurückzuführen sein. Ein Anstieg der Frequenz des murinen Herzens nach Ganglienblockade durch Hexamethonium wurde bereits vor über 20 Jahren in der Literatur beschrieben (Uechi et al., 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich folglich mit der Literatur.

### **5.1.3 Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die ventrikuläre Repolarisation *in-vivo***

Zur Darlegung der Bedeutung der autonomen kardialen Innervation für die elektrophysiologischen Eigenschaften des Ventrikelmyokards *in-vivo*, wurde neben einer nicht-invasiven Diagnostik auch eine invasive EPU durchgeführt.

Es konnte erfolgreich eine invasive Basischarakterisierung der ventrikulären Elektrophysiologie der C57Bl/6-Wildtyp-Maus durchgeführt werden, um in einem zweiten Schritt den Einfluss einer autonomen Ganglienblockade zu untersuchen. Eine autonome Ganglienblockade mit Hexamethonium zeigte *in-vivo* im untersuchten Modell keinen Einfluss auf die ventrikuläre Repolarisation, weder

nicht-invasiv in Form einer signifikanten Änderung der QTc-Zeit noch im Rahmen der invasiven EPU durch Änderung der VRP.

Wie oben beschrieben, ist davon auszugehen, dass unter autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium in dem vorliegenden Modell der Parasympathikotonus in Relation zum Sympathikotonus stärker supprimiert wurde, der autonome Einfluss jedoch nicht vollständig eliminiert wurde. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass Hexamethonium nicht gleichermaßen sympatholytisch wie parasympatholytisch wirkt, und zum anderen darauf, dass neurohumorale Hormone durch eine autonome Ganglienblockade nicht supprimiert werden (Janssen et al., 2000). Eine Interaktion zwischen autonomer Innervation und Repolarisation der ventrikulären Kardiomyozyten ist in der Literatur beschrieben. Bereits vor über 30 Jahren haben Prystowsky et al. eine signifikante Verkürzung der VRP unter muskarinergem Blockade durch Atropin im Menschen beschrieben (Prystowsky et al., 1981). Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die direkte Vagusnervstimulation die VRP relevant verlängert und dass Atropin sowie Hexamethonium diesen Effekt inhibieren können (Brack et al., 2011, He et al., 2013a). Auf Basis dieser Ausführungen ist davon auszugehen, dass der fehlende Abfall der VRP durch eine insuffiziente Inhibition cholinergischer Einflüsse bedingt ist.

### **5.1.4 Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien *in-vivo***

Zur weiteren elektrophysiologischen Charakterisierung der C57Bl/6-Wildtyp-Maus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Methodik der programmierten Ventrikelstimulation zur Arrhythmieinduktion angewendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine reproduzierbare Induktion ventrikulärer Arrhythmien in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus *in-vivo* möglich ist.

Das murine Herz ist mit einer Ventrikeloberfläche von  $< 100 \text{ mm}^2$  eines der kleinsten Säugetierherzen. Die Induzierbarkeit von ventrikulären Arrhythmien in Herzen kleiner Masse wurde in der Vergangenheit als nicht möglich betrachtet. Vor über 100 Jahren beschrieb Garrey die Hypothese der kritischen Masse (Garrey, 1914). Nach dieser Hypothese sei eine Fläche von mindestens  $400 \text{ mm}^2$  zur Entstehung von Kammerflimmern notwendig (Garrey, 1914). Eine reproduzierbare Induktion und Untersuchung von ventrikulären Arrhythmien im Mausmodell wären auf Basis dieser Hypothese nicht möglich. Mittlerweile konnte in diversen Untersuchungen

## Diskussion

---

gezeigt werden, dass die Entstehung von Reentry-Tachykardien in Geweben  $< 100 \text{ mm}^2$  möglich ist (Vaidya et al., 1999, Berul, 2003, Schrickel et al., 2007). Dies konnten auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen. Damit ist das Modell der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung ventrikulärer Arrhythmien dienlich und kann zur Untersuchung der ventrikulären Arrhythmogenese herangezogen werden.

Um den Einfluss autonomer Ganglien auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien und damit die Bedeutung dieser für die ventrikuläre Arrhythmogenese zu untersuchen, wurde das oben beschriebene Stimulationsprotokoll auch nach autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium durchgeführt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass eine autonome Ganglienblockade *in-vivo* die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus nicht beeinflusst.

Es ist bekannt, dass das ANS die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien beeinflusst (Ng, 2016, Herring et al., 2019). Sympathikus und Parasympathikus spielen im Wesentlichen entgegengesetzte Rollen in der Genese ventrikulärer Herzrhythmusstörungen (Shen und Zipes, 2014, Ng, 2016). Sympathische Efferenzen wirken proarrhythmisch auf das ventrikuläre Myokard (Tse, 2016). Vor über 20 Jahren konnte gezeigt werden, dass eine beta-adrenerge Inhibition durch Propranolol das Auftreten von Kammerflimmern nach Myokardinfarkt signifikant verringert (De Ferrari et al., 1993). Dem gegenüberstehend hat die parasympathische Innervation antiarrhythmische Effekte auf die Herzkammern (Ng, 2016). Der antiarrhythmische Einfluss einer vagalen Stimulation sowie einer pharmakologischen muskarinergen Stimulation wurde ebenfalls bereits vor über zwei Jahrzehnte nachgewiesen (Vanoli et al., 1991, De Ferrari et al., 1993). Diesen Effekten liegt v. a. eine Beeinflussung der APD und damit auch der Repolarisation der Kardiomyozyten zugrunde (Tse, 2016, Ng, 2016). Adrenerge und cholinerge Einflüsse resultieren durch Aktivierung verschiedenartiger intrazellulärer Signalkaskaden in gegensätzlichen Wirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Ventrikel. Eine beta-adrenerge Stimulation bedingt durch Beeinflussung der ventrikulären  $\text{Ca}^{2+}$ - sowie  $\text{K}^+$ -Homöostase eine Verkürzung der APD und damit der VRP (Kalla et al., 2016, Tse, 2016, Shen und Zipes, 2014). Eine cholinerge Innervation resultiert in gegensätzlichen Effekten (Kalla et al., 2016). Die Refraktärperiode spielt eine wesentliche Rolle in der Entstehung von

Reentry-Tachykardien, die sich durch eine abnormale Aktivierung von Kardiomyozyten mit pathologischer Erregungsfortleitung charakterisieren (Antzelevitch und Burashnikov, 2011). Die kreisende Erregung kann als Erregungskreisbahn verstanden werden (Allessie et al., 1977). Im Fall einer kreisenden Erregung um ein anatomisches Hindernis verläuft die Depolarisation in einer Kreisbahn von fester Länge, die durch die anatomischen Gegebenheiten definiert wird. Die Depolarisationswelle zeigt drei Zustände der Erregbarkeit: Die Spitze ist vollständig refraktär, wogegen der Schwanz vollständig repolarisiert und wieder erregbar ist. Spitze und Schwanz sind durch eine Zone verbunden, die relativ refraktär ist (Tse, 2016). Die Länge der Depolarisationswelle ergibt sich aus dem Produkt der Leitungsgeschwindigkeit und der Refraktärperiode (Allessie et al., 1977, Tse, 2016). Damit die führende Depolarisationsfront den repolarisierten Schwanz der Kreisbahn erneut depolarisieren kann, muss die Länge der Depolarisationswelle kleiner sein als die Kreisbahn der Erregung (Tse, 2016). Daraus ergibt sich, dass eine Verkürzung der VRP das Auftreten von ventrikulären Reentry-Tachykardie begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in dem untersuchten Modell eine pharmakologische autonome Ganglienblockade die VRP *in-vivo* nicht beeinflusst. Auf Grundlage dieser Ausführungen sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen mit der Literatur kongruent und die fehlende Beeinflussung der Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien durch eine autonome Ganglienblockade mit Hexamethonium zu erklären.

### **5.2 Elektrophysiologische Untersuchung des isolierten Herzens**

Im Rahmen der Untersuchungen des isolierten Herzens konnte *ex-vivo* unter Bedingungen der kardialen Denervation die funktionelle Bedeutung des ICANS der Maus für die ventrikuläre Elektrophysiologie unabhängig von zentralen Efferenzen und peripheren thorakalen Afferenzen untersucht werden (Bell et al., 2011). Hierzu konnte das Modell des retrograd perfundierten Herzens nach Oscar Langendorff erfolgreich zur invasiven EPU des isolierten Herzens verwendet werden (Langendorff, 1895). Ferner wurde erfolgreich ein Modell angewendet, das eine lokale mechanische wie pharmakologische Manipulation der epikardialen Ganglien des ICANS ermöglichte (Jungen et al., 2017). Hierzu wurde eine PAD mit einer chirurgischen Ablation des epikardialen Fettgewebes durchgeführt, da dort die

Mehrzahl der Ganglien des ICANS lokalisiert ist (Armour et al., 1997, Pauza et al., 2000). Mithilfe dieser Methodik wurde eine autonome Denervation des isolierten Herzens erreicht. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass eine mechanische PAD durch Resektion des epikardialen Fettgewebes *ex-vivo* eine Reduktion der kardialen Ganglien um ca. 61 % ermöglichte (Jungen et al., 2017). Somit konnte nicht nur unmittelbar der Einfluss der GPs auf die ventrikuläre Elektrophysiologie, sondern ebenfalls indirekt die Interaktion des ICANS mit übergeordneten autonomen Zentren untersucht werden.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass (1) das retrograd perfundierte Herz als Modell zur Untersuchung der ventrikulären Elektrophysiologie sowie der ventrikulären Arrhythmogenese geeignet ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass (2) das ICANS im isolierten Herzen der direkten experimentellen Untersuchung zugänglich ist und, (3) auch nach zentraler Denervation unabhängig von zentralen Efferenzen und peripheren thorakalen Afferenzen die ventrikuläre Elektrophysiologie sowie die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien beeinflusst.

### **5.2.1 Einfluss einer kardialen Denervation auf die ventrikuläre Repolarisation des isolierten Herzens**

Im Rahmen der Untersuchungen des isolierten Herzens wurde zunächst eine Basischarakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Ventrikel mit Erhebung der VRP durchgeführt. Unter Anwendung des oben beschriebenen Stimulationsprotokolls konnte auch *ex-vivo* eine ventrikuläre EPU durchgeführt werden.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Ablation der epikardialen GPs die ventrikuläre Elektrophysiologie *ex-vivo* beeinflusst. Wie bereits oben beschrieben, ist das ICANS integriert in Reflexwege mit kurzer Latenz und Teil der *Beat-to-Beat*-Modulation der regionalen Herzfunktion (Ardell et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte durch kardiale Denervation gezeigt werden, dass die intrinsischen kardialen GPs auch unabhängig von Innervation durch zentrale autonome Neurone sowie unabhängig von Afferenzen thorakaler Ganglien die elektrophysiologischen Eigenschaften und konsequent die Funktion der ventrikulären Kardiomyozyten beeinflussen. Eine unabhängige spontane Aktivität der kardialen GPs, moduliert durch lokale kardiale Afferenzen, konnte bereits vor über 20 Jahren von Ardell et al. demonstriert werden (Ardell et al., 1991). Aktuellere

Arbeiten legen sogar eine eigenständige Regulation der kardialen Funktion durch das ICANS nahe (Fukuda et al., 2015, Ardell et al., 2016).

Die hier diskutierten Ergebnisse implizieren eine unabhängige Modulation der elektrophysiologischen Charakteristika der Ventrikel durch die GPs des ICANS. Im Detail konnte die vorliegende Arbeit aufzeigen, dass eine Ablation der GPs durch eine mechanische Resektion die ventrikuläre Repolarisation in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus signifikant verkürzt. Dies lässt auf eine direkte Innervation der ventrikulären Kardiomyozyten durch die autonomen GPs schließen. Ein direkter Einfluss der GPs auf die ventrikulären Kardiomyozyten konnte bereits unter bestehender zentraler Innervation sowie im isolierten Herzen nachgewiesen werden (Wang et al., 2015, Allen et al., 2018). Eine Stimulation der GPs des ICANS im Hund *in-vivo* zeigt eine signifikante Verlängerung der APD sowie der VRP. Diese Effekte sind ähnlich der einer Vagusnervstimulation (He et al., 2013a, Wang et al., 2015). Es ist bekannt, dass ein erhöhter Vagotonus unmittelbaren Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Ventrikel hat (Coote, 2013). Unter Vagusnervstimulation zeigt sich, ebenso wie unter Stimulation der GPs, eine relevante Verlängerung der VRP sowie der APD (He et al., 2013b, Ng, 2014). Diese Einflüsse auf die ventrikuläre Erregung sind durch Atropin wie auch durch Hexamethonium reversibel bzw. können inhibiert werden (Brack et al., 2011).

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass auch unter den Bedingungen der zentralen Denervation bei erhaltener Innervation durch das ICANS eine muskarinerge Blockade sowie eine autonome Ganglienblockade die ventrikuläre Repolarisation beeinflussen. Es zeigte sich nach Applikation von Atropin sowie von Hexamethonium im isolierten Herzen, ähnlich den Effekten der PAD, eine signifikante Verkürzung der VRP. Demnach kann, neben der direkten Innervation der ventrikulären Kardiomyozyten durch die GPs, darauf geschlossen werden, dass die Ganglien des ICANS in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus vornehmlich cholinergen Phänotyps sind. Dies ist kongruent mit den Angaben in der Literatur (Rysevaite et al., 2011, Wake und Brack, 2016). Die Zusammenschau der Ergebnisse legt eine Bedeutung des ICANS für die Homöostase der ventrikulären elektrophysiologischen Charakteristika nahe.

### 5.2.2 Einfluss einer kardialen Denervation auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien im isolierten Herzen

Neben der Basischarakterisierung der ventrikulären Elektrophysiologie wurde das Protokoll zur programmierten Ventrikelstimulation erfolgreich auf das isolierte Organ zur Untersuchung der Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass auch *ex-vivo* eine reproduzierbare Induktion ventrikulärer Arrhythmien möglich ist und damit, dass das isolierte Herz der C57Bl/6-Wildtyp-Maus für elektrophysiologische Studien ventrikulärer Arrhythmien geeignet ist.

Durch das oben erläuterte Modell der PAD konnte neben dem Einfluss der GPs auf die ventrikuläre Repolarisation ebenfalls die Bedeutung des ICANS für die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien und damit indirekt dessen Bedeutung für die ventrikuläre Arrhythmogenese untersucht und dargestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich nach PAD wie auch nach muskarinerg Blockade mit Atropin sowie nach autonomer Ganglienblockade mit Hexamethonium VTs durch eine programmierte Ventrikelstimulation induziert werden konnten. In den durchgeführten Untersuchungen konnte, wie bereits erläutert, gezeigt werden, dass eine PAD, eine autonome Ganglienblockade und eine muskarinerge Blockade *ex-vivo* die VRP signifikant reduzierten. Vor dem Hintergrund der Interaktion der Refraktärperiode mit der Entstehung von Arrhythmien und den dargestellten Ergebnissen dieser Arbeit ist ein Einfluss einer kardialen Denervation auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien zu erklären. Ein Zusammenhang der GPs mit der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien im Rahmen von myokardialer Ischämie und Reperfusion ist bereits in der Literatur beschrieben. So konnten He et al. zeigen, dass sowohl die Ablation als auch die Stimulation der GPs im Hund *in-vivo* das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien nach Myokardinfarkt signifikant beeinflussen (He et al., 2013b, He et al., 2013c). Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass nach akzidentieller partieller Ganglienablation im Rahmen einer interventionellen Pulmonalvenenisolation zur Therapie von Vorhofflimmern bei einigen Patienten häufiger VES auftreten (Jungen et al., 2017).

In Zusammenschau der aktuellen Literatur sowie der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist davon auszugehen, dass die autonome Innervation durch das ICANS und der daraus resultierende Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der

ventrikulären Kardiomyozyten von Bedeutung für die ventrikuläre Arrhythmogenese ist. Ferner kann aus diesen Befunden geschlossen werden, dass die GPs ihren antiarrhythmischen Einfluss wahrscheinlich durch eine primär cholinerge Innervation ausüben.

### 5.3 Quantifizierung induzierter ventrikulärer Arrhythmien

Zur Quantifizierung und Darstellung der induzierten ventrikulären Arrhythmien über die alleinige Beschreibung der Anzahl hinaus, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Scoring-Systeme verwendet und miteinander verglichen.

Nach Curtis et al. beschreibt „ein Arrhythmie-Score... ein System, in dem eine Ranking-Skala auf Rohdaten angewendet wird“ (Curtis et al., 2013). Eine solche Ranking-Skala ermöglicht in Zusammenschau mit den Rohdaten die Objektivierung der ventrikulären Vulnerabilität (Curtis und Walker, 1988). Vor diesem Hintergrund wurden die verwendeten Scoring-Systeme sowohl auf die *in-vivo* als auch auf die *ex-vivo* induzierten Arrhythmien angewendet und den Rohdaten gegenübergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass das verwendete Scoring-System in Abhängigkeit von dem gewählten Untersuchungsmodell und der Häufigkeit von Arrhythmien zu wählen ist, um die Rohdaten abbilden zu können.

Beide verwendete Scoring-Systeme vereint, dass jeder Untersuchung bzw. jedem Tier jeweils ein Punktwert zugeordnet ist. Damit bieten beide Scoring-Systeme die Möglichkeit, Untersuchungen bzw. Kohorten direkt miteinander zu vergleichen. Dies ist zunächst unabhängig von dem dahinterstehenden Modell. Ein weiterer zentraler Punkt ist die Fähigkeit eines Scoring-Systems, Rohdaten abzubilden (Curtis und Walker, 1988). Folglich ist ein wesentliches Ziel eines Arrhythmie-Scoring-Systems, statistisch signifikante Änderungen bzw. Unterschiede innerhalb der Rohdaten darzustellen. Ferner sollte ein Scoring-Systeme zur Quantifizierung ventrikulärer Arrhythmien positiv mit dem Schweregrad der induzierten Arrhythmien korrelieren, um die Abbildung innerhalb einer Ranking-Skala zu ermöglichen (Curtis und Walker, 1988, Curtis et al., 2013).

Die verwendeten Scoring-Systeme basieren auf unterschiedlichen Ansätzen. Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Systemen liegt in der Anzahl eingeschlossenen Parameter. Faggioni et al. betrachteten nur einen Parameter: Das schwerste aufgetretene ventrikuläre Arrhythmieereignis und definierten darüber den entsprechenden Punktwert (Faggioni et al., 2013). Im kumulativen

Scoring-System wurden insgesamt fünf Parameter betrachtet und summiert: (1) VES, (2) Couplets, (3) Triplets, (4)  $VT < 1\text{ s}$  und (5)  $VT \geq 1\text{ s}$ . Entgegen Curtis et al. wurden, um eine differenziertere Betrachtung zu ermöglichen, die in den *Lambeth Conventions* als Salven zusammengefassten Rhythmusstörungen in Couplets und Triplets unterteilt (Curtis et al., 2013). Dieses kumulative Scoring-System ist durch die Summation jeder einzelnen induzierten ventrikulären Arrhythmie deutlich anfälliger für Bias, da die Rohdaten durch ein vermehrtes Auftreten einzelner Arrhythmieformen, unabhängig von ihrem Schweregrad, inadäquat dargestellt werden können. Daher ist ein Rückschluss auf den Schweregrad bzw. die Relevanz der Arrhythmiebelastung nur mit dem Hinweis auf die Anzahl der eingeschlossenen ventrikulären Arrhythmien möglich.

Das Scoring-System nach Faggioni et al. dagegen korreliert durch seine grundlegende Idee in jedem Fall positiv mit der schwersten induzierten Arrhythmie, vermag jedoch nicht, deren Anzahl und damit die Arrhythmiebelastung adäquat wiederzugeben (Faggioni et al., 2013). Daraus folgt, dass die Sensitivität einer Methodik zur Quantifizierung von Arrhythmien stark vom Arrhythmiemodell sowie der Anzahl und des Schweregrades der Arrhythmien abhängig ist und dem entsprechend zu wählen ist.

### 5.4 Klinischer Ausblick

Mit 15 % aller Tode in den Industrienationen stellt der plötzliche Herztod die Haupttodesursache in der westlichen Welt dar (Kuriachan et al., 2015). Der plötzliche Herztod ist definiert als „nicht-traumatischer, unerwarteter Tod, der bei einer scheinbar gesunden Person innerhalb einer Stunde nach Beginn der Symptome eintritt“ (Priori et al., 2015). In den meisten Fällen sind ventrikuläre Arrhythmien, insbesondere VTs und Kammerflimmern, mit einhergehender insuffizienter Ventrikelkontraktion sowie -relaxation mit konsekutivem Abfall des Schlagvolumens unmittelbar ursächlich für die akute letale Kreislaufkompromittierung (Sugimoto et al., 1966, Kuriachan et al., 2015). Die koronare Herzerkrankung mit transienter oder akuter Myokardischämie bildet mit etwa 80 % die führende Ursache des plötzlichen Herztodes (Kandala et al., 2017). Im Rahmen einer akuten wie auch einer chronischen Schädigung des Herzens, kommt es zu Umbauprozessen auf molekularer, zellulärer und interstitieller Ebene mit einhergehender Einschränkung der kardialen Funktion (Cohn et al., 2000). Auf

## Diskussion

---

Ebene der Kardiomyozyten zeigen sich u. a. eine Hypertrophie sowie eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Ferner kommt es durch eine vermehrte Fibroblastenproliferation zu einer progredienten Fibrosierung des Herzens (Zornoff et al., 2009). In Summe resultieren diese pathologischen Umbauprozesse in einer ventrikulären Dysfunktion mit einer relevanten Neigung zur Entstehung ventrikulärer Arrhythmien (Burchfield et al., 2013). Neben diesen ganz unmittelbaren Veränderungen auf Ebene der Kardiomyozyten ist auch eine Dysbalance der autonomen Innervation Teil des kardialen Remodelings (Huang et al., 2017). Eine akute myokardiale Ischämie resultiert unmittelbar in einem gesteigerten Sympathikotonus. Dem Untergang autonomer Nerven im Infarktgebiet folgt eine erhöhte Ausschüttung des *Nerve Growth Factor* (NGF) mit einer konsekutiven sympathischen Hyperinnervation durch ein vermehrtes Einwachsen sympathischer Nerven (Hasan et al., 2006). Ähnliche Prozesse sind im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz zu beobachten (Zhou et al., 2004, Kimura et al., 2012). Infolge steigt der adrenerge Tonus, der Parasympathikotonus dagegen ist supprimiert. Durch die gesteigerte sympathische Innervation wird die Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie die vermehrte Freisetzung von Noradrenalin angeregt (Kimura et al., 2007, Kimura et al., 2012). Des Weiteren resultiert der gesteigerte Sympathikotonus, ebenso wie die bereits ausgeführten Umbauprozesse, in einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase mit einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die eine ventrikuläre Arrhythmogenese begünstigt (Tse, 2016). Infolge dessen bildet eine Dysbalance der autonomen kardialen Innervation zugunsten eines gesteigerten adrenergen Tonus einen Teil des Substrates für eine erhöhte Auftretenswahrscheinlichkeit von ventrikulären Arrhythmien im Rahmen kardialer Erkrankungen (Kalla et al., 2016, Ng, 2016).

Vor diesem Hintergrund ist eine Modulation des neuronalen Remodelings ein Ansatzpunkt zur Beeinflussung des arrhythmischen Substrates und zur Reduktion des Auftretens von ventrikulären Arrhythmien. Hierzu sind in der Literatur verschiedenartige Ansätze neuromodulatorischer Interventionen beschrieben, die auf verschiedenen Ebenen ansetzen und v. a. eine Reduktion des adrenergen Tonus zum Ziel haben (Huang et al., 2017, Herring et al., 2019).

Die Modulation der Aktivität des GPs des ICANS zur Behandlung bzw. Beeinflussung der ventrikulären Arrhythmogenese findet im klinischen Alltag bisher nur wenig Beachtung (Herring et al., 2019).

## Diskussion

---

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass das ICANS in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus als ein unabhängiger Teil der autonomen kardialen Innervation die elektrophysiologischen Eigenschaften der ventrikulären Kardiomyozyten unmittelbar moduliert und sogar die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien unabhängig von übergeordneten autonomen Zentren positiv beeinflussen kann. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Ganglienstimulation die ventrikuläre APD verlängert und damit wird unmittelbar die ventrikuläre Erregbarkeit und konsekutiv die Entstehung von Arrhythmien beeinflusst (He et al., 2013b). Aktuell ist die funktionelle Anatomie und die Interaktion der GPs mit den ventrikulären Kardiomyozyten nicht vollständig verstanden. Eine funktionelle Zuordnung der GPs ist bereits in Teilen, v. a. für die Beeinflussung der elektrophysiologischen Charakteristika der Atrien sowie des Erregungsbildungs- und -leitungssystem, beschrieben. Zarzoso et al. konnten zeigen, dass die GPs um die PVs die Sinusknotenfunktion maßgeblich beeinflussen (Zarzoso et al., 2013). Ferner zeigten Eickholt et al., dass eine Hochfrequenzstimulation nahe des Sinusknotens durch Stimulation intrinsischer kardialer Neurone eine Sinustachykardie induzieren kann (Eickholt et al., 2013). In Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir eine funktionelle wie morphologische Interaktion der epikardialen GPs mit den Ventrikeln nachweisen (Jungen et al., 2017). Auch wurde bereits eine unmittelbare Beeinflussung der ventrikulären Funktion durch eine gezielte Ganglienstimulation beschrieben. Meyer et al. konnten zeigen, dass eine Stimulation der Neurone auf Höhe des *Sulcus coronarius* die Kontraktilität des linken Ventrikels steigert (Meyer et al., 2010). Das ICANS ist somit auch ganz unmittelbar an der Homöostase der Ventrikelfunktion beteiligt.

Eine lokale Beeinflussung der kardialen autonomen Innervation zur Therapie bzw. Prävention von ventrikulären Arrhythmien und des plötzlichen Herztodes durch eine Stimulation der Neurone des ICANS könnte demnach einen sinnvollen Ansatz zur gezielten Intervention darstellen. Hierzu muss ein genaueres Verständnis von der funktionellen Anatomie des ICANS und der Interaktion dieser mit den ventrikulären Kardiomyozyten erarbeitet werden.

### 6. Zusammenfassung

Das autonome Nervensystem beeinflusst alle Stellgrößen der kardialen Elektrophysiologie (Ardell et al., 2016). Das neuronale Remodeling im Zuge akuter und vor allem chronischer Herzerkrankungen führt zu einer Dysbalance dieses Systems zugunsten eines gesteigerten Sympathikotonus. Der erhöhte adrenerge Tonus prädisponiert für die Genese maligner ventrikulärer Arrhythmien und ist damit Teil des Substrates des plötzlichen Herztodes (Ng, 2016).

Auf Organebene bilden autonome Nerven- und Ganglienplexus (GP) das intrinsische kardiale autonome Nervensystem (ICANS) (Armour, 2004, Ardell et al., 2016). Das ICANS wurde lange Zeit als reine parasymphatische Relaisstation der vagalen Innervation verstanden. Mittlerweile ist bekannt, dass das ICANS der Integration zentraler Efferenzen sowie regionaler und peripherer Afferenzen in die regionale Regulation der Herzaktivität dient und ein wesentlicher Teil der autonomen Innervation darstellt (Fukuda et al., 2015, Ardell et al., 2016). Ferner ist bekannt, dass die Neurone des ICANS auch nach zentraler Denervation ihre Aktivität nicht verlieren (Ardell et al., 1991). Die funktionelle Bedeutung des ICANS für die ventrikuläre Elektrophysiologie, die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien und den plötzlichen Herztod ist bisher nicht abschließend verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung des ICANS für die ventrikuläre Elektrophysiologie und die ventrikuläre Arrhythmogenese in der C57Bl/6-Wildtyp-Maus zu untersuchen. Hierzu wurde ein kombiniertes *in-vivo* und *ex-vivo* Modell zur elektrophysiologischen Untersuchung etabliert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche erbrachten folgende Ergebnisse:

- (1) Eine experimentelle Untersuchung des ICANS und dessen Bedeutung für die kardiale Elektrophysiologie im isolierten Organ ist möglich,
- (2) das ICANS übt unabhängig von übergeordneten autonomen Zentren Einfluss auf die ventrikuläre Funktion aus und
- (3) das ICANS beeinflusst die ventrikuläre Elektrophysiologie sowie die ventrikuläre Arrhythmogenese.

Somit konnte die Relevanz des ICANS für die ventrikuläre Elektrophysiologie und die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien in der Maus dargestellt werden. Da die Architektur des ICANS des Menschen in Grundzügen mit der in kleineren Säugetieren zu vergleichen ist, könnte das ICANS in der Humanmedizin in der Therapie ventrikulärer Arrhythmien perspektivisch von Interesse sein.

### 7. Abstract

The autonomic nervous system modulates all variables of the cardiac electrophysiology (Ardell et al., 2016). The neuronal remodeling due to acute and especially chronic heart diseases results in an impaired balance of this system for the benefit of an increased sympathetic tone. The elevated adrenergic tone predispose towards ventricular arrhythmogenesis and therefore forms a substrate of sudden cardiac death (Ng, 2016).

On the level of the heart there is an extensive neural network consisting out of autonomic nerves and ganglionated plexi which form the intrinsic cardiac autonomic nervous system (ICANS). (Armour, 2004, Ardell et al., 2016). For a long period of time the ICANS was recognized as a simple parasympathetic relay station of the vagal innervation. Today it is known that the ICANS integrates central efferences on the one hand and sensory afferences on the other into regional cardiac regulation (Fukuda et al., 2015, Ardell et al., 2016). Moreover, it is shown that the GPs do not lose neuronal activity after central denervation (Ardell et al., 1991). Until now the functional meaning of the ICANS respecting the ventricular electrophysiological properties, ventricular arrhythmogenesis and sudden cardiac death stays unclear. The intention of this present work is to investigate the impact of the ICANS on the ventricular electrophysiology and the ventricular arrhythmogenesis in the C57Bl/6-wildtype-mouse. On that account a combined in-vivo and ex-vivo model was established. The findings of the experiments within the scope of this work demonstrated the following:

- (1) The isolated heart is a suitable model to study the ICANS, its epicardial neurons and its impact on the ventricular electrophysiological properties,
- (2) the ICANS impacts the ventricular function irrespective of central autonomic innervation and
- (3) the ICANS affects the ventricular electrophysiological properties and the ventricular arrhythmogenesis.

In this work the relevance of the ICANS regarding the ventricular electrophysiological properties and the ventricular arrhythmogenesis is shown. Due to a similar neuronal architecture of the ICANS in man and smaller mammals the ICANS could be of interests to treat ventricular arrhythmias in human perspective.

### 8. Abkürzungsverzeichnis

Φ	Perfusionsfluss
Δp	Perfusionsdruck
§	Paragraph
%	Prozent
°C	Grad Celsius
ADGP	Anteriorer absteigender Ganglienplexus
AK	Aortenklappe
ANS	Autonomes Nervensystem
AO	<i>Aorta ascendens</i>
AOGP	Aortenwurzel-Ganglienplexus
AP	Aktionspotenzial
APD	Aktionspotenzialdauer
bzw.	Beziehungsweise
C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	Natriumpyruvat
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glucose
ca.	Circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CS	Koronarsinus
DAD	<i>Delayed Afterdepolarization</i>
DRAGP	Dorsaler rechtsatrialer Ganglienplexus
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
etc.	et cetera
F	French
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Ggl.	Ganglion
GP	Ganglienplexus
h	Stunde

## Abkürzungsverzeichnis

---

HCN-Kanal	<i>Hyperpolarization-activated-cyclic-nucleotide-gated-Kanal</i>
HF	Herzfrequenz
ICANS	Intrinsisches kardiales autonomes Nervensystem
IE	Internationale Einheiten
III	<i>Nervus occulomotorius</i>
IX	<i>Nervus glossopharyngeus</i>
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
kHz	Kilohertz
I	Länge Gefäßsystem
LA	Linkes Atrium
LAA	Linkes Vorhofohr
LCA	Linke Koronararterie
LCA	Linke Koronararterie
LCGP	Linkskoronarer Ganglienplexus
LCN	<i>Local Circuit</i> Neurone
LDGP	Links dorsaler Ganglienplexus
LIPV	linke inferiore Pulmonalvene
LMGP	Links marginaler Ganglienplexus
LPA	Linke Pulmonalarterie
LSPV	Linke superiore Pulmonalvene
LV	Linker Ventrikel
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MBS	Miniburststimulation
MDGP	mittlerer dorsaler Ganglienplexus
mg	Milligramm
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter

## Abkürzungsverzeichnis

---

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
<i>p</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAD	Partielle atriale Denervation
PDGP	Posteriorer absteigender Ganglienplexus
PES	Programmierte Extrastimulation
PLLAGP	Posterolateraler links atrialer Ganglienplexus
PMLAGP	Posteromedialer links atrialer Ganglienplexus
PRAGP	Posteriorer rechts atrialer Ganglienplexus
PV	Pulmonalvene
QTc-Zeit	Frequenzkorrigierte QT-Zeit
<i>r</i>	Gefäßradius
R	Gefäßwiderstand
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
RA	Rechtes Atrium
RAA	Rechtes Vorhofohr
RCA	Rechte Koronararterie
RCGP	Rechtskoronarer Ganglienplexus
RCX	<i>Ramus Circumflexus</i>
RIPV	Rechte inferiore Pulmonalvene
RIVA	<i>Ramus Interventricularis</i>
RMGP	Rechts marginaler Ganglienplexus
RPA	Rechte Pulmonalarterie
RSPV	Rechte superiore Pulmonalvene
RV	Rechter Ventrikel

## Abkürzungsverzeichnis

---

s	Sekunde
SLAGP	Superiorer links atrialer Ganglienplexus
SRAGP	Superiorer rechts atrialer Ganglienplexus
TdP	<i>Torsade de pointe</i> Tachykardie
TK	Trikuspidalklappe
TP	<i>Truncus Pulmonalis</i>
u. a.	Unter anderem
V	Volt
v. a.	Vor allem
VBS	Ventrikuläre Burststimulation
VCI	<i>Vena cava inferior</i>
VCS	<i>Vena cava superior</i>
VES	Ventrikuläre Extrasystole
VII	<i>Nervus facialis</i>
VLAGP	Ventraler linksatrialer Ganglienplexus
VRAGP	Ventraler rechtsatrialer Ganglienplexus
VRP	Ventrikuläre Refraktärperiode
VRS	Ventrikuläre Reizschwelle
vs.	Versus
VT	Ventrikuläre Tachykardie
X	<i>Nervus vagus</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
η	Viskosität
μm	Mikrometer

## 9. Literaturverzeichnis

ALLEN, E., COOTE, J. H., GRUBB, B. D., BATTEN, T. F., PAUZA, D. H., NG, G. A. & BRACK, K. E. (2018) Electrophysiological effects of nicotinic and electrical stimulation of intrinsic cardiac ganglia in the absence of extrinsic autonomic nerves in the rabbit heart. *Heart rhythm*. 15: 1698-1707.

ALLESSIE, M. A., BONKE, F. & SCHOPMAN, F. (1977) Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circulation research*. 41: 9.

ANTZELEVITCH, C. (2001) Basic mechanisms of reentrant arrhythmias. *Current opinion in cardiology*. 16: 1-7.

ANTZELEVITCH, C. & BURASHNIKOV, A. (2011) Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Card Electrophysiol Clin*. 3: 23-45.

APPLETON, G. O., LI, Y., TAFFET, G. E., HARTLEY, C. J., MICHAEL, L. H., ENTMAN, M. L., ROBERTS, R. & KHOURY, D. S. (2004) Determinants of cardiac electrophysiological properties in mice. *J Interv Card Electrophysiol*. 11: 5-14.

ARDELL, J., ANDRESEN, M., ARMOUR, J., BILLMAN, G., CHEN, P. S., FOREMAN, R., HERRING, N., O'LEARY, D., SABBAH, H. & SCHULTZ, H. (2016) Translational Neurocardiology: preclinical models and cardioneural integrative aspects. *The Journal of physiology*.

ARDELL, J. L., BUTLER, C. K., SMITH, F. M., HOPKINS, D. A. & ARMOUR, J. A. (1991) Activity of in vivo atrial and ventricular neurons in chronically decentralized canine hearts. *Am J Physiol*. 260: H713-21.

ARMOUR, J. A. (2004) Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287: R262-71.

ARMOUR, J. A. (2008) Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Exp Physiol*. 93: 165-76.

ARMOUR, J. A., MURPHY, D. A., YUAN, B. X., MACDONALD, S. & HOPKINS, D. A. (1997) Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec*. 247: 289-98.

BEAUMONT, E., SALAVATIAN, S., SOUTHERLAND, E. M., VINET, A., JACQUEMET, V., ARMOUR, J. A. & ARDELL, J. L. (2013) Network interactions within the canine intrinsic cardiac nervous system: implications for reflex control of regional cardiac function. *J Physiol*. 591: 4515-33.

- BELL, R. M., MOCANU, M. M. & YELLON, D. M. (2011) Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 50: 940-50.
- BERUL, C. I. (2003) Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. *Physiol Genomics.* 13: 207-16.
- BERUL, C. I., ARONOVITZ, M. J., WANG, P. J. & MENDELSON, M. E. (1996) In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. *Circulation.* 94: 2641-8.
- BJØRNSTAD, H., TANDE, P. M. & REFSUM, H. (1991) Cardiac electrophysiology during hypothermia. Implications for medical treatment. *Arctic medical research.* 50: 71-75.
- BONDARENKO, V. E., SZIGETI, G. P., BETT, G. C., KIM, S. J. & RASMUSSEN, R. L. (2004) Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287: H1378-403.
- BOUKENS, B. J., RIVAUD, M. R., RENTSCHLER, S. & CORONEL, R. (2014) Misinterpretation of the mouse ECG: 'musing the waves of *Mus musculus*'. *J Physiol.* 592: 4613-26.
- BRACK, K. E., COOTE, J. H. & NG, G. A. (2011) Vagus nerve stimulation protects against ventricular fibrillation independent of muscarinic receptor activation. *Cardiovasc Res.* 91: 437-46.
- BRODDE, O.-E. & MICHEL, M. C. (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological reviews.* 51: 651-690.
- BROHAN, J. & GOUDRA, B. G. (2017) The role of GABA receptor agonists in anesthesia and sedation. *CNS drugs.* 31: 845-856.
- BURCHFIELD, J. S., XIE, M. & HILL, J. A. (2013) Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.* 128: 388-400.
- BUSSE, R. 2010. Kreislauf. In: SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. (eds.) *Physiologie des Menschen.* Heidelberg: Springer.
- CHAVES, A. A., DECH, S. J., NAKAYAMA, T., HAMLIN, R. L., BAUER, J. A. & CARNES, C. A. (2003) Age and anesthetic effects on murine electrocardiography. *Life Sci.* 72: 2401-12.
- CLASEN, L., EICKHOLT, C., ANGENDOHR, S., JUNGEN, C., SHIN, D.-I., DONNER, B., FÜRNKRANZ, A., KELM, M., KLÖCKER, N., MEYER, C. & MAKIMOTO, H. (2018) A modified approach for programmed electrical stimulation in mice: Inducibility of ventricular arrhythmias. *PLOS ONE.* 13: e0201910.

COHN, J. N., FERRARI, R. & SHARPE, N. (2000) Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 35: 569-582.

CONSTANTINIDES, C., MEAN, R. & JANSSEN, B. J. (2011) Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. *ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 52: e21.

COOTE, J. H. (2013) Myths and realities of the cardiac vagus. *J Physiol*. 591: 4073-85.

CRAVEN, J. (2011) The autonomic nervous system, sympathetic chain and stellate ganglion. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 12: 55-57.

CURTIS, M. J., HANCOX, J. C., FARKAS, A., WAINWRIGHT, C. L., STABLES, C. L., SAINT, D. A., CLEMENTS-JEWERY, H., LAMBIASE, P. D., BILLMAN, G. E., JANSE, M. J., PUGSLEY, M. K., NG, G. A., RODEN, D. M., CAMM, A. J. & WALKER, M. J. (2013) The Lambeth Conventions (II): guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther*. 139: 213-48.

CURTIS, M. J. & WALKER, M. J. (1988) Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia. *Cardiovascular research*. 22: 656-665.

DE FERRARI, G. M., SALVATI, P., GROSSONI, M., UKMAR, G., VAGA, L., PATRONO, C. & SCHWARTZ, P. J. (1993) Pharmacologic modulation of the autonomic nervous system in the prevention of sudden cardiac death. A study with propranolol, methacholine and oxotremorine in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 22: 283-90.

DOEVENDANS, P. A., DAEMEN, M. J., DE MUINCK, E. D. & SMITS, J. F. (1998) Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res*. 39: 34-49.

DÖRING, H. J. & DEHNERT, H. (1988) *Das isolierte perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff*. Biomesstechnik-Verlag.

ECKLE, V.-S., HUCKLENBRUCH, C. & TODOROVIC, S. (2009) Was wissen wir über Narkosemechanismen? *Der Anaesthesist*. 58: 1144-1149.

EDVARDSSON, N., HIRSCH, I. & OLSSON, S. B. (1984) Right ventricular monophasic action potentials in healthy young men. *Pacing Clin Electrophysiol*. 7: 813-21.

EICKHOLT, C., MISCHKE, K., SCHIMPF, T., KNACKSTEDT, C., SCHERER, K., PAUZA, D., MARX, N., SHIN, D.-I., KELM, M. & MEYER, C. 2013. Functional and

topographic concordance of right atrial neural structures inducing sinus tachycardia. *Neurobiology of Respiration*. Springer.

EINTHOVEN, W., FAHR, G. & DE WAART, A. (1913) Über die Richtung und die manifeste Grösse der Potentialschwankungen im menschlichen Herzen und über den Einfluss der Herzlage auf die Form des Elektrokardiogramms. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 150: 275-315.

ENGELHARD, K. & WERNER, C. 2017. Narkose–Inhalations-und Injektionsanästhetika. In: AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F. & STARKE, K. (eds.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Elsevier.

FAGGIONI, M., HWANG, H. S., VAN DER WERF, C., NEDEREND, I., KANNANKERIL, P. J., WILDE, A. A. & KNOLLMANN, B. C. (2013) Accelerated sinus rhythm prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and in patients. *Circ Res*. 112: 689-97.

FUKUDA, K., KANAZAWA, H., AIZAWA, Y., ARDELL, J. L. & SHIVKUMAR, K. (2015) Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circ Res*. 116: 2005-19.

FURNESS, J. B., CALLAGHAN, B. P., RIVERA, L. R. & CHO, H.-J. 2014. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*. Springer.

GARREY, W. E. (1914) The nature of fibrillary contraction of the heart.—Its relation to tissue mass and form. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 33: 397-414.

GIBBINS, I. (2013) Functional organization of autonomic neural pathways. *Organogenesis*. 9: 169-175.

GREENE, S. & THURMON, J. (1988) Xylazine—a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 11: 295-313.

GROBAN, L., ZAPATA-SUDO, G., LIN, M. & NELSON, T. (2002) Effects of moderate and deep hypothermia on Ca<sup>2+</sup> signaling in rat ventricular myocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 12: 101-110.

GURABI, Z., KONCZ, I., PATOCSKAI, B., NESTERENKO, V. V. & ANTZELEVITCH, C. (2014) Cellular mechanism underlying hypothermia-induced ventricular tachycardia/ventricular fibrillation in the setting of early repolarization and the protective effect of quinidine, cilostazol, and milrinone. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 7: 134-142.

HABECKER, B. A., ANDERSON, M. E., BIRREN, S. J., FUKUDA, K., HERRING, N., HOOVER, D. B., KANAZAWA, H., PATERSON, D. J. & RIPPLINGER, C. M. (2016) Molecular and cellular neurocardiology: development, and cellular and molecular adaptations to heart disease. *The Journal of physiology*. 594: 3853-3875.

HABICHT, G. S. (1981) Body temperature in normal and endotoxin-treated mice of different ages. *Mechanisms of Ageing and Development*. 16: 97-104.

HASAN, W., JAMA, A., DONOHUE, T., WERNLI, G., ONYSZCHUK, G., AL-HAFEZ, B., BILGEN, M. & SMITH, P. G. (2006) Sympathetic hyperinnervation and inflammatory cell NGF synthesis following myocardial infarction in rats. *Brain research*. 1124: 142-154.

HE, B., LU, Z., HE, W., HUANG, B. & JIANG, H. (2013a) Similar effects of vagus nerve stimulation and atrial ganglionated plexi stimulation on ventricular effective refractory period and action potential duration in canine. *Int J Cardiol*. 168: 5116-8.

HE, B., LU, Z., HE, W., HUANG, B., YU, L., WU, L., CUI, B., HU, X. & JIANG, H. (2013b) The effects of atrial ganglionated plexi stimulation on ventricular electrophysiology in a normal canine heart. *J Interv Card Electrophysiol*. 37: 1-8.

HE, B., LU, Z., HE, W., WU, L., CUI, B., HU, X., YU, L., HUANG, C. & JIANG, H. (2013c) Effects of ganglionated plexi ablation on ventricular electrophysiological properties in normal hearts and after acute myocardial ischemia. *Int J Cardiol*. 168: 86-93.

HERRING, N., KALLA, M. & PATERSON, D. J. (2019) The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias: current concepts and emerging therapies. *Nature Reviews Cardiology*. 1-20.

HOOVER, D. B., ISAACS, E. R., JACQUES, F., HOARD, J. L., PAGE, P. & ARMOUR, J. A. (2009) Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia. *Neuroscience*. 164: 1170-9.

HOU, Y., SCHERLAG, B. J., LIN, J., ZHANG, Y., LU, Z., TRUONG, K., PATTERSON, E., LAZZARA, R., JACKMAN, W. M. & PO, S. S. (2007) Ganglionated plexi modulate extrinsic cardiac autonomic nerve input: effects on sinus rate, atrioventricular conduction, refractoriness, and inducibility of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 50: 61-8.

HUANG, W. A., BOYLE, N. G. & VASEGHI, M. (2017) Cardiac innervation and the autonomic nervous system in sudden cardiac death. *Cardiac electrophysiology clinics*. 9: 665-679.

JÄNIG, W. 2010. Vegetatives Nervensystem. In: SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. (eds.) *Physiologie des Menschen*. Heidelberg: Springer.

JÄNIG, W. (2016) Neurocardiology: a neurobiologist's perspective. *The Journal of physiology*. 594: 3955-3962.

JÄNIG, W. & MCLACHLAN, E. M. (1992) Characteristics of function-specific pathways in the sympathetic nervous system. *Trends in neurosciences*. 15: 475-481.

JANSSEN, B. J., DE CELLE, T., DEBETS, J. J., BROUNS, A. E., CALLAHAN, M. F. & SMITH, T. L. (2004) Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287: H1618-24.

JANSSEN, B. J., LEENDERS, P. J. & SMITS, J. F. (2000) Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 278: R215-25.

JOSEPHSON, M. E., HOROWITZ, L. N., FARSHIDI, A. & KASTOR, J. A. (1978a) Recurrent sustained ventricular tachycardia. 1. Mechanisms. *Circulation*. 57: 431-40.

JOSEPHSON, M. E., HOROWITZ, L. N., FARSHIDI, A., SPEAR, J. F., KASTOR, J. A. & MOORE, E. N. (1978b) Recurrent sustained ventricular tachycardia. 2. Endocardial mapping. *Circulation*. 57: 440-447.

JUNGEN, C., SCHERSCHEL, K., EICKHOLT, C., KUKLIK, P., KLATT, N., BORK, N., SALZBRUNN, T., ALKEN, F., ANGENDOHR, S., KLENE, C., MESTER, J., KLÖCKER, N., VELDKAMP, M. W., SCHUMACHER, U., WILLEMS, S., NIKOLAEV, V. O. & MEYER, C. (2017) Disruption of cardiac cholinergic neurons enhances susceptibility to ventricular arrhythmias. *Nature Communications*. 8: 14155.

KAESE, S., FROMMEYER, G., VERHEULE, S., VAN LOON, G., GEHRMANN, J., BREITHARDT, G. & ECKARDT, L. (2013) The ECG in cardiovascular-relevant animal models of electrophysiology. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*. 24: 84-91.

KAESE, S. & VERHEULE, S. (2012) Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol*. 3: 345.

KALLA, M., HERRING, N. & PATERSON, D. J. (2016) Cardiac sympatho-vagal balance and ventricular arrhythmia. *Autonomic Neuroscience*. 199: 29-37.

KANDALA, J., OOMMEN, C. & KERN, K. B. (2017) Sudden cardiac death. *British Medical Bulletin*. 122: 5-15.

KASS, D. A., HARE, J. M. & GEORGAKOPOULOS, D. (1998) Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res*. 82: 519-22.

KENG, L. B. (1893) On the nervous supply of the dog's heart. *The Journal of physiology*. 14: 466-482.

KIMURA, K., IEDA, M. & FUKUDA, K. (2012) Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. *Circulation research*. 110: 325-336.

KIMURA, K., IEDA, M., KANAZAWA, H., YAGI, T., TSUNODA, M., NINOMIYA, S.-I., KUROSAWA, H., YOSHIMI, K., MOCHIZUKI, H. & YAMAZAKI, K. (2007) Cardiac sympathetic rejuvenation: a link between nerve function and cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 100: 1755-1764.

KINGSBURY, M. P., ROBINSON, H., FLORES, N. A. & SHERIDAN, D. J. (2001) Investigation of mechanisms that mediate reactive hyperaemia in guinea-pig hearts: role of K(ATP) channels, adenosine, nitric oxide and prostaglandins. *Br J Pharmacol*. 132: 1209-16.

KURIACHAN, V. P., SUMNER, G. L. & MITCHELL, L. B. (2015) Sudden Cardiac Death. *Current Problems in Cardiology*. 40: 133-200.

LAKATTA, E. G. & DI FRANCESCO, D. (2009) What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *Journal of molecular and cellular cardiology*. 47: 157-170.

LANGENDORFF, O. (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 61: 291-332.

LANGLEY, J. N. (1921) *The autonomic nervous system*. Cambridge, Heffer.

LI, P., GONG, J. X., SUN, W., ZHOU, B. & KONG, X. Q. (2015) Hexamethonium attenuates sympathetic activity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med Rep*. 12: 7116-22.

LI, Y. F., LACROIX, C. & FREELING, J. (2010) Cytisine induces autonomic cardiovascular responses via activations of different nicotinic receptors. *Auton Neurosci*. 154: 14-9.

LIAO, K., YU, L., ZHOU, X., SAREN, G., WANG, S., WANG, Z., HUANG, B., YANG, K. & JIANG, H. (2015) Low-level baroreceptor stimulation suppresses atrial fibrillation by inhibiting ganglionated plexus activity. *Canadian Journal of Cardiology*. 31: 767-774.

LIAO, R., PODESSER, B. K. & LIM, C. C. (2012) The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 303: H156-67.

LIU, G., IDEN, J. B., KOVITHAVONGS, K., GULAMHUSEIN, R., DUFF, H. J. & KAVANAGH, K. M. (2004) In vivo temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave. *J Physiol*. 555: 267-79.

LUDERITZ, B. (2008) Past and future aspects of clinical electrophysiology. *Cardiology journal*. 15: 293.

MAGNANI, J. W., WILLIAMSON, M. A., ELLINOR, P. T., MONAHAN, K. M. & BENJAMIN, E. J. (2009) P wave indices: current status and future directions in epidemiology, clinical, and research applications. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2: 72-79.

MAIER, S. K., WESTENBROEK, R. E., YAMANUSHI, T., DOBRZYNSKI, H., BOYETT, M. R., CATTERALL, W. A. & SCHEUER, T. (2003) An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 3507-3512.

MCALLEN, R. M., SALO, L. M., PATON, J. F. & PICKERING, A. E. (2011) Processing of central and reflex vagal drives by rat cardiac ganglion neurones: an intracellular analysis. *The Journal of physiology*. 589: 5801-5818.

MCMAHON, T. A. (1975) Using body size to understand the structural design of animals: quadrupedal locomotion. *Journal of Applied Physiology*. 39: 619-627.

MERX, M. W., GORRESSEN, S., VAN DE SANDT, A. M., CORTESE-KROTT, M. M., OHLIG, J., STERN, M., RASSAF, T., GODECKE, A., GLADWIN, M. T. & KELM, M. (2014) Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 109: 398.

MEYER, C., RANA, O. R., SAYGILI, E., GEMEIN, C., BECKER, M., NOLTE, K. W., WEIS, J., SCHIMPF, T., KNACKSTEDT, C., MISCHKE, K., HOFFMANN, R., KELM, M., PAUZA, D. & SCHAUERTE, P. (2010) Augmentation of left ventricular contractility by cardiac sympathetic neural stimulation. *Circulation*. 121: 1286-94.

MILLS, T. W. (1886) Rhythm and innervation of the heart of the sea-turtle. *Journal of anatomy and physiology*. 21: 1.

MITCHELL, G. F., JERON, A. & KOREN, G. (1998) Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol*. 274: H747-51.

NERBONNE, J. M. (2004a) Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med*. 14: 83-93.

NERBONNE, J. M. (2004b) Studying Cardiac Arrhythmias in the Mouse—A Reasonable Model for Probing Mechanisms? *Trends in Cardiovascular Medicine*. 14: 83-93.

NG, G. A. (2014) Vagal modulation of cardiac ventricular arrhythmia. *Exp Physiol*. 99: 295-9.

NG, G. A. (2016) Neuro-cardiac interaction in malignant ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. *Autonomic Neuroscience*. 199: 66-79.

- NOUJAIM, S. F., LUCCA, E., MUNOZ, V., PERSAUD, D., BERENFELD, O., MEIJLER, F. L. & JALIFE, J. (2004) From mouse to whale: a universal scaling relation for the PR Interval of the electrocardiogram of mammals. *Circulation*. 110: 2802-8.
- ONDICOVA, K. & MRAVEC, B. (2010) Multilevel interactions between the sympathetic and parasympathetic nervous systems: a minireview. *Endocr Regul*. 44: 69-75.
- PACHON, R. E., SCHARF, B. A., VATNER, D. E. & VATNER, S. F. (2015) Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 308: H1525-H1529.
- PALMA, J.-A. & BENARROCH, E. E. (2014) Neural control of the heart: recent concepts and clinical correlations. *Neurology*. 83: 261-271.
- PAUZA, D. H., PAUZIENE, N., TAMASAUSKAS, K. A. & STROPUS, R. (1997) Hilum of the heart. *The Anatomical Record*. 248: 322-324.
- PAUZA, D. H., SABURKINA, I., RYSEVAITE, K., INOKAITIS, H., JOKUBAUSKAS, M., JALIFE, J. & PAUZIENE, N. (2013) Neuroanatomy of the murine cardiac conduction system: a combined stereomicroscopic and fluorescence immunohistochemical study. *Auton Neurosci*. 176: 32-47.
- PAUZA, D. H., SKRIPKA, V., PAUZIENE, N. & STROPUS, R. (2000) Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart. *The Anatomical Record*. 259: 353-382.
- PLATONOV, P. G. (2008) Atrial conduction and atrial fibrillation: What can we learn from surface ECG? *Cardiology journal*. 15: 402-407.
- PRIORI, S. G., BLOMSTRÖM-LUNDQVIST, C., MAZZANTI, A., BLOM, N., BORGGREFE, M., CAMM, J., ELLIOTT, P. M., FITZSIMONS, D., HATALA, R. & HINDRICKS, G. (2015) 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *Europace*. euv319.
- PRYSTOWSKY, E. N., JACKMAN, W. M., RINKENBERGER, R. L., HEGER, J. J. & ZIPES, D. P. (1981) Effect of autonomic blockade on ventricular refractoriness and atrioventricular nodal conduction in humans. Evidence supporting a direct cholinergic action on ventricular muscle refractoriness. *Circ Res*. 49: 511-8.
- RANDALL, D. C. (2000) Towards an understanding of the function of the intrinsic cardiac ganglia. *The Journal of physiology*. 528: 406-406.

ROHRER, D. K., SCHAUBLE, E. H., DESAI, K. H., KOBILKA, B. K. & BERNSTEIN, D. (1998) Alterations in dynamic heart rate control in the beta 1-adrenergic receptor knockout mouse. *Am J Physiol.* 274: H1184-93.

RYSEVAITE, K., SABURKINA, I., PAUZIENE, N., NOUJAIM, S. F., JALIFE, J. & PAUZA, D. H. (2011) Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. *Heart Rhythm.* 8: 448-54.

SABIR, I. N., KILLEEN, M. J., GRACE, A. A. & HUANG, C. L. (2008) Ventricular arrhythmogenesis: insights from murine models. *Prog Biophys Mol Biol.* 98: 208-18.

SABURKINA, I., GUKAUSKIENE, L., RYSEVAITE, K., BRACK, K. E., PAUZA, A. G., PAUZIENE, N. & PAUZA, D. H. (2014) Morphological pattern of intrinsic nerve plexus distributed on the rabbit heart and interatrial septum. *Journal of Anatomy.* 224: 583-593.

SCHRICKEL, J. W., BRIXIUS, K., HERR, C., CLEMEN, C. S., SASSE, P., REETZ, K., GROHE, C., MEYER, R., TIEMANN, K., SCHRODER, R., BLOCH, W., NICKENIG, G., FLEISCHMANN, B. K., NOEGEL, A. A., SCHWINGER, R. H. & LEWALTER, T. (2007) Enhanced heterogeneity of myocardial conduction and severe cardiac electrical instability in annexin A7-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 76: 257-68.

SCHWEIGHÖFER, H., RUMMEL, C., ROTH, J. & ROSENGARTEN, B. (2016) Modulatory effects of vagal stimulation on neurophysiological parameters and the cellular immune response in the rat brain during systemic inflammation. *Intensive care medicine experimental.* 4: 19.

SESSLER, D. I. & TODD, M. M. (2000) Perioperative heat balance. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists.* 92: 578-578.

SHEN, M. J. & ZIPES, D. P. (2014) Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. *Circ Res.* 114: 1004-21.

SHERWOOD, L. 2010. The Peripheral Nervous System: Efferent Division. In: COSSIO, Y. (ed.) *Human Physiology: From Cells to Systems.* Brooks/Cole.

SHIELDS JR, R. W. (1993) Functional anatomy of the autonomic nervous system. *Journal of Clinical neurophysiology.* 10: 2-13.

SHIVKUMAR, K., AJIJOLA, O. A., ANAND, I., ARMOUR, J. A., CHEN, P. S., ESLER, M., FERRARI, G. M., FISHBEIN, M. C., GOLDBERGER, J. J. & HARPER, R. M. (2016) Clinical neurocardiology defining the value of neuroscience-based cardiovascular therapeutics. *The Journal of physiology.* 594: 3911-3954.

STARKE, K. 2017. Pharmakologie cholinergischer Systeme. In: AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F. & STARKE, K. (eds.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* München: Elsevier.

SUGIMOTO, T., SAGAWA, K. & GUYTON, A. C. (1966) Effect of tachycardia on cardiac output during normal and increased venous return. *Am J Physiol.* 211: 288-92.

SUTHERLAND, F. J., SHATTOCK, M. J., BAKER, K. E. & HEARSE, D. J. (2003) Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30: 867-78.

SWOAP, S. J., LI, C., WESS, J., PARSONS, A. D., WILLIAMS, T. D. & OVERTON, J. M. (2008) Vagal tone dominates autonomic control of mouse heart rate at thermoneutrality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294: H1581-8.

TALAN, M. (1984) Body temperature of C57BL/6J mice with age. *Exp Gerontol.* 19: 25-9.

TSE, G. (2016) Mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Arrhythm.* 32: 75-81.

UECHI, M., ASAI, K., OSAKA, M., SMITH, A., SATO, N., WAGNER, T. E., ISHIKAWA, Y., HAYAKAWA, H., VATNER, D. E., SHANNON, R. P., HOMCY, C. J. & VATNER, S. F. (1998) Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac Gs $\alpha$ . *Circ Res.* 82: 416-23.

VAIDYA, D., MORLEY, G. E., SAMIE, F. H. & JALIFE, J. (1999) Reentry and Fibrillation in the Mouse Heart: A Challenge to the Critical Mass Hypothesis. *Circulation Research.* 85: 174-181.

VANOLI, E., DE FERRARI, G. M., STRAMBA-BADIALE, M., HULL, S. S., JR., FOREMAN, R. D. & SCHWARTZ, P. J. (1991) Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res.* 68: 1471-81.

VERHEULE, S., VAN BATENBURG, C. A., COENJAERTS, F. E., KIRCHHOFF, S., WILLECKE, K. & JONGSMA, H. J. (1999) Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 10: 1380-9.

VERKERK, A. O., WILDERS, R., VAN BORREN, M. M., PETERS, R. J., BROEKHUIS, E., LAM, K., CORONEL, R., DE BAKKER, J. M. & TAN, H. L. (2007) Pacemaker current (I<sub>f</sub>) in the human sinoatrial node. *European heart journal.* 28: 2472-2478.

WAKE, E. & BRACK, K. (2016) Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. *Auton Neurosci.* 199: 3-16.

WALKER, M., CURTIS, M., HEARSE, D., CAMPBELL, R., JANSE, M., YELLON, D., COBBE, S., COKER, S., HARNESS, J. & HARRON, D. (1988) The Lambeth

Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovascular research*. 22: 447-455.

WANG, S., LI, H., YU, L., CHEN, M., WANG, Z., HUANG, B., ZHOU, L., ZHOU, X. & JIANG, H. (2015) Anti-arrhythmic effects of atrial ganglionated plexi stimulation is accompanied by preservation of connexin43 protein in ischemia-reperfusion canine model. *Int J Clin Exp Med*. 8: 22098-107.

WEHRWEIN, E. A., ORER, H. S. & BARMAN, S. M. (2016) Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system. *Comprehensive Physiology*.

WELLENS, H. J. (2008) Forty Years of Invasive Clinical Electrophysiology. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 1: 49-53.

WICKRAMASINGHE, S. R. & PATEL, V. V. (2013) Local innervation and atrial fibrillation. *Circulation*. 128: 1566-1575.

WINTER, J., BISHOP, M. J., WILDER, C. D., O'SHEA, C., PAVLOVIC, D. & SHATTOCK, M. J. (2018) Sympathetic nervous regulation of calcium and action potential alternans in the intact heart. *Frontiers in physiology*. 9: 16.

XU, H., AIBIKI, M., SEKI, K., OGURA, S., YOKONO, S. & OGLI, K. (2000) Effects of induced hypothermia on renal sympathetic nerve activity and baroreceptor reflex in urethane-anesthetized rabbits. *Critical care medicine*. 28: 3854-3860.

ZARZOSO, M., RYSEVAITE, K., MILSTEIN, M. L., CALVO, C. J., KEAN, A. C., ATIENZA, F., PAUZA, D. H., JALIFE, J. & NOUJAIM, S. F. (2013) Nerves projecting from the intrinsic cardiac ganglia of the pulmonary veins modulate sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc Res*. 99: 566-75.

ZHOU, S., CHEN, L. S., MIYAUCHI, Y., MIYAUCHI, M., KAR, S., KANGAVARI, S., FISHBEIN, M. C., SHARIFI, B. & CHEN, P.-S. (2004) Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circulation research*. 95: 76-83.

ZORNOFF, L., PAIVA, S., DUARTE, D. R. & SPADARO, J. (2009) Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol*. 92: 157-64.

### 10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das autonome Nervensystem .....	5
Abbildung 2: Autonome Innervation des Herzens .....	7
Abbildung 3: Ganglienplexus des humanen und des murinen Herzens .....	11
Abbildung 4: Murines Oberflächen-Elektrokardiogramm .....	16
Abbildung 5: Retrograd perfundiertes Herz .....	19
Abbildung 6: Apparativer Versuchsaufbau .....	22
Abbildung 7: Elektrodenkatheter im Verhältnis zum murinen Herzen .....	23
Abbildung 8: Intrakardiales Elektromyogramm .....	24
Abbildung 9: Messung der Körperkerntemperatur und Aufzeichnung des Oberflächen-Elektrokardiogramms der narkotisierten Maus .....	29
Abbildung 10: Ableitung von Körperkerntemperatur, Herzfrequenz und Oberflächen-Elektrokardiogramm <i>in-vivo</i> .....	30
Abbildung 11: Retrograd perfundiertes Herz mit eingebrachtem Elektrodenkatheter .....	33
Abbildung 12: Übersichtsdarstellung der Langendorff-Anlage .....	37
Abbildung 13: Kanüliertes isoliertes Herz .....	39
Abbildung 14: Verlauf des Aortenflusses im Rahmen der Hyperämietestung .....	40
Abbildung 15: Auswertung des murinen Oberflächen- Elektrokardiogramms .....	41
Abbildung 16: Abhängigkeit von Herzfrequenz und Körperkerntemperatur .....	48
Abbildung 17: Einfluss einer autonomen Ganglienblockade auf die Herzfrequenz und die atriale Erregung <i>in-vivo</i> .....	50
Abbildung 18: Einfluss einer partieller atrialer Denervation auf die ventrikuläre Refraktärperiode im isolierten Herzen .....	54
Abbildung 19: Einfluss einer autonomen Ganglienblockade sowie einer muskarinergen Blockade auf die ventrikuläre Refraktärperiode im isolierten Herzen .....	55
Abbildung 20: Einfluss einer autonomen Ganglienblockade sowie einer muskarinergen Blockade auf die ventrikuläre Refraktärperiode nach partieller atrialer Denervation im isolierten Herzen .....	56
Abbildung 21: Induzierte ventrikulären Tachykardie im isolierten Herzen .....	58
Abbildung 22: Einfluss einer partiellen atrialen Denervation auf die Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien isolierten Herzen .....	59

### 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stimulationsprotokoll.....	27
Tabelle 2: Zusammensetzung der Perfusionslösung .....	36
Tabelle 3: Arrhythmie-Scoring-System nach Faggioni et al. (Faggioni et al., 2013) .....	44
Tabelle 4: Arrhythmie-Scoring-System zur kumulativen Quantifizierung .....	44
Tabelle 5: Anzahl der eingeschlossenen Versuche der elektrophysiologischen Untersuchung der Maus <i>in-vivo</i> .....	46
Tabelle 6: Elektrophysiologische Basischarakterisierung <i>in-vivo</i> .....	49
Tabelle 7: Anzahl induzierter ventrikuläre Arrhythmien <i>in-vivo</i> .....	51
Tabelle 8: Anzahl der eingeschlossenen Versuche der elektrophysiologischen Untersuchung des isolierten Herzens .....	52
Tabelle 9: Anzahl induzierter ventrikuläre Arrhythmien im isolierten Herzen .....	57

## 12. Anhang

### 12.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Klebeband, Transpore	3M, Minnesota, USA
Klebeband, Durapore	3M, Minnesota, USA
Zellstofftupfer, Pur Zellin	Hartmann, Wiener Neudorf, Österreich
Mullkompressen	Hartmann, Wiener Neudorf, Österreich
Elektrodencreme	Gello GmbH, Geltechnik, Ahaus, Deutschland
Seidenfaden 5-0	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Kanüle grau 27/25 G	BD Eclipse, Erembodegem, Belgien
1/5/10 ml Spritze	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

### 12.2 Chemikalien und Pharmaka

Stoff	CAS-Nummer	Hersteller
Natriumchlorid (fest) (NaCl)	7647-14-5	KMF Optichem, Leipzig, Deutschland
Natriumchlorid (flüssig) (NaCl)	FREU950	Braun Melsungen AG, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	7447-40-7	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	7487-88-9	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	144-55-8	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	7778-77-0	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glukose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	50-99-7	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> )	113-24-6	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	10043-52-4	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	06497131	Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Hexamethonium	55-97-0	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Atropin	51-55-8	Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## 12.3 Geräte und Instrumente

Gerät / Instrument	Hersteller
Elektrodenkatheter, CIB'ERMOUSE Electrophysiology	NuMED Inc, Hopkinton, USA
Katheterkabel, Connector Cable CIB'ERMOUSE	NuMED Inc, Hopkinton, USA
Datenaufzeichnung (EMG), PowerLab 8/30	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Datenaufzeichnung (Langendorff), PLUGSYS Case, Type 603	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
EKG-Verstärker, ECG Amplifier	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
EKG-Verstärker Animal Bio Amp ML136	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Signal-Verstärker (Langendorff), Transducer Amplifier Module	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Klemmelektroden	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Temperatursonde, T-Type Pod	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Operationstisch, Size 1 Non-Heated Operating Table for Mice	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Heizbarer Operationstisch, Heated Small Animal Operating Table	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Kühlbarer Operationstisch	Eigenkonstruktion
Stimulusgenerator, STG 4002	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland
Mikroskop, Stereo Zoom Microscope	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kaltlichtquelle, KL1500 LCD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Langendorff-Anlage, BASIC UNIT IH-SRL FOR ISOLATED SMALL RODENT HEART TYPE	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Wärmebad, THERMOSTATIC CIRCULATOR E 103	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Rollerpumpe, ISM 829/115V	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Druckabnehmer, APT300 Pressure Transducer	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland
Elektrorasierer, AESCULAP Favorita II	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Federschere, Spitzen gerade	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Federschere, Spitzen gebogen	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schere (Schneide 39 mm), Spitzen gerade	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schere (Schneide 19 mm), Spitzen gerade	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette (11,5 cm), Spitzen gebogen, spitz	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette (13 cm), Spitzen gerade, stumpf	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette (11 cm), Spitzen gerade, spitz	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

### 12.4 Software

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Aufzeichnung, LabChart 8.1	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Stimulation, MC Stimulus II	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland
Statistik, PRISM 6	Graph Pad, San Diego, USA

### 13. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm, Direktor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, danke ich herzlich für die Möglichkeit, in seiner Klinik meine ersten Schritte in der experimentellen kardiologischen Forschung gehen zu können, die Grundlage dieser Arbeit sind.

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg, Direktor der Klinik und Poliklinik für Kardiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, danke ich vielmals für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. Christian Meyer, stellvertretender Direktor Schwerpunkt Rhythmologie der Klinik und Poliklinik für Kardiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, sowie Herrn Dr. med. Christian Eickholt gilt mein besonderer Dank. Beide unterstützten mich nicht nur über die gesamte Zeit meiner Promotion mit vollem Einsatz, sondern brachten mir auch das eigenständige wissenschaftliche Arbeiten und die Freude daran näher.

Bedanken möchte ich mich auch bei den experimentell tätigen Mitarbeitern der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Allen voran danke ich Herrn Dr. med. Lukas Clasen und Frau Stefanie Becher, die mich bei der Erarbeitung der *In-vivo*- bzw. der Langendorff-Methodik mit ihrer langjährigen Erfahrung und einem ermutigenden Wort zu jederzeit unterstützen.

Meinen Mitdoktoranden danke ich sehr herzlich für die gegenseitige Motivation, Inspiration und Unterstützung über die gesamte Dauer dieser Arbeit.

Meinen Eltern, Helmut und Jutta Angendoehr, die mich zum Studium der Medizin ermutigten, mir dieses ermöglichten, mich auf dem gesamten Weg in liebevoller Hingabe unterstützten und ohne die ich nicht dort wäre, wo ich bin, möchte ich den größten Dank aussprechen.

Meiner Lebensgefährtin, Carolin Lohr, die mir in den letzten Jahren immer und uneingeschränkt zur Seite stand, mich zu jederzeit unterstützte und motivierte, gilt in gleichem Maße ein besonderer Dank. Auch ohne ihre Unterstützung wäre der Weg hierher nicht möglich gewesen.

Meinen Geschwistern, Annika Barbee und Maximilian Angendoehr, die mir in vielen Dingen Vorbild sind, möchte ich ebenfalls meinen herzlichen Dank für die Unterstützung der letzten Jahre aussprechen.

## 14. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

## 15. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

C. Jungen, K. Scherschel, C. Eickholt, P. Kuklik, N. Klatt, N. Bork, T. Salzbrunn, F. Alken, **S. Angendoehr**, C. Klene, J. Mester, N. Klöcker, M. Veldkamp, U. Schumacher, S. Willems, V. Nikolaev, C. Meyer: **Disruption of cardiac cholinergic neurons enhances susceptibility to ventricular arrhythmias.** Nature Communications. 8, 14155, 2017.

L. Clasen, C. Eickholt, **S. Angendoehr**, C. Jungen, D.-I. Shin, B. Donner, A. Fürnkranz, M. Kelm, N. Klöcker, C. Meyer, H. Makimoto: **A modified approach for programmed electrical stimulation in mice: Inducibility of ventricular arrhythmias.** PLOS ONE, 13, e0201910, 2018.

C. Eickholt, L. Clasen, C. Peiker, **S. Angendoehr**, F. Jonas, T. Rassaf, M. Kelm, S. Willems, N. Klöcker, C. Meyer: **I<sub>f</sub> Blockade Improves Sympatho-Vagal Balance Following Myocardial I/R-Injury.** Posterbeitrag zur DGK-Jahresstagung 2015; Clin Res Cardiol 104, Suppl 1, April 2015 – Beitrag P726

B. Bartsch, L. Clasen, **S. Angendoehr**, A. Fürnkranz, M. Kelm, N. Klöcker, H. Makimoto, S. Wintrich Enkel: **Optimized assessment of ventricular vulnerability with a modified programmed electrical stimulation protocol after myocardial ischemia and reperfusion in mice.** Posterbeitrag zur DGK-Herztage 2018; Clin Res Cardiol 107, Suppl 3, October 2018 – Beitrag BS274

L. Clasen, H. Makimoto, S. Wintrich-Enkel, B. Bartsch, **S. Angendoehr**, S. Becher, M. Kelm, C. Meyer, A. Fürnkranz, N. Klöcker: **Ventricular arrhythmogenicity and cardiac autonomic dysfunction after ischemia-reperfusion injury in mice: Posterbeitrag zur DGK-Jahrestagung 2018; Clin Res Cardiol 107 Suppl 1, April 2018 – Beitrag P1074**

A. G. Bejinariu, P. Müller, M. Schilling, C. Blockhaus, **S. Angendoehr**, S. Gerguri, L. Clasen, M. Kurt, J. Schmidt, M. Kelm, A. Fürnkranz, H. Makimoto: **Total atrial conduction time improves the efficacy of stroke prediction in patients without atrial fibrillation:** Vortrag auf der DGK-Jahrestagung 2019; Clin Res Cardiol 108, Suppl 1, April 2019 - Beitrag V1170

## **Veröffentlichungen und Kongressbeiträge**

---

H. Makimoto, M. Höckmann, S. Gerguri, L. Clasen, J. Schmidt, A. Assadi-Schmidt, A. G. Bejinariu, P. Müller, D. Glöckner, **S. Angendoehr**, C. Brinkmeyer, M. Kelm: **Artificial Intelligence Detects Myocardial Infaction ECG more Efficiently than Cardiologists**: Posterbeitrag zur DGK-Herztage 2019; Clin Res Cardiol 108, Suppl 2, October 2019 – Beitrag P186

## **16. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....