

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Kardiologie
der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg

Neuritenwachstum kardialer Neurone unter Hypoxiebedingungen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Daniel Unland
aus Oberhausen

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.11.2020**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Meyer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2 Einleitung	2
2.1 Physiologische Grundlagen.....	2
2.1.1 Aufbau eines Neurons	2
2.1.2 Das periphere autonome Nervensystem.....	4
2.1.3 Sympathikus	7
2.1.4 Parasympathikus	9
2.1.5 Einfluss des autonomen Nervensystems auf die Herzaktion	10
2.1.6. Einfluss des autonomen Nervensystems auf den Herzrhythmus	12
2.1.7 Architektur des kardialen Nervensystems.....	14
2.2 Ganglionäre Nervenzellplexus am Herzen	15
2.2.1 Aufbau und Lage der Ganglienplexus	15
2.2.2 Funktionen der Ganglienplexus	18
2.3 Rolle der Hypoxie in der kardialen Pathophysiologie	23
2.3.1 Pathogenese der Hypoxie.....	23
2.3.2 Pathophysiologische Veränderungen durch Hypoxie.....	23
2.4 Ziel der Arbeit.....	26
3. Material und Methoden.....	27
3.1 Versuchstiere	27
3.2 Herstellung von Paraffinschnitten.....	28
3.3 Histologische Färbungen.....	28
3.4 Immunhistochemische Färbungen	30
3.5 Isolation und Kultur der intrakardialen Neurone	32
3.5.1 Vorbereitungen	32
3.5.2 Präparation des epikardialen Fettgewebes	34
3.5.3 Enzymatische und mechanische Dissoziation der Zellen	35
3.5.4 Ausbringen der Zellen auf Kulturschalen	36
3.5.5 Preplating.....	38
3.6 Morphometrische Charakterisierung des neuronalen Wachstums unter Basisbedingungen	39
3.7 Hypoxie-Modell	40
3.8 Kultivierung atrialer Myozyten	42
3.8.1 Vorbereitung der Kulturflasche.....	43

3.8.2 Etablierung einer Myozytenkultur	43
3.8.3 Subkultivierung / Passagieren der Kultur	44
3.8.4 Kryokonservierung einzelner Kulturpassagen	45
3.9 Kokultur von ICN und atrialen Myozyten	45
3.10 Statistische Auswertung	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Histologische Untersuchung	47
4.2 Immunhistochemische Analyse	51
4.3. Isolation der ICN	56
4.4 Neuritenwachstum der ICN in Monokultur	58
4.5 Einfluss der atrialen Myozyten auf das Neuritenwachstum der ICN	59
4.6 Neuritenwachstum unter Hypoxie in der Monokultur	60
4.7 Einfluss der Hypoxie auf das Neuritenwachstum in der Kokultur	61
4.8 Vergleich der verschiedenen Kulturmethoden	65
5. Diskussion	69
5.1 Histologie der intrakardialen Ganglien	69
5.1.1 Lokalisation der intrakardialen Ganglien am Herzhilum	69
5.1.2 Aufbau und Größe der intrakardialen Ganglien der Maus im Vergleich zu anderen Spezies	70
5.1.3 Die intrakardialen Neurozyten exprimieren TH oder NF	71
5.2 Kultivierung der ICN	73
5.2.1 Voraussetzungen für die Isolation und Kultivierung der ICN	73
5.2.2 Die morphologische Identifizierung der ICN	74
5.3 Die Neuriten der ICN zeigen kein lineares Wachstum	75
5.4. Myozyten stabilisieren das Neuritenwachstum	78
5.5. Hypoxie stimuliert das Neuritenwachstum	81
5.6. Die Freisetzung neurotropher Substanzen durch Myozyten während einer Hypoxie kann einen zusätzlichen Wachstumsreiz darstellen	84
5.7 Klinische Relevanz	86
5.8 Limitationen der Arbeit	88
6. Zusammenfassung	90
7. Abstract	91
8. Abkürzungsverzeichnis	92
9. Literaturverzeichnis	95
10. Abbildungsverzeichnis	111

11. Tabellenverzeichnis.....	112
12. Anhang.....	113
13. Danksagung	119
14. Lebenslauf.....	120
15. Veröffentlichungen	121
16. Eidesstattliche Erklärung.....	122

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das autonome Nervensystem (ANS) ist entscheidend an der funktionellen Steuerung des Herzens beteiligt. Es ist auf kardialer Ebene in ein extrinsisches sowie in ein intrinsisches System unterteilbar (Shen und Zipes, 2014). Letzteres umfasst die intrakardialen Neurone (ICN), die in Ganglienplexus (GPs) im epikardialen Fettgewebe organisiert sind (Armour et al., 1997). Diese GPs wurden zunächst nur als Relaisstation für afferente Signale des zentralen Nervensystems (ZNS) zum Herzen angesehen (Thompson et al., 2000). Die ICN haben in den letzten Jahren durch neue wissenschaftliche Erkenntnisse aber stark an Bedeutung gewonnen (Wake und Brack, 2016). So konnte eine Informationsverarbeitung auf Ebene der ICN nachgewiesen werden (McCallen et al., 2011). Auch bestehen komplexe Vernetzungen der ICN untereinander, mit den ICN anderer GPs sowie übergeordneten, neuronalen Zentren (Fukuda et al., 2015). Die ICN können ferner die kardiale Funktion durch schnelle Reflexbögen regulieren (Armour, 2008). Allerdings können sie durch pathologische Veränderungen auch die Entstehung und Unterhaltung von Arrhythmien begünstigen (Ripplinger et al., 2016). Dies kann beispielsweise im Rahmen einer kardialen Schädigung, zum Beispiel (z. B.) durch Hypoxie und der damit einhergehenden autokrinen Freisetzung von Wachstumsfaktoren geschehen (Singh et al., 2013). Dadurch wird ein Wachstumsreiz für die ICN gesetzt, es kommt zu einem Umbau der neuronalen Struktur (Rajendran et al., 2016). Dies zieht eine veränderte, vor allem (v. a.) sympathisch gesteigerte und parasympathisch verminderte Innervation des Herzens nach sich, welche die Arrhythmieentstehung fördern kann (Chen et al., 2014). Die dabei auftretenden, funktionellen Interaktionen zwischen den ICN und Myozyten sind bisher nicht ausreichend verstanden. Jedoch konnten direkte Verbindungen zwischen Myozyten und ICN sowie deren gegenseitige Beeinflussung bereits nachgewiesen werden (Horackova et al., 1995, Hasan, 2013).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Neuritenwachstum der ICN in Mono- und Kokultur mit atrialen Myozyten unter regulären Bedingungen sowie bei passagerer Hypoxie zu charakterisieren.

Hypothese:

Durch Kokultivierung mit atrialen Myozyten wird das Neuritenwachstum der ICN sowohl unter regulären Bedingungen als auch bei passagerer Hypoxie moduliert.

2 Einleitung

2.1 Physiologische Grundlagen

2.1.1 Aufbau eines Neurons

Neurone (Nervenzellen) sind in der Lage, elektrische Signale (Aktionspotenziale (AP)) aufzunehmen, zu verarbeiten und weiterzuleiten (Lodish H et al., 2000, Purves et al., 2004a). Dabei entstehen elektrische Signale durch unter anderem (u. a.) mechanische, elektrische oder chemische Reizung des Neurons (Luan et al., 2014). Das Signal wird über das Neuron fortgeleitet, mit anderen eingehenden Signalen verarbeitet und zur Überbrückung des örtlichen Abstandes zwischen zwei Neuronen (synaptischer Spalt) in ein aus Botenstoffen (Neurotransmitter) bestehendes chemisches Signal umgewandelt. Diese Neurotransmitter werden am nachgeschalteten Neuron oder Zielorgan in ein AP umgewandelt (Heckmann und Dudel, 2010). Durch diese Funktion der Signalweiterleitung und -verarbeitung sind Neurone essentiell für die Steuerung der Kontraktion einzelner Muskelfasern. Zudem ermöglichen sie die unbewusste Steuerung der Organe (Stiles und Jernigan, 2010).

Neurone sind, unabhängig von ihrer Funktion, ähnlich aufgebaut (siehe (s.) Abbildung 1): Sie besitzen jeweils einen Zellkörper (*Perikaryon*) mit Zellkern (*Nucleus*), baumartig verzweigte Ausläufer (*Dendriten*) sowie einen langen Fortsatz (*Axon*), der am Axonhügel des Neurons entspringt und mehrere Endknöpfchen besitzt (Chen und Haas, 2011, Buffington und Rasband, 2011). Dendriten und Axon können auch als Neuriten (Zellausläufer) zusammengefasst werden (Kandel, 2000). Zusätzlich kann ein Neuron von einer von Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS) beziehungsweise (bzw.) von Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS) gebildeten Myelinscheide umgeben werden, was eine schnellere Erregungsleitung ermöglicht (Zalc, 2006).

Die elektrischen Erregungen der Neurone werden durch Veränderungen der Ionenverteilung innerhalb und außerhalb des Neurons erzeugt (Shih, 1994). Die Verarbeitung der so aufgenommenen Signale erfolgt am Axonhügel durch zeitliche und örtliche Summation, wodurch ein neues Signal generiert wird (Petersson et al., 2011). Dieses wird über das Axon fortgeleitet und an den Verbindungen zwischen

Neuronen (Synapsen) durch Neurotransmitter übertragen (Eccles, 1982, Sakmann, 1992). Dabei kann ein Neuron nicht nur mit einem, sondern mit einer Vielzahl von weiteren Neuronen in synaptischen Kontakt treten (Cullen et al., 2010). Diese komplexe Verschaltung ermöglicht eine ebenso komplexe Signalverarbeitung und -generierung (Hawkins und Ahmad, 2016).

Eine genauere Einteilung der Neurone kann anhand verschiedener Aspekte erfolgen: So werden, nach funktionellen Aspekten, drei Arten von Neuronen unterschieden: Afferente Neurone, die die Information aus der Peripherie (Organe, Umwelt) an das ZNS weiterleiten, sowie die efferenten Neurone, die Erregungen aus dem ZNS zu den Zielstrukturen (Muskeln, Drüsen, et cetera (etc.)) leiten und Interneurone, die nur auf lokaler Ebene agieren.

Anhand der Topographie ist überdies eine Einteilung in zentrale Neurone, die ihren Ursprung in Gehirn und Rückenmark (ZNS) besitzen, sowie periphere Neurone, die im PNS, also außerhalb des ZNS liegen, möglich.

Außerdem kann eine Unterscheidung anhand der innervierten Strukturen erfolgen: So leiten sensorische Neurone durch sensorische Reize (u. a. haptisch, audiovisuell oder durch Dehnung von Muskelfasern) entstandene Signale aus der Peripherie an das ZNS. Hier kann eine Umschaltung auf motorische Neurone (Motorneuron) erfolgen, welche die Muskulatur des Körpers steuern.

Im Gegensatz zu diesen der willkürlichen Kontrolle unterliegenden (somatischen) Neuronen sind die die inneren Organe versorgenden (viszeralen) Neurone nicht willkürlich steuerbar und zählen damit zum autonomen Nervensystem (ANS) (Purves et al., 2004a).

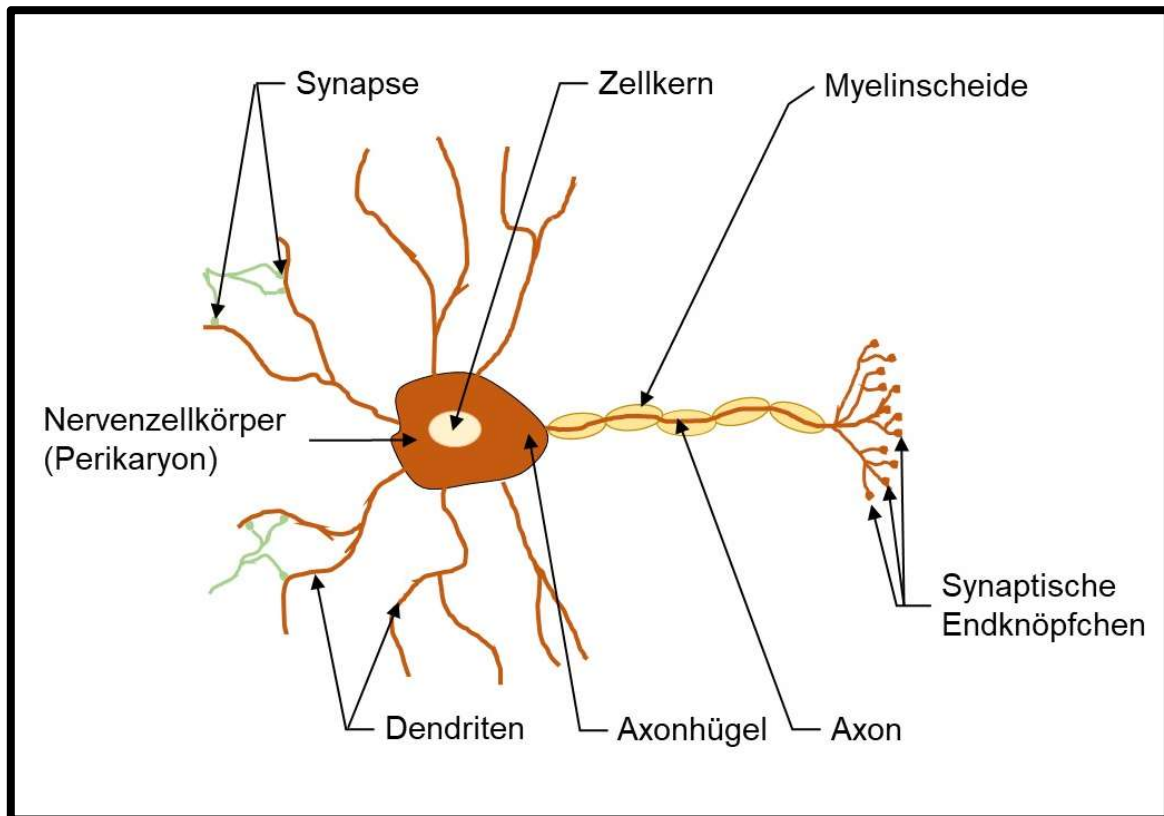


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Neurons

Der Aufbau der Neurone ist, unabhängig von ihrer Funktion, im Wesentlichen vergleichbar: Die Dendriten sind baumartig verzweigte vom Nervenzellkörper ausgehende Fortsätze, über die synaptische Kontakte mit anderen Neuronen gebildet werden. Der Nervenzellkörper besitzt einen Zellkern und einen Axonhügel, an dem das Axon entspringt. Dieses kann von isolierenden Myelinscheiden umgeben werden, wodurch die Erregung schneller fortgeleitet wird. Über chemische Synapsen, die mit Hilfe der synaptischen Endknöpfchen am Ende des Axons gebildet werden, kann die Erregung an andere Neurone weitergeleitet werden. Angelehnt an Kandel (Kandel, 2000).

2.1.2 Das periphere autonome Nervensystem

Das periphere ANS reguliert viszerale Organe, das kardiovaskuläre System sowie die Haut (Wehrwein et al., 2016). Es kann in zwei grundlegende Einheiten unterteilt werden, die sich räumlich und funktionell voneinander unterscheiden: Sympathikus und Parasympathikus (s. Abbildung 2) (Langley, 1921, Furness, 2006).

Die primären Neurone dieses Systems liegen im Hirnstamm bzw. Rückenmark und damit innerhalb des ZNS, die nachgeschalteten, sekundären Neurone befinden sich außerhalb des ZNS, in Ansammlungen von Neuronen, den vegetativen Ganglien. Daran orientiert werden die Neurone in prä- und postganglionär unterteilt (Wehrwein et al., 2016).

Die organbezogenen Systeme des ANS wie die Ganglien und Nervenfasern des enterischen Nervensystems - zahlenmäßig der größte Teil des ANS - werden aufgrund ihrer komplexen Verschaltung und der Unabhängigkeit vom ZNS oft als eigenständiger Teil betrachtet (Furness et al., 2014, Wehrwein et al., 2016).

Diese anatomisch begründete Einteilung fand sich bereits in den ersten Beschreibungen des ANS (Langley, 1921, Kuntz, 1945) und findet auch heute noch grundlegend Anwendung (Wehrwein et al., 2016). Auch am Herzen konnte ein solches, organbezogenes Nervensystem nachgewiesen werden (Armour, 2008, Pauza et al., 2012, Wake und Brack, 2016).

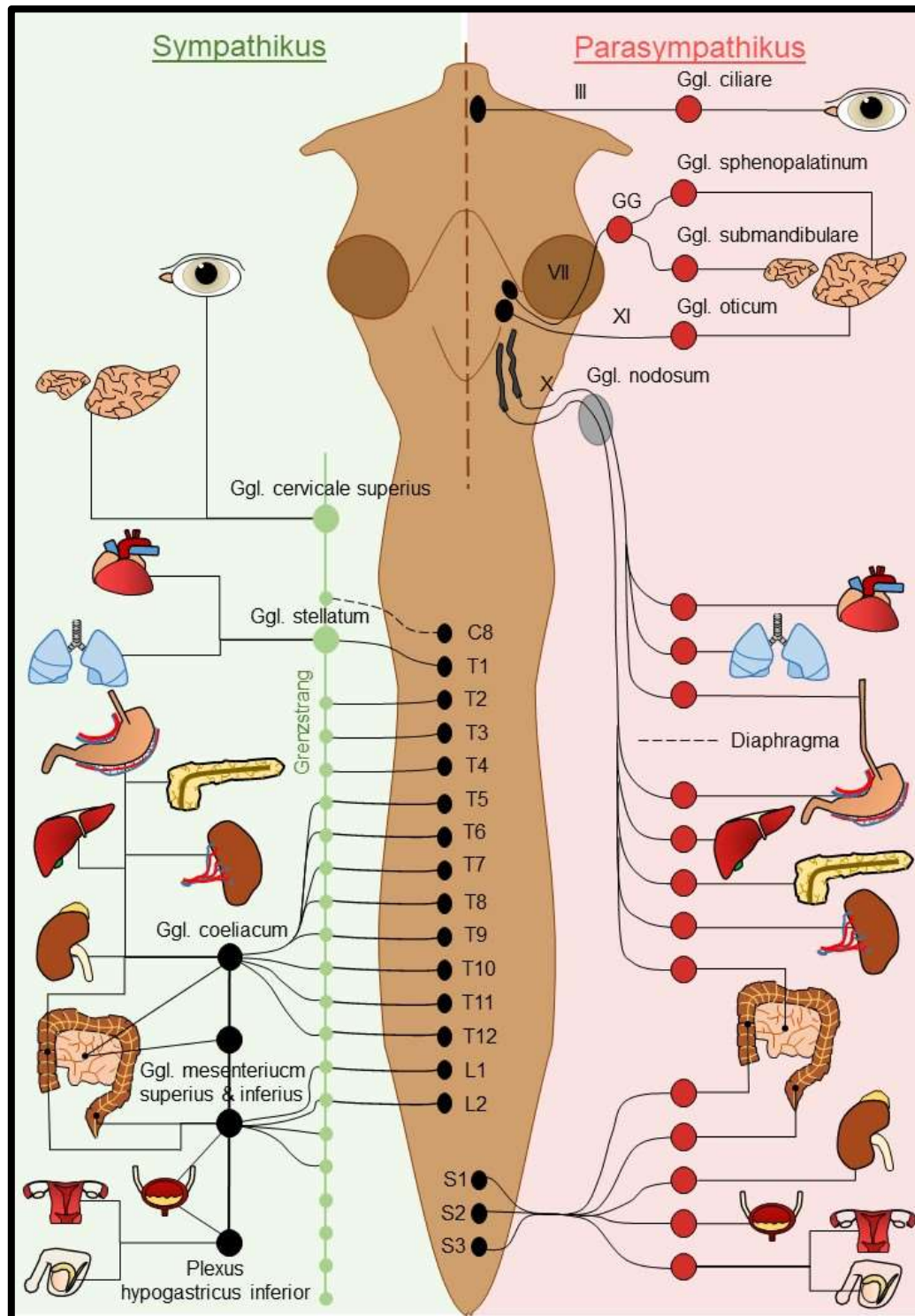


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Organisation des autonomen Nervensystems

Ursprung der parasympathischen Efferenzen (rechte, rote Seite) im Hirnstamm und Sakralmark mit Umschaltung auf das postganglionäre Neuron in den organnahen, vegetativen Ganglien (rot). Die Hirnnerven III, VII, IV und X mitsamt den zugehörigen Ganglien (GG = *Ganglion geniculi*) besitzen parasympathische Anteile. Ursprung der sympathischen Efferenzen (linke, grüne Seite) im Thorakal- und Lumbalmark mit Umschaltung in den organfernen Ganglien des Grenzstrangs (grün) bzw. in den prävertebralen Ganglien (schwarz). Die postganglionären Neurone innervieren die jeweiligen Organe (modifiziert nach Wehrwein et al. (Wehrwein et al., 2016)).

2.1.3 Sympathikus

Durch Aktivierung des Sympathikus wird der Körper in einen „*Fight or Flight*“- Zustand versetzt, also auf eine körperliche Anstrengung vorbereitet (Brown und Fee, 2002, Cole et al., 2015).

Die präganglionären Neurone des Sympathikus sind in der intermediolateralen Säule im thorakalen sowie oberen lumbalen Rückenmark (C8-L2) lokalisiert (thorakolumbales System, s. Abbildung 2) (Wehrwein et al., 2016). Viele dieser Neurone besitzen nur kurze Axone, die als Teil des Spinalnervs zu den nahegelegenen, postganglionären Neuronen in den paravertebral gelegenen Ganglien (Grenzstrang) ziehen (Gibbins, 2013). Es gibt insgesamt 22 bis 23 dieser paravertebralen Ganglien auf jeder Seite der Wirbelsäule sowie ein, die beiden Grenzstränge verbindendes *Ganglion impar* im Sakralbereich (Kommuru et al., 2014). Die postganglionären sympathischen Neurone sind mit mehreren Spinalnerven verbunden (Murata et al., 2003, Macefield, 2011). Sie besitzen lange Axone, über die sie die Zielorgane direkt innervieren (Gordan et al., 2015). Weiterhin können die präganglionären Nervenfasern ohne synaptischen Kontakt den Grenzstrang durchlaufen und zu den näher am Zielorgan liegenden Ganglien ziehen, wo sie auf das postganglionäre Neuron umgeschaltet werden (Purves et al., 2004b). Dies gilt u. a. für die prävertebral gelegenen Bauchganglien (z. B. das *Ganglion mesentericum superius* oder *coeliacum*), über deren postganglionäre Fasern die Innervation der Bauch- bzw. Beckenorgane erfolgt (Fasano und Niel, 2009). Außerdem können die präganglionären Axone auch direkt das Nebennierenmark innervieren, welches als postganglionäres Neuron angesehen werden kann (Parker et al., 1993, Jänig, 2014). Über diese Verbindung wird die Abgabe der Neurotransmitter des Nebennierenmarks in den Blutkreislauf reguliert (Gordan et al., 2015).

Es konnte eine Ordnung der sympathischen Efferenzen bzw. der Zielorgane/ -bereiche anhand des Ursprungssegments nachgewiesen werden (Furness, 2006, Wehrwein et al., 2016): So innervieren die Neurone aus den Segmenten Th1 – Th2 die Drüsen und Gefäße des Kopfes und des Halses sowie die Augen, jene des oberen thorakalen Bereichs die Organe des Halses, wie Trachea, Schilddrüse und Ösophagus. Die im Thorax gelegenen Organe werden ebenso durch Neurone aus den oberen thorakalen Segmenten, die des Bauchraumes durch jene aus den Segmenten Th5 bis Th10 sowie aus tiefen thorakalen Segmenten sympathisch innerviert.

Die Neurone der Segmente Th4 – L2 innervieren die Nebennieren, die der Segmente Th12 – L2 die Beckenorgane. Die obere Extremität wird von Neuronen aus den Segmenten Th2 – Th8, die untere Extremität aus den Segmenten Th12 – L2 versorgt. Das Herz wird von Fasern der Segmente Th1 - Th6 innerviert (Coote und Chauhan, 2016).

Im sympathischen System dient der Übertragung vom präganglionären zum postganglionären Neuron der Transmitter Acetylcholin (ACh) (Jänig, 2006). Das ACh bindet an nikotinerge Rezeptoren der postganglionären Neurone (Li et al., 2009). Diese setzen v. a. den Neurotransmitter Noradrenalin (NA) an den Synapsen frei (Luther et al., 2013), beim Nebennierenmark handelt es sich überwiegend um Adrenalin (Gordan et al., 2015).

Die Wirkung der vom postganglionären Neuron freigesetzten Transmitter ist von den Rezeptoren der Zielorgane abhängig: Über α_1 -Rezeptoren wird eine vasokonstriktorische bzw. kontrahierende Wirkung (Piascik und Perez, 2001), über α_2 -Rezeptoren eine Abnahme des Muskeltonus glatter Muskelzellen, v. a. im Gastrointestinaltrakt vermittelt (Scheibner et al., 2002). Überdies kommt es zu einer Abnahme der Sekretion von Insulin aus dem Pankreas (Fagerholm et al., 2011). Dagegen wird über β_1 -Rezeptoren die Frequenz des Herzens gesteigert sowie dessen Kontraktionskraft erhöht und die Reninfreisetzung in der Niere gefördert (Torretti, 1982, Woo und Xiao, 2012). Eine Erschlaffung der Bronchialmuskulatur und damit Erweiterung der Bronchien wird über β_2 -Rezeptoren gesteuert (Proskocil und Fryer, 2005), wie auch weitere Effekte an anderen Organen (u. a. Leber) und dem Immunsystem (Johnson, 1998, Cole et al., 2015). Schließlich hat eine Aktivierung von β_3 -Rezeptoren im braunen Fettgewebe eine vermehrte Wärmeproduktion zur Folge (Ahles und Engelhardt, 2014). Außerdem wurde in aktuellen Studien ein kardioprotektiver Effekt durch β_3 -Rezeptoraktivierung, v. a. bei herzinsuffizienten Patienten als auch bei medikamentöser Blockade der β_1 - und β_2 -Rezeptoren durch β -Blocker, beschrieben (Cannavo und Koch, 2017, Lucia et al., 2018).

2.1.4 Parasympathikus

Der Parasympathikus dient der Regulation der den Körper regenerierenden Funktionen („*rest and digest*“) (Brown und Fee, 2002, Battipaglia und Lanza, 2015).

Die präganglionären Neurone des Parasympathikus finden sich im Hirnstamm sowie im sakralen Bereich des Rückenmarks (kraniosakrales System), wobei die genaue Höhe in der Literatur variiert (Segmente S2 – S4 bzw. zum Teil (z. T.) auch S1 - S3, siehe auch (s. a.) Abbildung 2) (Krassioukov et al., 2012, Wehrwein et al., 2016). Die Umschaltung der präganglionären auf postganglionäre Neurone findet in vegetativen Ganglien statt, welche in unmittelbarer Nähe zum oder sogar innerhalb des Zielorgans gelegen sind (Partida et al., 2016). Daher besitzt das präganglionäre Neuron ein langes, das postganglionäre Neuron nur ein sehr kurzes Axon (Wehrwein et al., 2016).

Die dem Hirnstamm entspringenden präganglionären Neurone des Parasympathikus entsenden ihre Axone innerhalb von vier Hirnnerven, die Umschaltung auf das postganglionäre Neuron erfolgt hier ebenfalls organnah: Bei diesen Hirnnerven handelt sich um *Nervus oculomotorius* (III) zur Innervation der inneren Augenmuskeln und *Nervus facialis* (VII) zur Innervation der Tränen-, Speicheldrüsen und Schleimhäute der Nasenhöhle. Die Ohrspeicheldrüse wird über den *Nervus glossopharyngeus* (IX) versorgt, die viszerale Organe des Thorax und Abdomens vom *Nervus vagus* (X) (Kalia, 1981, Gibbins, 2013, McDougal und Gamlin, 2015). Letzterer enthält circa 75 % aller parasympathischen Fasern und beeinflusst direkt u. a. die Lunge, die Leber, den Darm und das Herz (Prectl und Powley, 1990, Gordan et al., 2015). Die kaudale Grenze der parasympathischen Versorgung des *Nervus vagus* bildet der Cannon-Böhm-Punkt, der etwa auf Höhe der linken Kolonflexur gelegen ist (Schweighöfer et al., 2016). Unterhalb des Cannon-Böhm-Punktes befindliche Organe wie das Colon descendens, die Harnblase oder die Geschlechtsorgane werden über die parasympathischen Neurone der Rückenmarkssegmente S2 – S4 (bzw. S1 – S3; siehe oben (o..)) versorgt (Krassioukov et al., 2012, Wehrwein et al., 2016). Deren Fasern verlaufen zum Großteil innerhalb der *Nervi splanchnici* und werden ebenso in organnahen vegetativen Ganglien auf postganglionäre Neurone umgeschaltet (Jang et al., 2015, Wehrwein et al., 2016).

Bei der synaptischen Übertragung im parasympathischen System wird ACh sowohl vom präganglionären als auch vom postganglionären Neuron ausgeschüttet (Scott und Fryer, 2012). Die Wirkung des ACh wird, analog zum Sympathikus, bei der Übertragung zwischen den Neuronen über nikotinerge Rezeptoren vermittelt (Bibevski et al., 2000, Tiwari et al., 2013). Dagegen bindet ACh am Erfolgsorgan an muskarinerge Rezeptoren (M-Rezeptoren) (Mccorrey, 2007). Letztere liegen in fünf verschiedenen Formen vor und sind mit G-Proteinen gekoppelt, über die sie ihre Wirkung vermitteln (Haga, 2013). Unter anderem wird v. a. über M₂-Rezeptoren, die Herzaktion im Sinne einer Frequenz- und Kontraktionskraftverringerung sowie einer Verlängerung der atrioventrikulären Überleitungszeit (AV-Überleitungszeit) beeinflusst (Brodde und Michel, 1999, Harvey, 2012).

Die auf diesen räumlichen und funktionellen Unterschieden beruhende Ansicht, Sympathikus und Parasympathikus seien funktionelle Gegenspieler (Meyers, 1959), ist dabei kritisch zu betrachten. Vielmehr wird durch das Zusammenwirken von Sympathikus und Parasympathikus die komplexe Regulation der Organe und des kardiovaskulären Systems der vorherrschenden Situation angepasst (Furness, 2006).

2.1.5 Einfluss des autonomen Nervensystems auf die Herzaktion

Dem Herzen kommt im Blutkreislauf des Körpers die zentrale Rolle als Motor des Blutflusses zu, wodurch über das Blut Sauerstoff und Nährstoffe zur Zelle, Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Abbauprodukte von der Zelle weg transportiert werden können (Pittman, 2016). Um dieser Funktion nachzukommen, muss das Herz in der Lage sein, auch auf die sich verändernden Anforderungen des Körpers sehr rasch zu reagieren (White und Raven, 2014, Abboud und Benson, 2015). Diese Regulation geschieht unbewusst und wird sowohl durch direkte Nervenverbindungen als auch durch zirkulierende Hormone und weitere Reflexbögen vermittelt (s. Tabelle 1) (Armour, 2004, Gordan et al., 2015).

Tabelle 1: Veränderungen der kardialen Parameter durch das autonome Nervensystem

<u>Parameter</u>	<u>Sympathikus</u>	<u>Parasympathikus</u>
Herzfrequenz	↑	↓
Kontraktilität	↑	↓
AV-Knotenüberleitungszeit	↓	↑
Relaxationsfähigkeit	↑	↓
Koronarer Blutfluss	↑	↓
Kardialer Auswurf	↑	↓
Atriale Refraktärzeit	↓	↓
Ventrikuläre Refraktärzeit	↓	↑
Sinusknotenerholungszeit	↓	↑
Aktionspotenzialdauer	↓	↑

↑ = erhöht bzw. verlängert, ↓ = erniedrigt bzw. verkürzt

Sympathikus und Parasympathikus wird traditionell eine gegensätzliche Rolle zugesprochen (Levy et al., 1966). Dies lässt sich besonders gut anhand der unterschiedlichen Wirkung auf Kontraktilität (Inotropie), Frequenz (Chronotropie) und Fortleitungsgeschwindigkeit (Dromotropie) des Herzens feststellen: Durch Stimulation sympathischer Nerven steigt die Herzfrequenz (positiv chronotrop), da die Schrittmacherzellen des Sinusknoten schneller depolarisieren (Ardell et al., 1988, Behar et al., 2016). Ebenso wird die Erregungsausbreitung über den Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) beschleunigt (positiv dromotrop) (Furukawa et al., 1990), als auch die Kontraktilität der Atrien und Ventrikel (positiv inotrop) (Bravený, 2002, Bangash et al., 2012) sowie die Relaxationsfähigkeit der Herzmuskelzellen gesteigert (positiv lusitrop) (Lymeropoulos et al., 2013). Die Zeit, in der die Zellen nach Erregung kein AP auslösen können, wird Refraktärzeit genannt und kann durch sympathische Stimulation in den Ventrikeln und Atrien reduziert werden (Vaseghi und Shivkumar, 2008, Park et al., 2012). Die parasympathisch bedingten Effekte sind gegensätzlich dazu: Die Erregungsbildung im Sinusknoten bzw. Erregungsausbreitung im AV-Knoten ist gemindert (negativ chronotrop bzw. dromotrop) (Chen et al., 1998, Gordan et al., 2015). Auch die Kontraktionskraft der Ventrikel wird herabgesetzt (negativ inotrop) (Tsuboi et al., 2000) – das Fehlen einer Innervation der Ventrikel durch den Parasympathikus wurde lange Zeit angenommen, diese konnte

jedoch in mehreren Studien neuerer Zeit aufgezeigt werden (Coote, 2013, Pauziene et al., 2016, Jungen et al., 2017). Auch die Relaxationsfähigkeit wird durch parasympathischen Einfluss reduziert (negativ lusitrop) (Ardell et al., 2015). Ebenso wird die atriale Refraktärzeit verringert, auf ventrikulärer Ebene kommt es zu einer Zunahme dieser, das Aktionspotenzial ist ebenso verlängert (Shen und Zipes, 2014, Ng, 2016).

2.1.6. Einfluss des autonomen Nervensystems auf den Herzrhythmus

Sympathikus und Parasympathikus zeigen am Herzen einen funktionellen Antagonismus, dennoch handelt es sich um ein Zusammenspiel beider Systeme zur Aufrechterhaltung der Homöostase (Furness, 2006, Abboud und Benson, 2015). Ist dieses Zusammenspiel gestört, kann es zu pathologischen Veränderungen, wie z. B. Vorhofflimmern (VHF) kommen: So kann gleichzeitige Aktivierung des Sympathikus und Parasympathikus zur Auslösung von VHF führen (Park et al., 2012). Als Grund wird eine gestörte Integration des ANS mit Einschränkung der parasympathischen Aktivierungsfähigkeit unter dieser gleichzeitigen Stimulation vermutet (Drexel, 2015).

Unter gleichzeitiger Stimulation wird durch den Sympathikus ein erhöhter Calcium- (Ca^{2+} -)Einstrom in die Zellen generiert (Bers, 2002, Chen et al., 2014), über den Parasympathikus wird die atriale Refraktärzeit herabgesetzt (Wijffels et al., 1995, Xi und Cheng, 2015). Dies zusammen kann zu Nachdepolarisationen (Oszillationen des Membranpotenzials) und dadurch ausgelösten APs bzw. Muskelkontraktionen führen (Heijman et al., 2014), wobei zwischen frühen Nachdepolarisationen (*early afterdepolarizations*) und späten Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarizations*) zu unterscheiden ist. Erstere beruhen meist auf einer gestörten Ionenkanalfunktion mit Verlängerung der AP-Dauer, letztere auf einer Überladung der Zelle mit Calcium (auch durch sympathische Stimulation bedingt) (Gardner et al., 2016, Van Nieuwenhuysse et al., 2017). Besonders häufig kommt es im Bereich der Pulmonalvenen zu VHF, da dort eine kürzere AP-Dauer mit einem höheren Risiko für Nachdepolarisationen vorherrscht (Patterson et al., 2006, Mahida et al., 2015). Die autonome Fehlregulation als Auslöser des VHF könnte erklären, warum mittels Katheterablation der atrialen Ganglienplexus einem erneuten Auftreten des VHF vorgebeugt werden kann (Calo et al., 2012, Katritsis und Katritsis, 2014). Allerdings kann

eine vago-sympathische Stimulation auch eine Präventionsmöglichkeit gegenüber VHF darstellen (Sheng et al., 2011).

Auf ventrikulärer Ebene verhält es sich dagegen anders: So wirkt der Sympathikus durch Veränderungen der Repolarisation des Herzens und Herabsetzen der Reizschwelle für Kammerflimmern dort proarrhythmisch (Zipes und Rubart, 2006, Shen und Zipes, 2014). Vor allem unter hypoxischen Bedingungen bzw. einer kardialen Ischämie ist dabei das Risiko für Arrhythmien erhöht (Mehra und Redline, 2014, Hall et al., 2016). Dies beruht auf dem durch die Hypoxie hervorgerufenen Axonwachstum und der dadurch veränderten, erhöhten sympathischen Innervation (Li und Li, 2015, Rajendran et al., 2016) sowie dem zellulären Umbau nach Ischämie (Xie et al., 2013, Heusch et al., 2014). Der Parasympathikus dagegen hat auf ventrikulärer Ebene einen antiarrhythmischen Effekt, vermittelt über eine Reduktion der Herzfrequenz, Verlängerung der AP-Dauer (Zhao et al., 2012, Yamakawa et al., 2015) und durch zum Sympathikus antagonistische Effekte (Brack et al., 2013). Zusätzlich scheint der anti-inflammatorische Einfluss des Parasympathikus die Entstehungswahrscheinlichkeit von Arrhythmien zu verringern (Tracey, 2002, Huang et al., 2015). Dies könnte bei Entzündungen des Herzens wie der Myokarditis oder post-infarziell und der in diesem Status erhöhten Anfälligkeit für Arrhythmien von Relevanz sein (Corrado et al., 2001, Francis Stuart et al., 2016).

2.1.7 Architektur des kardialen Nervensystems

Die neuronale kardiale Innervation unterliegt einer hierarchisch geordneten Kontrolle (s. Abbildung 3): Vereinfacht ist diese aufgeteilt in drei zusammenspielende Kontrollebenen, bestehend aus dem ZNS, den intrathorakalen extrakardialen sowie den intrinsischen kardialen Ganglien (intrakardiale Ganglien) (Armour, 2004, Beaumont et al., 2013).

Die Afferenzen des Herzens werden über afferente Neurone innerhalb der intrakardialen Ganglien auf lokale Interneurone umgeschaltet (Armour, 2008). Über die Interneurone können sowohl die efferenten sympathischen Neurone (ESN), als auch die efferenten parasympathischen Neurone (EPN) angesteuert werden, welche efferent zum Herzen projizieren (Armour, 2008). Gleichzeitig erhalten die Interneurone Efferenzen aus der *Medulla oblongata* und von den ESN der intrathorakalen Ganglien (Foreman et al., 2000, Fukuda et al., 2015). Letztere besitzen auch direkte Verbindungen zum Herzen (Armour, 2008).

Weiterhin gelangen Signale des Herzens über afferente Neurone der intrathorakalen Ganglien zu den lokalen Interneuronen bzw. direkt zu den ESN des intrathorakalen Systems (Armour und Hopkins, 1990, Ardell et al., 2016). Außerdem finden sich kardiale Afferenzen über die afferenten Neurone der Spinalganglien bzw. des *Ganglion nodosum* zum ZNS (Fukuda et al., 2015). Dabei sind Rückenmark, *Medulla oblongata* und höhere Zentren des ZNS sowohl afferent als auch efferent miteinander verbunden (Gray et al., 2007, Foreman et al., 2015). Durch efferente Projektionen vom ZNS sowohl auf die lokalen Interneurone als auch direkt auf sympathisch und parasympathisch efferente Neurone der beiden Ganglienregionen kann die Herzaktion kontrolliert werden (Southerland et al., 2012, Beaumont et al., 2013). Ein Informationsfluss in Richtung des ZNS ist über afferente Projektionen der lokalen Interneurone des intrathorakalen Systems zum Rückenmark möglich (Ardell et al., 2016). Die enge Verknüpfung des Herzens mit dem ZNS zeigt sich auch dadurch, dass neuronale Erkrankungen bzw. Schäden (z. B.: ein Apoplex) sich unmittelbar auf die Herzaktion auswirken können (Tahsili-Fahadan und Geocadin, 2017).

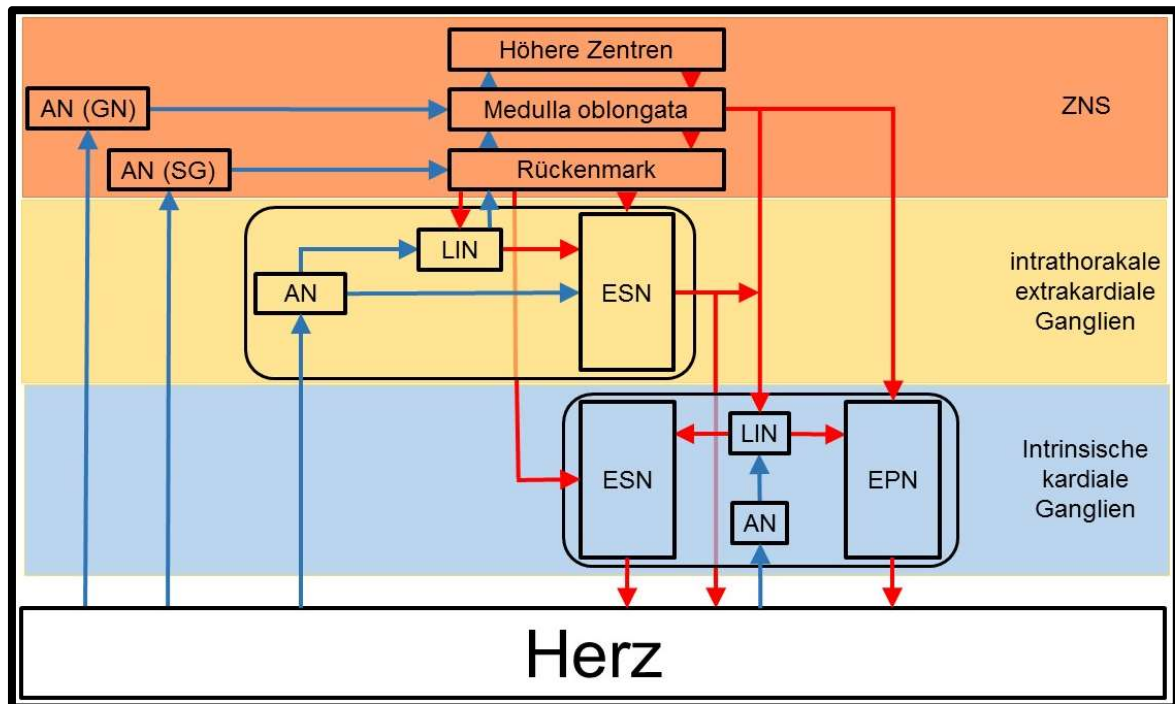


Abbildung 3: Neuronale Hierarchie der kardialen Innervation

Schematische Darstellung der neuronalen Verschaltungen von ZNS, thorakalen und kardialen Ganglien zur Innervation des Herzens (modifiziert nach Fukuda et al. und Ardell et al. (Fukuda et al., 2015, Ardell et al., 2016)). Die Afferenzen des Herzens (blaue Pfeile) werden über afferente Neurone (AN) des *Ganglion spinale* (SG) an das Rückenmark bzw. des *Ganglion nodosum* (GN) an die *Medulla oblongata* geleitet. Diese Informationen werden auf Ebene des ZNS verarbeitet. Darüber hinaus verlaufen afferente Nerven des Herzens zu den AN der intrinsischen kardialen (ICG) und intrathorakalen, extrakardialen Ganglien (IEG). Über die lokalen Interneurone (LIN) bestehen Verbindungen zu den efferenten sympathischen Neuronen (ESN) dieser Ganglien, auf Ebene der ICG auch zu den efferenten parasympathischen Neuronen (EPN). Die EPN und ESN beeinflussen die Herzaktion über efferente Verbindungen zum Herzen (rote Pfeile). Gleichzeitig unterliegen sie der Kontrolle der höheren Zentren, entweder über eine vorherige Umschaltung über die LIN oder über direkte efferente Verbindungen. Die LIN der ICG sind in diesem Modell das zentrale Integrationszentrum sowohl der Afferenzen des Herzens als auch der Efferenzen des ZNS und der IEG.

2.2 Ganglionäre Nervenzellplexus am Herzen

2.2.1 Aufbau und Lage der Ganglienplexus

Die intrinsischen kardialen Ganglien (ICG) sind in Gruppen, als sog. *Plexus*, organisiert, die sich im epikardialen Fettgewebe befinden (Wake und Brack, 2016). Die ICG sind über zwischengeschaltete Nerven und Ganglien miteinander verbunden (Armour et al., 1997), ferner bestehen Verbindungen zwischen den Neuronen eines Ganglions über Interneurone, auch *local circuit neurons* genannt (Armour, 1994). Es wurden unterschiedliche Angaben bezüglich der genauen Anzahl der GPs im

menschlichen Herzen gemacht: Pauza et al. wiesen dabei sieben Plexus nach (Pauza et al., 2000), Armour et al. unterschieden insgesamt fünf atrial und fünf ventrikulär gelegene Plexus mit möglichen Übergängen zwischen diesen (Armour et al., 1997). Diese umfassen die von Pauza et al. beschriebenen Plexus (s. Abbildung 4): Auf Höhe der Atrien finden sich der superiore rechtsatriale GP (RAGP), der dem kranialen, posterioren Anteil des rechten Atriums anliegt. Der posteriore rechtsatriale GP (RIGP) ist dagegen kaudo-medialer, am *Sulcus interatrialis* zu finden. Zwischen dem posterioren Anteil des linken Atriums und den Pulmonalvenen liegt der superiore linksatriale GP (LSGP), weiter medial der posteromediale linksatriale GP (PMLAGP). An der postero-lateralen Seite des linken Atriums, oberhalb des *Sulcus coronarius*, liegt der posterolaterale linksatriale GP (PLLAGP). RIGP und LSGP werden durch ihre Verbindung auf Höhe des *Septum interatriale* auch als septum-interatrialer-Ganglienplexus bezeichnet (s. Abbildung 4) (Armour et al., 1997).

Die Bezeichnungen der ventrikulären GPs sind in Relation ihrer Lage zu den Gefäßen gewählt. So liegt der Aortenwurzel-Ganglienplexus (AR-GP) im Fettgewebe um die Aortenwurzel, der anteriore absteigende Ganglienplexus (AD-GP) in unmittelbarer Nähe zur Wurzel des *Ramus interventricularis anterior* RIVA der linken Koronararterie. Der posteriore absteigende Ganglienplexus (PD-GP) ist nahe dem Ursprung des *Ramus interventricularis posterior* (RIVP) der rechten Koronararterie lokalisiert. Zuletzt finden sich, benachbart zur Wurzel des *Ramus marginalis dexter* der rechten Koronararterie, der rechts-marginale Ganglienplexus (RAM-GP) sowie der links-marginale Ganglienplexus (OM-GP) am *Ramus marginalis sinister* (Armour et al., 1997).

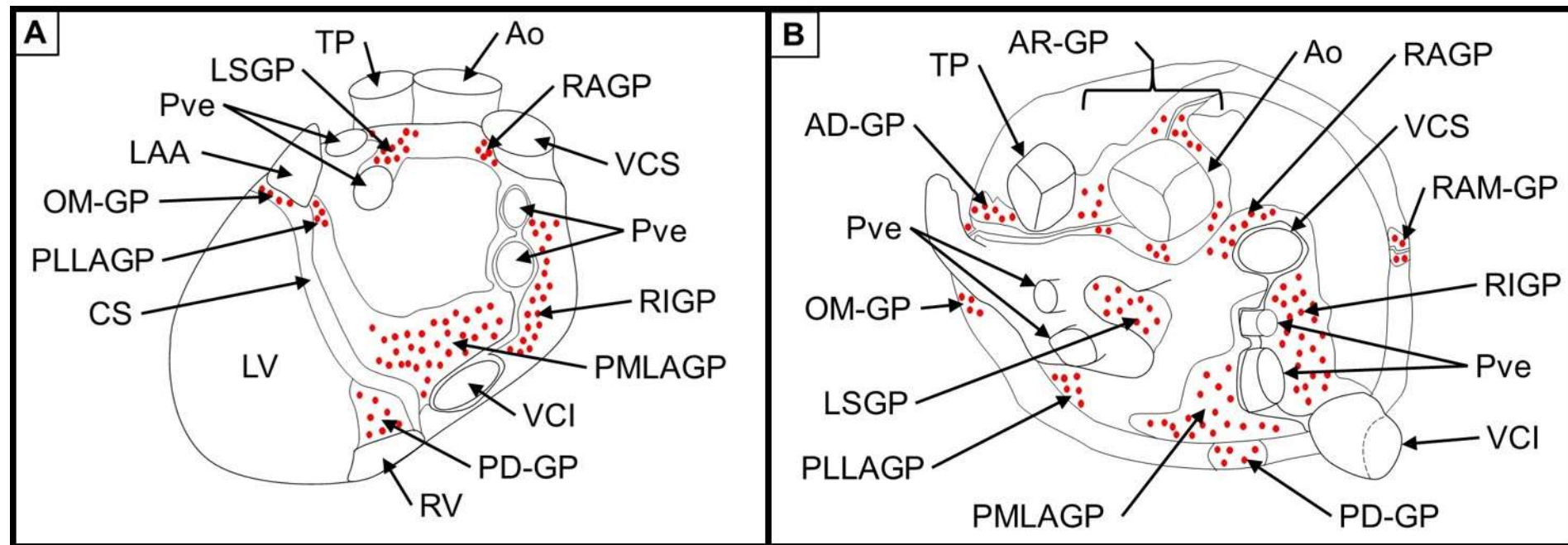


Abbildung 4: Topographische Übersicht über die Ganglienplexus des menschlichen Herzens

Schematische Darstellung der Lage der epikardialen Ganglienplexus des menschlichen Herzens in der Ansicht von dorsal (A) und von kranial (B). Die intrakardialen Ganglien (rote Punkte) sind in atrialen und ventrikulären Plexus organisiert.

AD-GP: anteriorer absteigender Ganglienplexus, Ao: Aorta, AR-GP: Aortenwurzel-Ganglienplexus, CS: *Sulcus coronarius*, LAA: linkes Herzohr, LSGP: superiorer linksatrialer Ganglienplexus, LV: linker Ventrikel, OM-GP: links-marginaler Ganglienplexus, PD-GP: posteriorer absteigender Ganglienplexus, PLLAGP: posterolateraler linksatrialer Ganglienplexus, PMLAGP: posteromedialer linksatrialer Ganglienplexus, Pve: Pulmonalvenen, RAGP: superiorer rechtsatrialer Ganglienplexus, RAM-GP: rechts-marginaler Ganglienplexus, RIPG: posteriorer rechtsatrialer Ganglienplexus, RV: rechter Ventrikel, TP: *Truncus pulmonalis*, VCI: *Vena cava inferior*, VCS: *Vena cava superior*

(modifiziert nach Armour et al. (Armour et al., 1997), Abkürzungen entsprechend der gängigen englischen Nomenklatur).

Die Nervenfasern des extrinsischen Anteils der autonomen kardialen Innervation gelangen über die zwei Seiten des Herzhilums zu ihren Zielstrukturen im Herzen (Pauza et al., 1997a). Dabei erreichen die Nervenfasern der atrialen Seite des Herzhilums (das heisst (d. h.) im Bereich der *Aorta ascendens* und des *Truncus pulmonalis*) v. a. die Ventrikel des Herzens, die Nervenfasern der venösen Seite (d. h. im Umfeld der *Venae cavae* und der Pulmonalvenen) dagegen zusätzlich auch die Atrien des Herzens (Pauza et al., 2000).

Die Nervenfasern verlaufen auf sieben differenzierbaren Routen innerhalb des Epikards und können auch die am Herzhilum lokalisierten Ganglien erreichen, meist nachdem sie sich aufgezweigt haben: Die vom arteriellen Teil des Herzhilums kommenden Nerven verlaufen dabei entlang des *Sulcus coronarius*, jeweils rechts- bzw. linksseitig. Die am venösen Teil des Herzhilums verlaufenden Nerven dagegen ziehen entlang des *Sulcus interatrialis anterior* und des zwischen *Vena cava superior* und rechter oberer Pulmonalvene gelegenen Sulcus zum rechten Atrium. Ein weiterer Weg führt über die linksatriale Nervenrinne zur lateralen Seite des linken Atriums. Zum linken Ventrikel und Atrium ziehen die Nerven über die ventrale sowie dorsale Oberfläche des linken Atriums. Diese so verlaufenden Nerven sind dabei durch ihre geringere Dicke von denen zu unterscheiden, die aus den epikardialen Ganglien ziehen und direkt das Myokard durchdringen, um ihre Zielstrukturen zu erreichen. Erstere sind daher präganglionäre, letztere postganglionäre Nervenfasern zu bezeichnen (Pauza et al., 2000).

2.2.2 Funktionen der Ganglienplexus

Die intrakardialen GPs sind an der Verarbeitung von Informationen der intrathorakalen Ganglien, des ZNS sowie des Herzens selbst beteiligt und dadurch von (patho-)physiologischer Bedeutung (Armour, 2008, Wake und Brack, 2016). Wurden sie zunächst als „Relaisstation“ parasympathischer Innervation verstanden und ihnen daher ein rein parasympathischer Charakter zugeschrieben (Randall, 2000), so ist heute klar, dass sie u. a. an der Regulation der Herzfrequenz, der AV-Knoten-Überleitungszeit und der -refraktärzeit beteiligt sind (Randall et al., 2003, Hou et al., 2007a). Zudem enthalten sie sowohl parasympathische als auch sympathische Nervenfasern (Rysevaite et al., 2011b).

Die in den Ganglien gelegenen ICN scheinen an der Ausführung von Reflexen mit einer sehr kurzen Latenz (bis zu 40 Millisekunden) beteiligt zu sein, wodurch die kardialen Parameter wie Auswurf und Herzfrequenz schlaggenau gesteuert werden können (Armour, 2008). Dadurch sind die ICN in der Lage, auch ohne den Einfluss des ZNS oder der intrathorakalen Ganglien, die Herzaktion suffizient zu koordinieren und elektrische Stabilität zu gewährleisten (Armour, 2008, Fukuda et al., 2015). Eine autarke Regulation der kardialen Parameter durch ICN wird sogar bei vollständiger Dezentralisation vermutet (Ardell et al., 1991), wie z. B. im Rahmen von Langendorff-Versuchen (Allen et al., 2018).

Den Großteil der ICN stellen die Interneurone dar, welche sowohl Neurone eines einzelnen Ganglions, als auch solche verschiedener Ganglien miteinander verbinden (Beaumont et al., 2013). Somit besteht die Möglichkeit zur Kommunikation und Beeinflussung der Ganglien untereinander über ein dichtes neuronales Netzwerk (Lee et al., 2018). Durch dieses sind ICN größerer GPs in der Lage, mechanische und elektrische Aktionen jeder Herzkammer zu steuern, selbst dann, wenn keine direkte Innervation zu der entsprechenden Herzregionen besteht (Armour, 2004, Liao et al., 2015). Aber es konnte auch gezeigt werden, dass einzelne GPs unabhängig und selektiv die Herzaktion beeinflussen (Allen et al., 2018). Durch die enge Vernetzung der GPs kann ein möglicher Ausfall einzelner Neuronengruppen ohne Steuerungsverlust kompensiert werden (Armour, 2008).

Feine Kommissurfasern, die die Ganglien bzw. GPs untereinander verbinden, weisen ebenfalls auf eine Kommunikation der Ganglien bzw. Nervenzellen untereinander hin (Wake und Brack, 2016). Diese Kommissurfasern befinden sich u. a. am Herzhilum, benachbart zu den dort verlaufenden Venen, als auch am *Conus arteriosus* (Übergang von rechter Herzkammer in den *Truncus pulmonalis*) (Rysevaite et al., 2011a, Saburkina et al., 2014). Die Annahme einer Verbindung der GPs untereinander wurde durch verschiedene funktionelle Beobachtungen bestärkt: So konnte eine Kommunikation zwischen dem RAGP und dem LSGP zur Modifikation der Sinusknotenfunktion, als auch eine Veränderung letzterer durch Stimulation dieser GPs aufgezeigt werden (Hou et al., 2007b, Liao et al., 2015). Weitere Untersuchung zeigten, dass der LSGP sowohl über direkte Verbindungen zum RAGP und Sinusknoten verfügt, aber auch eine Verbindung zum GP um die *Aorta* bzw. *Vena cava superior* besitzt, über die ebenfalls der Sinusknoten beeinflusst werden kann (Moss

et al., 2013). Ähnliche Netzwerke der GPs zeigten sich auch in Bezug auf den AV-Knoten: Dabei werden die Effekte anderer GPs auf die AV-Knotenfunktion durch Ablation des rechten unteren Ganglienplexus (RLGP) aufgehoben. Werden dagegen andere GPs durch Ablation ausgeschaltet, der RLGP aber nicht, kann der AV-Knoten weiterhin moduliert werden (Malcolme-Lawes et al., 2016). Der RLGP dient daher als Knotenpunkt der AV-Knotenmodulation und steht in Kommunikation mit anderen GPs. Neuere Visualisierungs- und Stimulationsmethoden (wie z. B. *tissue-clearing* und optogenetische Stimulation) ermöglichen die Identifikation weiterer funktioneller Verbindungen zwischen Ganglien und die Herzaktion koordinierenden Strukturen: So wurde z. B. in Mäusen im Bereich der inferioren Pulmonalvenen ein Ganglion entdeckt, welches eine Verbindung zum Sinusknoten aufweist und durch dessen Stimulation die Herzfrequenz erniedrigt wird (Rajendran et al., 2018).

Neben der so durch die ICN gewährleisteten schnellen Regulationsebene scheinen die medullären und spinalen Neurone für eine Regulation mit langer Latenz verantwortlich zu sein, die intrathorakal gelegenen Ganglien für solche mit mittlerer Latenz (Armour, 2008). Die Signale dieser neuronalen Ebenen werden in den intrakardialen GPs moduliert und mit denen des intrakardialen Systems zusammengeschlossen (Hou et al., 2007a). Weitere Regulierungsebenen des kardiovaskulären Systems spielen sich auf der neurohumoralen Ebene ab, z. B. durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System oder das atriale natriuretische Peptid (Middlekauff und Mark, 1998, Zucker et al., 2012).

Das so aufgebaute System aus verschiedenen Regulationsebenen gewährleistet eine große Flexibilität: Dabei ermöglicht die lokale Interaktion der ICN untereinander über Interneurone zusammen mit den Einflüssen der übergeordneten Zentren eine effektive, reflexartige Modulation elektrischer und mechanischer Herzparameter (Beaumont et al., 2013). Gleichzeitig ist aber auch die Beeinflussung dieser Parameter durch höhere Zentren über die efferenten Verbindungen zu den intrathorakalen und intrakardialen Ganglien gesichert (Beaumont et al., 2013): Die afferenten Signale verschiedener Rezeptoren (z. B. der Chemo- und Druckrezeptoren der *Glomerula aortica* und des *Glomerulum caroticum*), der Niere, der Muskulatur und anderer Strukturen, die keine direkte Verbindung zum Herzen besitzen, werden zentral verarbeitet (Ardell et al., 2016). Über die efferenten Projektionen des ZNS zum Herzen kann die kardiale Funktion entsprechend dieser Signale (z. B. bei körperlicher

Aktivität oder Hypoxie) moduliert werden (Ardell et al., 2016). Diese Anpassung der kardialen Leistung an extrakardiale Anforderungen (auch psychologischer Faktoren (De Morree et al., 2013)) über die Integration der Signale im ZNS dient der Homöostase (Dampney, 2016). Dies zeigt sich auch am Beispiel der Lunge: So steht das Atemminutenvolumen in sehr enger, wechselseitiger Beziehung zum kardialen Auswurf, was u. a. durch präganglionäre vagale Neurone reguliert wird (Spyer, 1994). Diese Regulation kann jedoch, z. B. durch den Tauchreflex, unterbrochen werden (Michael Panneton, 2013). Bei pathologischen Veränderungen des ZNS (z. B. bei einem Apoplex) kann es aufgrund der veränderten Signalintegration ebenfalls zu pathologischen Veränderungen der Herzfunktion, wie etwa Arrhythmien oder plötzlichem Herztod, kommen (Taggart et al., 2016). So kann etwa im Rahmen einer Epilepsie durch einen anhaltenden, nicht-selbstlimitierenden Anfall zunächst eine leichte, dann eine moderate bis schwere Hypoxie (auch am Herzen selbst) ausgelöst werden, woraus wiederum ein Kammerflimmern resultieren kann (Stewart, 2018).

Für einige intrakardiale Ganglien ließen sich bereits Effekte auf spezifische Bereiche des Herzens und damit auf die Herzaktion charakterisieren: So haben etwa die ICG im Bereich der Pulmonalvenen einen regulierenden Einfluss auf den Sinusknoten (Zarzoso et al., 2013). Bei Ablation von RIGP, LSGP und RAGP konnte eine Verlangsamung des Sinusrhythmus, der ventrikulären Schlagfrequenz sowie der AV-Überleitungszeit beobachtet werden (Hou et al., 2007a). Damit einhergehend kann die Herzfrequenz auch durch chemische Stimulation (Nikotin, Atropin, Metoprolol) v. a. des RAGP beeinflusst werden (Brack, 2015). Auch konnte durch hochfrequente Stimulation in direkter Umgebung des Sinusknoten eine Sinustachykardie ausgelöst und somit der Einfluss der dort gelegenen intrakardialen Nervenfasern auf den Sinusknoten nachgewiesen werden (Eickholt et al., 2013). Ferner wurde gezeigt, dass selektiv intrakardiale Nervenfasern auf Höhe des *Sulcus coronarius* via Katheter stimuliert werden können und dadurch die Kontraktilität des linken Ventrikels steigt, ohne aber den rechten Ventrikel oder den Gefäßtonus zu beeinflussen (Meyer et al., 2010). Eine solche Verbindung zwischen atrialen ICN und den Ventrikeln wurde sowohl auf funktioneller Ebene als auch morphologisch nachgewiesen (Jungen et al., 2017).

Überdies spielen ICN in der Pathophysiologie rhythmologischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle, z. B. bei VHF: dieses wird häufig durch die gemeinsame Aktivität der höheren Zentren und der ICN ausgelöst, allerdings kann dies auch allein durch die ICN geschehen (Shen und Zipes, 2014). Wird die Verbindung zwischen ICN und höheren Zentren z. B. durch Ablation der Nervenverbindung getrennt, ist sogar eine erhöhte Rate an VHF beobachtbar, die nur auf die ICN zurückführbar ist (Lo et al., 2013).

Die Katheterablation stellt eine wichtige Möglichkeit zur Therapie des symptomatischen Vorhofflimmerns, alternativ zu oder bei unzureichendem Erfolg einer medikamentösen antiarrhythmischen Therapie, dar (Xu et al., 2016). Dabei werden mit Hilfe eines Katheters, offen operativ oder in einer Hybrid-Variante dieser Verfahren (Driver und Mangrum, 2015) unter Anwendung verschiedener Energieformen (Radiofrequenzstrom, Kälte, Laser) Lungenvenen und linker Vorhof elektrisch voneinander isoliert (Pulmonalvenenisolation, PVI) (Mujović et al., 2017). Weitere, das VHF auslösende Areale im Bereich der Vorhöfe können zusätzlich ablatiert werden (Kirchhof und Calkins, 2017). Im Rahmen dieser Ablationsverfahren lassen sich regelmäßig durch das autonome Nervensystem vermittelte Effekte beobachten, so z. B. Sinusbradykardien bis hin zum Sinusarrest (mit Schrittmacherindikation) (Killu et al., 2016). Wahrscheinlich sind diese Effekt durch Stimulation der ICN ausgelöst (Hu et al., 2014).

Eine gezielte Modulation der ICN zur Therapie des VHF wurde bereits von mehreren Gruppen untersucht (Pokushalov et al., 2009, Choi et al., 2017) und scheint einen positiven Einfluss auf die VHF-Freiheit zu haben. In Kombination mit der PVI kann sogar eine deutlich höhere Rate an VHF-Freiheit erreicht werden als mit der PVI allein (Turov et al., 2010, Kampaktsis et al., 2017). Allerdings wurden auch proarrhythmische Effekte nach Ablation der ICN wie der Anstieg der Herzfrequenz (Schauerte et al., 2001), eine erhöhte Anfälligkeit für atriale (Lo et al., 2013, Mao et al., 2014) sowie ventrikuläre Extrasystolen und Arrhythmien beobachtet (Osman et al., 2010, Jungen et al., 2017). Letztere werden auf ein Ungleichgewicht der autonomen Innervation der Ventrikel zugunsten des Sympathikus nach Ablation der v. a. parasympathischen ICN im Bereich der Vorhöfe zurückgeführt (He et al., 2013). Die so entstehende sympathische Hyperinnervation der Ventrikel kann zu einem

Umbau der neuronalen Struktur des Herzens mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eines plötzlichen Herztodes führen (Fukuda et al., 2015).

2.3 Rolle der Hypoxie in der kardialen Pathophysiologie

2.3.1 Pathogenese der Hypoxie

Wenn der Sauerstoffbedarf des Herzens das vorhandene Angebot übersteigt, spricht man von einer Hypoxie (Banchero, 1987). Diese kann z. B. bei inadäquater Koronarperfusion im Rahmen von Gefäßspasmen, koronarer Herzerkrankung (KHK) oder beim Myokardinfarkt (MI) auftreten (Remme, 2000, Hung et al., 2014). Letzterer lässt sich in insgesamt fünf Typen unterteilen, wobei der Zelltod durch eine anhaltende Ischämie als Definition grundlegend ist (Thygesen et al., 2018). Die weitere Einteilung richtet sich nach der Ursache der Hypoxie, auch iatrogen bedingte Hypoxie wird berücksichtigt (Thygesen et al., 2018).

Darüber hinaus gibt es nicht-kardiale Erkrankungen, die eine Hypoxie bedingen können: Sepsis, Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Obstruktives Schlafapnoesyndrom (OSAS), chronisches Nierenversagen (CKD), u. a. (Ferreira et al., 2015). Die Hypoxie beruht dabei auf einer verminderten Oxygenierung des Blutes (COPD, OSAS) (Macnee et al., 2008, Dewan et al., 2015) bzw. auf einer Anämie durch erniedrigte Produktion von Erythropoetin (CKD) (Kazory und Ross, 2009). Im Falle einer Sepsis ist die Hypoxie auf die Kombination aus Minderperfusion des Gewebes, erniedrigtem Sauerstoffgehalt des Blutes sowie auf eine Mitochondrienstörung durch Zytokine zurückzuführen (Loiacono und Shapiro, 2010, Farmakis et al., 2014).

2.3.2 Pathophysiologische Veränderungen durch Hypoxie

Eine typische Folge der kardialen Hypoxie stellt das Vorhofflimmern dar: So wurde bereits zu Beginn der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von (atrialen) Arrhythmien und einer Hypoxie entdeckt (James, 1961). Dieser Zusammenhang wurde in weiteren Untersuchungen bekräftigt (Gramley et al., 2010, Lu et al., 2013). Auch nach kardiochirurgischen Eingriffen, wie einem koronaren Bypass, traten bei vielen Patienten Vorhofflimmern auf (Frost

et al., 1992). Dies kann auf die Ischämie und Reperfusion respektive (resp.) die Hypoxie und Reoxygenierung des Gewebes zurückgeführt werden (Lin et al., 2012). Auch bei intermittierender Hypoxie, wie etwa im Rahmen des OSAS, steigt das Risiko für Arrhythmien (Zhang et al., 2015).

Die grundlegenden Veränderungen durch die Hypoxie sind wie folgt: Wird myokardiales Gewebe einer Hypoxie ausgesetzt, kommt es zu einem erhöhten Austritt von Kalium (K^+) aus der Zelle, um einen Einstrom von Kationen, vornehmlich Natrium (Na^+), auszugleichen (Remme und Wilde, 2000). Die Umverteilung des K^+ wird zusätzlich durch sinkende Konzentrationen von Adenosintriphosphat (ATP) (siehe unten (s. u.)) innerhalb der Zellen durch Öffnung eines ATP-sensitiven K^+ -Kanals gefördert. Die der Hypoxie ausgesetzten Zellen depolarisieren, u. a. durch diese veränderte K^+ -Verteilung (Ghuran und Camm, 2001).

Da die Zellen durch fehlende Sauerstoffzufuhr auf eine anaerobe Energiegewinnung angewiesen sind und es folglich zur ATP-Hydrolyse kommt, fallen Protonen (H^+) und Laktat im extrazellulären Kompartiment an. Es kommt ferner zu einer Freisetzung von Katecholaminen und einem Anstieg der CO_2 -Konzentration innerhalb der Zelle. Daneben steigt intrazellulär die Konzentration von Na^+ , Ca^{2+} , Magnesium und zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) bei inaktivierten ATP-abhängigen Ionenpumpen an (Kalogeris et al., 2012). Der pH-Wert fällt dadurch intrazellulär ab, es entsteht eine Azidose. Aus diesen Veränderungen resultieren auch veränderte Ionenströme über die Zellmembran, was die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle an sich und des Zellverbandes verändert: Es kommt zu einer Abnahme der Überleitungsgeschwindigkeit der Zellen, auch die Dauer des APs ist verkürzt. Im weiteren Verlauf der Hypoxie kommt es zu einer Abnahme der Amplitude des APs und zu einer veränderten Refraktärzeit der Zellen (Corr und Yamada, 1995, Shimoda und Polak, 2011).

Es entstehen durch die besonders gegenüber der AP-Verkürzung sensiblen, epikardialen Zellen regional unterschiedlich lange APs. Dies kann letztlich zu kreisender Erregung führen. Zusätzlich kann es zu einer abnormen Erregbarkeit kommen, d. h. auch Nicht-Schrittmacherzellen können eine elektrische Spontanaktivität aufweisen (Remme und Wilde, 2000). Diese Veränderungen zeigen sich nicht alle gleichzeitig unmittelbar nach Auftreten der Hypoxie, jedoch ist mit zunehmender Hypoxiedauer mit ihrem Auftreten zu rechnen (Ghuran und Camm, 2001).

Durch das hypoxiebedingte Absinken des intrazellulären pHs durch Protonen wird über den $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher vermehrt Na^+ in die Zelle gebracht, welches über den $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher wieder nach extrazellulär transportiert wird. Dadurch kann es zu einer Akkumulation von Ca^{2+} in der Zelle kommen, was zu einer Auslösung von verzögerten Nachdepolarisationen (DADs) führen kann (Baumeister und Quinn, 2016). Dies sind Oszillationen des Membranpotenzials nach einer vollständigen Repolarisation nach einem AP. Bei einer kürzeren Herzzykluslänge nimmt die Amplitude und Frequenz von DADs zu, sodass ein durch sie ausgelöstes AP und damit auch die Entstehung einer Arrhythmie wahrscheinlicher wird (Akar und Akar, 2007, Gaztañaga et al., 2012).

Auf Ebene der intrakardialen Ganglien kommt es durch die Hypoxie zu einer Größenzunahme der Neurone sowie zu einer verminderten Expression der Cholinacetyltransferase (ChAT) und einer vermehrten Expression des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP) (Rajendran et al., 2016). Ferner wird durch eine Veränderung v. a. der *local circuit neurons* eine erhöhte Interaktion der ICN untereinander als Auslöser von Arrhythmien diskutiert (Ashton et al., 2018).

Durch hypoxisch bedingte Anhäufung von Metaboliten wie ATP, Adenosin oder freien Radikalen kommt es zu einer verminderten Antwort gegenüber sensorischen Signalen (Armour, 1999). So ist etwa die Fähigkeit der Neurone eingeschränkt, Informationen über Veränderungen der kardialen Blutfüllung an andere Neurone weiterzuleiten, es kommt zu einer eingeschränkten Kommunikation über das neuronale Netzwerk (Rajendran et al., 2016). Dagegen zeigten in den Untersuchungen von Beaumont ventrikuläre, von einer Hypoxie betroffene Neurone eine erhöhte Ansprechbarkeit auf afferente Signale vom Herzen (Beaumont et al., 2013).

Demgegenüber ist die Weiterleitung autonomer Einflüsse (via Stimulation des *Nervus vagus* oder *Ganglion stellatum*) durch die Neurone nach Hypoxie bzw. MI nicht verändert (Rajendran et al., 2016). Diese funktionellen Veränderungen sind bedingt durch ein *Remodelling* der afferenten Neurone. Betroffen sind jedoch nur Neurone, die unmittelbar im Hypoxie- bzw. Infarktgebiet liegen (Rajendran et al., 2016).

Nach Reperfusion des Gewebes und dem damit verbundenen Abtransport der angehäuften Metabolite können diese die nachgeschalteten, nicht direkt von der Hypoxie betroffenen Neurone erreichen und sie beeinflussen (Armour, 1999, Gourine

und Gourine, 2014). Die neuronalen Innervationsebenen sind insofern von einer Hypoxie betroffen, als dass Spinalganglienneurone durch Hypoxie aktiviert werden und eine Veränderung der sympathischen Innervation des Herzens bewirken können (Armour, 1999).

2.4 Ziel der Arbeit

Durch Weiterentwicklung der Isolationstechnik der ICN sowie Modulierung der Umgebungsvariablen kann die neuronale Plastizität der ICN unter beispielhaften physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen weiter untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel:

- 1) eine Methode zur gemeinsamen Kultivierung von ICN und atrialen Myozyten zu etablieren
- 2) den Einfluss einer passageren Hypoxie auf das Neuritenwachstum der ICN in Kokultur mit atrialen Myozyten zu charakterisieren

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die im Rahmen dieser Untersuchung zur Materialgewinnung notwendigen Gewebe- und Organentnahmen wurden durch die jeweiligen Aufsichtsbehörden gemäß § 8 Absatz 1 Tierschutzgesetz genehmigt (Bezirksregierung Düsseldorf: O47-90; Bezirksregierung Hamburg: ORG_732_HCN4). Die Versuche wurden an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Untersuchungen wurden durch den lokalen Tierschutzbeauftragten kontrolliert. Die Beschaffung, Haltung und veterinärmedizinische Betreuung der Tiere unterlag bis zum Tag der Versuchsdurchführung den Instituten für Versuchstierkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Um einen möglichst homogenen Versuchsablauf und Versuchsergebnisse zu erzielen, wurden nur männliche C57Bl/6 Mäuse im Alter von 12 bis 16 Wochen mit einem Gewicht von 25 bis 32 g untersucht. Diese wurden unter konstanten Bedingungen bei 24 °C einer Luftfeuchtigkeit von 45-65% und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden in einem offenen Käfigsystem mit einer Grundfläche von minimal 100cm² pro Tier in Gruppen von maximal 5 Tieren gehalten. Futter und Wasser standen nach Belieben zur Verfügung. Die Haltungsbedingungen entsprachen den Empfehlungen der GV-Solas zur tiergerechten Haltung von Labormäusen, Stand 2014.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sind allesamt an der Maus erfolgt. Es wurde die Maus als Versuchstier gewählt, da sie in der kardiologischen Forschung als Standardmodell durch ihren dem Menschen sehr ähnlichen kardiologisch-anatomischen Aufbau und ihren elektrophysiologischen Eigenschaften etabliert ist (Hasenfuss, 1998, Doevendans et al., 1998, Church et al., 2009). Auch sind relevante Vorarbeiten bzw. Versuche an der Maus erfolgt (Hoard et al., 2007, Pauza et al., 2012, Verkerk et al., 2012).

3.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Für die lichtmikroskopischen und immunhistochemischen Färbungen wurden wie folgt Paraffinschnitte hergestellt:

Zuerst wurde das Herz-Lungen-Paket, wie unter 3.5.2 beschrieben, entnommen und die Lungenflügel sowie der Thymus entfernt. Die Herzen wurden dann für 14-18 Stunden in Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit Histofix (4 %) fixiert, mit 1 x phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphat buffered saline*, PBS) für 15 Minuten gespült und mit einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe entwässert (24 Stunden in 70 % Isopropanol bei 4 °C, jeweils 2 Stunden in 80 %, 90 %, 96 % und 100 % Isopropanol sowie 14-16 Stunden in 100 % Xylol bei Raumtemperatur). Dann wurden sie für 6 Stunden in ein mit 60 °C warmem Paraffin gefüllten Becherglas in einen Heizschrank gegeben, damit das Paraffin das Gewebe optimal durchsetzen konnte.

Mit Hilfe von Pinzetten wurden die Herzen aus dem Becherglas entnommen, in Metallformen überführt, entsprechend der gewünschten Lage ausgerichtet und mit dem erhitzten Paraffin übergossen. Die so gefüllten Metallformen wurden auf einer Kühlplatte gelegt, sodass sich das Paraffin verfestigte. Nach gleichmäßigem Aushärten des Paraffins wurden die entstandenen Paraffinblöcke über Nacht bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurden die Blöcke aus der Metallform gelöst und mit einem Mikrotom in Streifen von 6 – 10 µm Dicke geschnitten. Diese Streifen wurden jeweils einzeln mit einem Pinsel vom Mikrotom in ein Wasserbad mit Leitungswasser und dann in ein 40 °C warmes Wasserbad transferiert.

Nach Aufnahme mit einem Objektträger wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C im Inkubator getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur bis zur Färbung gelagert.

3.3 Histologische Färbungen

Das Ziel der histologischen Färbungen war es, die im Fettgewebe um das Herz befindlichen kardialen Ganglien bzw. ICN und ihren Verlauf mitsamt Kontakten zur Herzmuskulatur sowie anderen Nervenplexen darzustellen. Als Standard zur Beurteilung einer adäquaten Färbezeit wurde jeweils ein Paraffinschnitt (Kleinhirn der Maus) wie die anderen Schnitte behandelt.

Die hergestellten Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt: Die Schnitte wurden mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe rehydriert bzw. entparaffiniert (2 x 10 Minuten in 100 % Xylol, 2 x 10 Minuten in 100 % Ethanol, je 5 Minuten in 96 %, 70 % und 50 % Ethanol, 30 Sekunden in doppelt destilliertem Wasser, (H_2O_{dd})). Bis zum Färben wurden die Schnitte in 1 x Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) (s. Tabelle 2) aufbewahrt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Tris-gepufferten Salzlösung für histologische Färbungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Herstellung</u>
Tris-gepufferte-Salzlösung (TBS)	Tris-Base	100 mM	Kurz vor Gebrauch anzusetzen
	Natriumchlorid	1,5 M	

(Bezugsquelle und Artikelnummer im Anhang)

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 10 Sekunden in Mayers Hämalaunlösung getaucht, dann für 15 Sekunden in 60 °C warmem Leitungswasser gebläut (Avwioro, 2011). Die Qualität der Hämalaunfärbung wurde am Kleinhirnschnitt (sagittale Ausrichtung) anhand der Färbung der Kleinhirnkerne mikroskopisch überprüft. Dann wurden die Schnitte für 1 Minute in 1 % Eosin-Lösung (2 g Eosin auf 200 ml Leitungswasser) gelegt, in H_2O_{dd} gewaschen und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (je 30 Sekunden in 70 % und 90 % Ethanol, je 2 Minuten in 100 % Ethanol bzw. Xylol). Die Schnitte wurden mit Vitro-Clud eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

Die Größe der gefundenen Ganglien wurde mit Hilfe einer Distribution der Bildbearbeitungsanwendung Image-J vermessen (FIJI) und mit Microsoft Excel tabellarisch erfasst (Schindelin et al., 2012). Zur Kalibrierung der Längenreferenz wurde eine mikroskopische Aufnahme eines speziellen Plastiklineals mit Streckenabständen von 100 μm angefertigt. Dieser Abstand wurde in Pixeln erfasst, sodass ein Umrechnungsmaß von Pixel zu μm und umgekehrt erstellt werden konnte. Zur Messung der Ganglien konnten diese dann mit Hilfe der FIJI-Software mit dem Cursor nachgefahren werden. Über das zuvor erstellte Umrechnungsmaß konnte die Länge der Ganglien bestimmt werden.

3.4 Immunhistochemische Färbungen

Um die gefundenen intrakardialen Ganglien charakterisieren zu können, wurden immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Dieser Vorgang war in 6 Schritte gegliedert:

1. Entparaffinierung
2. Antigendemaskierung
3. Permeabilisierung und „Blocken“
4. Inkubation mit dem Primärantikörper
5. Inkubation mit dem Sekundärantikörper
6. Eindecken

Die Paraffinschnitte wurden, wie unter 3.3 beschrieben, entparaffiniert und bis zur Antigendemaskierung in TBS aufbewahrt. Dann wurde eine Antigendemaskierung mit dem angesetzten Citratpuffer (s. Tabelle 3) durchgeführt. Zwei weitere Puffer (Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (EDTA-Puffer) und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-EDTA-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)) wurden ebenfalls ausgetestet, waren jedoch dem verwendeten Citratpuffer in der finalen Signalqualität unterlegen. Allein bei Verwendung des Tyrosin-Hydroxylase-Antikörpers war die Antigendemaskierung mit Citratpuffer optional (s. Tabelle 4) (genauere Angaben zu den Antikörpern sind im Anhang zu finden).

Tabelle 3: Zusammensetzung der für die Antigendemaskierung verwendeten Puffer

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Herstellung</u>
Citratpuffer (10 mM)	Zitronensäure	0,1 M	9 ml Zitronensäure + 41 ml Natriumcitrat auf 500 ml H ₂ O _{dd} ansetzen, pH 6 titrieren
	Natriumcitrat	0,1 M	
EDTA-Puffer (2 mM)	EDTA	2 mM	Mit H ₂ O _{dd} auffüllen, pH 8 titrieren
Tris-EDTA-Puffer	TrisBase	10 mM	Mit H ₂ O _{dd} auffüllen, pH 8 titrieren
	EDTA	1 mM	
	Tween 20	0,05 %	

(Bezugsquelle und Artikelnummer im Anhang)

Tabelle 4: Antikörper und geeignete Puffer zur Antigendemaskierung

<u>Antikörper</u>	<u>Geeignete Puffer</u>
Beta-III-Tubulin	Citrat-Puffer
Neurofilament H	Citrat-Puffer
Smooth Muscle Actin	Citrat-Puffer
Tyrosin-Hydroxylase	Keine Antigendemaskierung nötig (ggf. Citrat-Puffer)

(Bezugsquelle und Artikelnummer im Anhang)

Die Schnitte wurden in ein Metallgestell überführt und in einen Dampfkochtopf mit 1,5 Liter des entsprechenden, zuvor hergestellten Puffers gegeben. Nach Erreichen des nötigen Drucks und einer Temperatur von 120 °C, verblieben die Schnitte für 10 Minuten im Dampfkochtopf. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser abgekühlt und noch 3 x 5 Minuten in TBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,2 % Triton-X-100 in TBS für 10 Minuten. Nach erneutem Waschen (3 x 5 Minuten in TBS) wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt und mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) in TBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert („Blockschritt“), um eine Autofluoreszenz zu minimieren. Nach einem Waschschrift (1 Minute in TBS) wurden die Primärantikörper-Lösungen (gewünschte Konzentration des Primärantikörpers in 1 % BSA in TBS, s. Tabelle „Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen“ im Anhang) auf die Schnitte

gegeben, dabei jeweils eine Negativkontrolle pro Objektträger (nur 1 % BSA in TBS) angefertigt und die Schnitte bei 4 °C über Nacht in der Feuchtkammer belassen.

Nach erneutem Waschen (3 x 5 Minuten in TBS) wurden die Schnitte 60 Minuten licht geschützt in der Feuchtkammer mit den Sekundärantikörper-Lösungen (gewünschte Konzentration des Sekundärantikörpers in 1 % BSA in TBS, s. Tabelle „Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen“ im Anhang) inkubiert und lichtgeschützt gewaschen (3 x 5 Minuten in TBS + 30 Sekunden in H₂O_{dd}). Zum Eindeckeln der gefärbten Schnitte wurde Fluoromount G benutzt. Die Schnitte wurden lichtgeschützt aufbewahrt und zeitnah mikroskopiert bzw. dokumentiert.

Es erfolgten z. T. Ko-Färbungen, d. h. es wurden jeweils zwei Primärantikörper unterschiedlicher Herkunft (z. B. Kaninchen und Maus) in entsprechenden Konzentrationen auf einen Schnitt gegeben und mit den zugehörigen, verschieden fluoreszierenden Sekundärantikörpern versetzt. Dadurch konnten parallel zwei Zielstrukturen auf einem Schnitt immunhistochemisch angefärbt werden.

3.5 Isolation und Kultur der intrakardialen Neurone

Die Isolation der intrakardialen Neurone aus dem epikardialen Fettgewebe entlang der Pulmonalvenen, der *Venae cavae* sowie der ventralen und dorsalen Seite des rechten Atriums (s. Abbildung 4) (Pauza et al., 2013), erfolgte als Weiterentwicklung der bereits von Verkerk et al sowie Hoard et al. beschriebenen Methode in 4 Schritten (Hoard et al., 2007, Verkerk et al., 2012):

1. Vorbereitungen
2. Präparation des epikardialen Fettgewebes
3. Enzymatische und mechanische Dissoziation der Zellen und
4. Ausbringen der Zellen auf Kulturschalen

3.5.1 Vorbereitungen

Zur Vorbereitung der Neuronen-Isolation wurde das Neurozyten-Medium (s. Tabelle 5) am Versuchstag angesetzt. Dazu wurden die einzelnen Chemikalien bzw. Lösungen abgemessen, in ein steriles Zentrifugenröhrchen (50 ml) gegeben und durch

Schwenken der Lösung vermischt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 titriert, das so erhaltene Neurozyten-Medium danach durch einen 0,2 µm-Filter steril filtriert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der Neurozyten

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Herstellung</u>
Neurozyten-Medium	Claycomb Medium		pH auf 7,4 titrieren und steril filtrieren
	Fetales Kälberserum	10 %	
	Gibco® Glutamax®	2 mM	
	Penicillin/ Streptomycin (100x)	66 µg/ml	
	Gibco® Fungizone® (Amphotericin)	0,1125 µg/ml	
	Gibco® B27® (50x)	0,1 M	
	L-Ascorbinsäure	2,8 nM	

(Bezugsquelle und Artikelnummer im Anhang)

Das Claycomb Medium stellt, unter Zugabe von fetalem Kälberserum, L-Glutamin bzw. Gibco Glutamax, Penicillin/Streptomycin (und dem hier nicht verwendeten) Norepinephrin, das Standardmedium zur Kultivierung von HL-1-Zellen (atrialen Myozyten) dar (Claycomb et al., 1998, White et al., 2004). Gibco B27 unterstützt das Wachstum und die Überlebensrate von neuronalen Zellen (Brewer et al., 1993). Ascorbinsäure stimuliert die Bildung von Norepinephrin in neuronalen Zellen (May et al., 2012). Das Gibco Fungizone (Amphotericin B) wurde zum Medium hinzugefügt, um einer etwaigen Kontaminierung mit Pilzen vorzubeugen (Mehta et al., 1984).

Folgend wurden die *µ-slide 8 well*-Mikrotiterplatten (im weiteren Verlauf als „Well“ bezeichnet; Fassungsvermögen 300 µl/ Well) mit jeweils 150 µl 0,01 % Poly-L-Lysin- und 0,01 % L-Ornithin-Lösung (in H₂O_{dd}) beschichtet und für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Beschichtung entfernt und die Wells mit circa (ca.) 150 µl Neurozyten-Medium gefüllt. Die beschriebene Beschichtung ermöglicht eine bessere Adhäsion der Zellen (Mazia et al., 1975). Hier, wie auch in allen weiteren Versuchen, wurde der Inkubator auf 37 °C und 5 % CO₂ eingestellt.

3.5.2 Präparation des epikardialen Fettgewebes

Für die Präparation des epikardialen Fettgewebes wurden die Mäuse mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) durch intraperitoneale Gabe betäubt. Zur Sicherstellung einer adäquaten Betäubung der Tiere wurde ein Schmerzreiz gesetzt, bei ausreichender Betäubung die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

Die Bauch- und Brusthöhle wurden dann durch einen horizontal verlaufenden Schnitt unterhalb des Brustbeins eröffnet, anschließend das Zwerchfell durchtrennt. Das Herz wurde durch weitere Schnitte bis zu den Achselhöhlen der Maus freigelegt. Im Anschluss wurden die *Vena cava inferior* (VCI) und die *Aorta thoracalis* auf Höhe des Zwerchfells sowie die *Vena cava superior* (VCS), der Aortenbogen, Trachea und Ösophagus oberhalb des Herzens durchtrennt (s. Abbildung 5). Das so freigelegte Herz-Lungen-Paket wurde entnommen und in 4 °C kalte 0,9 % Isotonische Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) überführt, Lungenflügel, Ösophagus, Thy-mus und beide *Nervi vagi* mit einer Präparierschere abgetrennt und das Herz durch Schwenken in der Lösung von Blut befreit.

Das Herz wurde in eine Schale mit 4°C kaltem HEPES-Puffer (s. Tabelle 6) gelegt. Die Temperatur des HEPES-Puffers wurde mittels einer Kühlplatte konstant gehalten. Das epikardiale Fettgewebe entlang der Gefäße am *Hilum* des Herzens und an der Hinterwand des linken Vorhofs wurde mit Hilfe von Pinzette und Mikroschere unter dem Stereomikroskop entfernt. Die so erhaltenen Fettgewebstücke wurden in einem 25 ml Becherglas mit 4 °C kaltem Calciumchlorid-HEPES-Puffer (s. Tabelle 6) gesammelt.

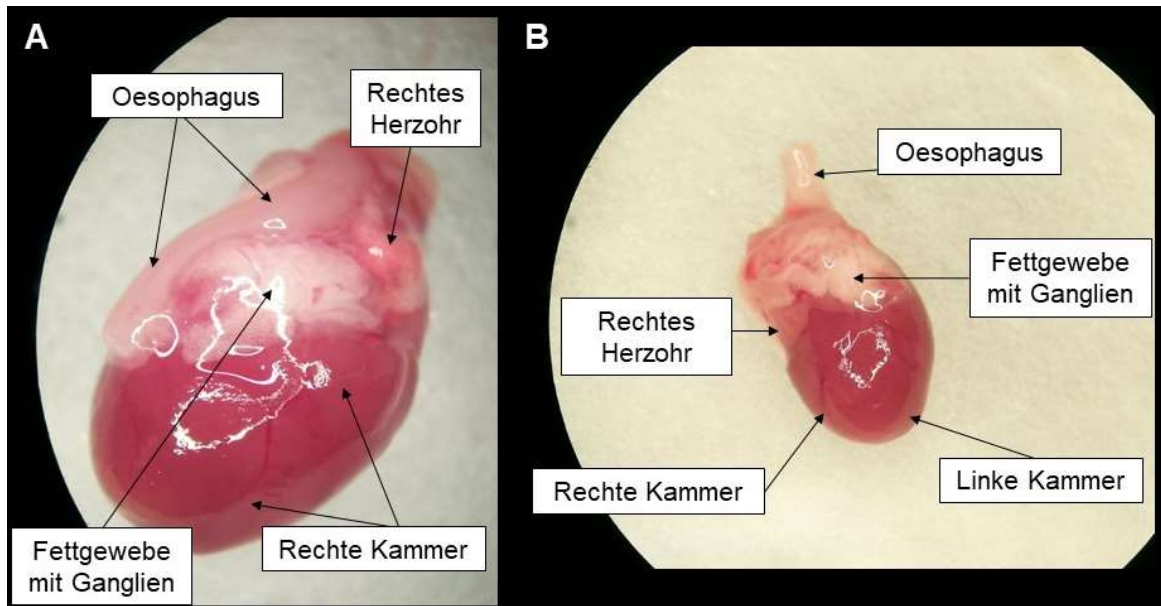


Abbildung 5: Frisch entnommenes Mäuseherz vor Präparation des epikardialen Fettgewebes

Mikroskopische Sicht auf das entnommene Herz von schräg-dorsal (A) und ventral (B) unmittelbar nach chirurgischer Entfernung der Lungenflügel und der Trachea mit noch nicht entferntem Ösophagus. Das epikardiale Fettgewebe mit den darin enthaltenen Ganglien ist den Herzvorhöfen aufgelagert und stellt sich weißlich dar. Im Gegensatz zu Bindegewebe lässt es sich leichter von der Herzoberfläche lösen.

3.5.3 Enzymatische und mechanische Dissoziation der Zellen

Das präparierte Fettgewebe wurde gleichmäßig auf Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt (pro Herz zwei Gefäße) und mit jeweils 1 ml Lösung zur enzymatischen Verdauung (s. Tabelle 7) versetzt. Die enzymatische Dissoziation fand in einem Thermomixer bei 37 °C und 540 Umdrehungen/Minute für 20 Minuten statt. Noch nicht vollständig dissoziierte Fettgewebstücke wurden mit absteigenden Pipettenvolumina (1000 µl, 200 µl) titriert. Die entstandene Suspension wurde durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße gefiltert und auf frische Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Nach Zentrifugation (10.000 xg (relative Zentrifugalkraft), 15 Sekunden) wurde der Überstand entfernt und das erhaltene *Pellet* in jeweils 500 µl erwärmtem Neurozyten-Medium resuspendiert. Anschließend wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und die Zellen final in 150 µl Neurozyten-Medium aufgenommen.

Tabelle 6: Zusammensetzung des HEPES-Puffer bzw. des Calciumchlorid-HEPES für die Präparation des epikardialen Fettgewebes

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Herstellung</u>
HEPES-Puffer	Glukose	11,0 mM	Mit H ₂ O _{dd} auf 1 Liter auffüllen und pH-Wert auf 7,4 titrieren
	HEPES	16,8 mM	
	Kaliumchlorid	4,7 mM	
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,4 mM	
	Magnesiumsulfat-heptahydrat	2,0 mM	
	Natriumchlorid	155,0 mM	
	Natriumhydrogencarbonat	4,3 mM	
Calciumchlorid-HEPES-Puffer	HEPES-Puffer		Keine pH-Einstellung nötig
	Calciumchlorid	2,8 mM	

(Bezugsquelle und Artikelnummer im Anhang)

Tabelle 7: Zusammensetzung der Lösung zur enzymatischen Zersetzung des präpartierten Fettgewebes

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Herstellung</u>
Lösung zur enzymatischen Zersetzung (pro Herz)	Kollagenase Typ II	1 mg	Lösen der Kollagenase und Proteinase in 2 ml
	Proteinase von <i>Aspergillus meleus</i>	2 mg	
	Calciumchlorid-HEPES-Puffer	2 ml	Calciumchlorid-HEPES-Puffer

(Bezugsquelle und Artikelnummer im Anhang)

3.5.4 Ausbringen der Zellen auf Kulturschalen

Die so aufgereinigte Zellsuspension wurde unter der Sterilbank in die mit Neurozyten-Medium gefüllten und auf 37 °C vorgewärmten *Wells* pipettiert.

Abbildung 6 gibt eine Übersicht über den Isolationsablauf.

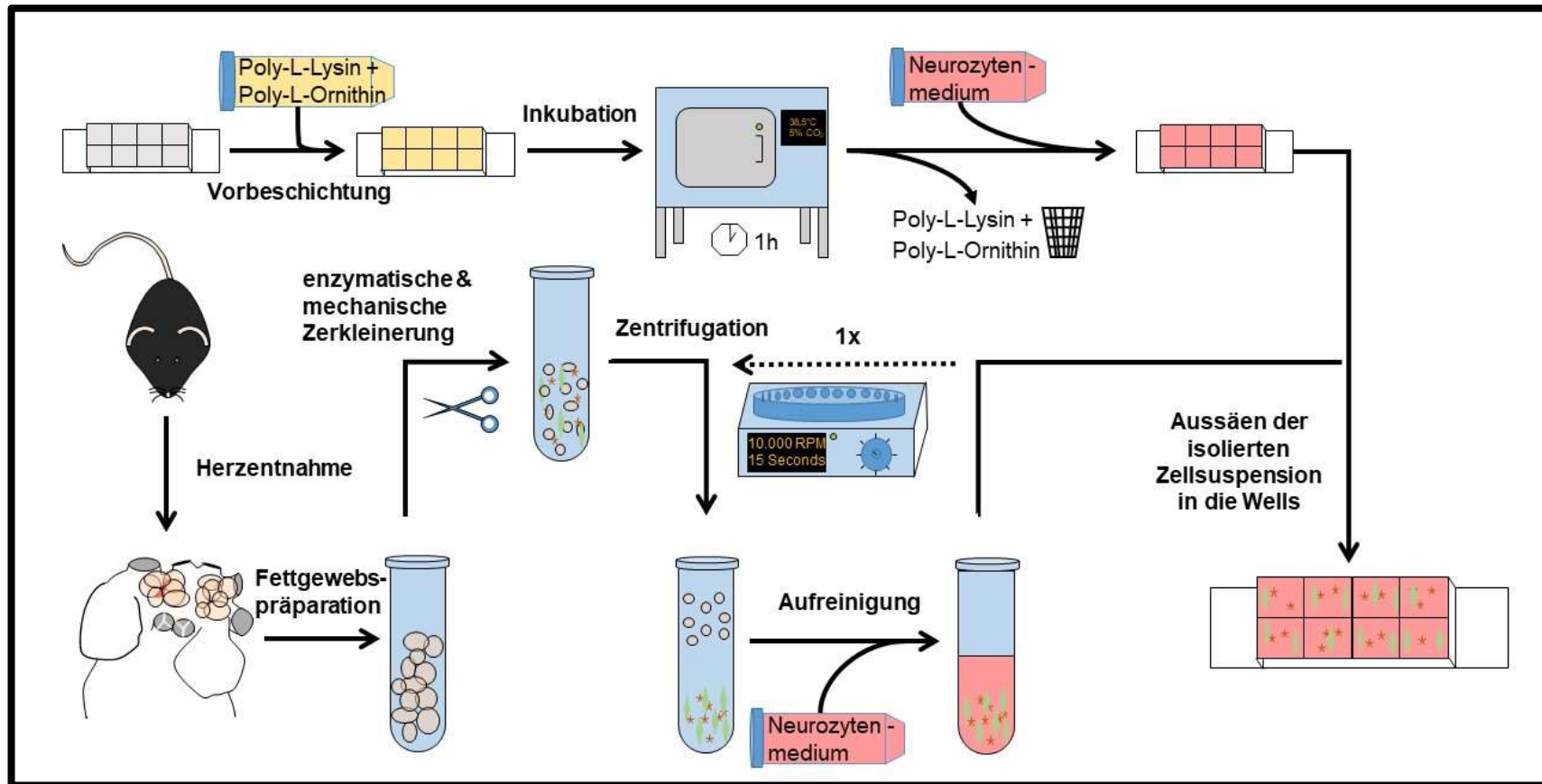


Abbildung 6: Ablauf der Neurozytenisolation

Schematische Darstellung der einzelnen Schritte (fettgedruckt) zur Isolation der intrakardialen Neurozyten. Zunächst werden die *Wells* mit der Poly-L-Lysin- und L-Ornithin-Lösung vorbeschichtet und 1 Stunde inkubiert. Anschließend wird die Vorbeschichtung entfernt und das Neurozyten-Medium auf die *Wells* gegeben. Das Herz der Maus wird entnommen und das epikardiale Fettgewebe mit den Neurozyten präpariert. Nach enzymatischer und mechanischer Zerkleinerung wird die erhaltene Lösung zentrifugiert, wodurch das Fettgewebe (orange) vom Zellanteil (rot = Neurozyten, grün = nicht-neuronale Zellen) getrennt wird. Nach Aufreinigung mit Neurozyten-Medium wird die erhaltene Lösung noch einmal zentrifugiert und erneut aufgereinigt. Zuletzt wird die so gewonnene Zellsuspension in die mit dem Neurozyten-Medium vorbereiteten und zuvor vorbeschichteten *Wells* gegeben.

3.5.5 Preplating

Das *Preplating* (s. Abbildung 7) stellt eine Methode dar, die Zahl der nicht-neuronalen Zellen in der Kultur der ICN zu minimieren. Die Methode macht sich die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften der verschiedenen Zelltypen zunutze. Es wurde sich an dem von Hoard et al. entwickeltem Verfahren orientiert (Hoard et al., 2007).

Vor der Isolation wurden *Wells* bei 4 °C für 72 Stunden mit einer Poly-DL-Ornithin-Lösung (500 µg/ml) und anschließend für 3 Stunden bei 37 °C mit in H₂O_{dd} gelöstem Laminin (5 µg/ml) vorbeschichtet. Die gleiche Anzahl *Wells* wurde für 3 Stunden bei 37 °C mit einer 100 µM Poly-D-Lysin-Lösung behandelt. Nach Isolation der ICN nach Protokoll (s. o.) wurde die Zellsuspension zunächst auf dem mit Poly-D-Lysin vorbeschichteten *Well* (*Preplating-Well*) ausgesät. Nach 1 Stunde im Inkubator wurde die Zellsuspension auf das mit Poly-DL-Ornithin und Laminin behandelte *Well* (Haupt-*Well*) übertragen. Durch Adhäsion der nicht-neuronalen Zellen an dem *Preplating-Well*, sollten nur ICN auf das Haupt-*Well* transferiert werden (s. Abbildung 7).

Eine Abwandlung der vorbeschriebenen Beschichtung des Haupt-*Wells* jeweils zur Hälfte mit 0,01 % Poly-L-Lysin-Lösung und 0,01 % L-Ornithin-Lösung (vergleiche Isolation der ICN) wurde ebenfalls verwendet.

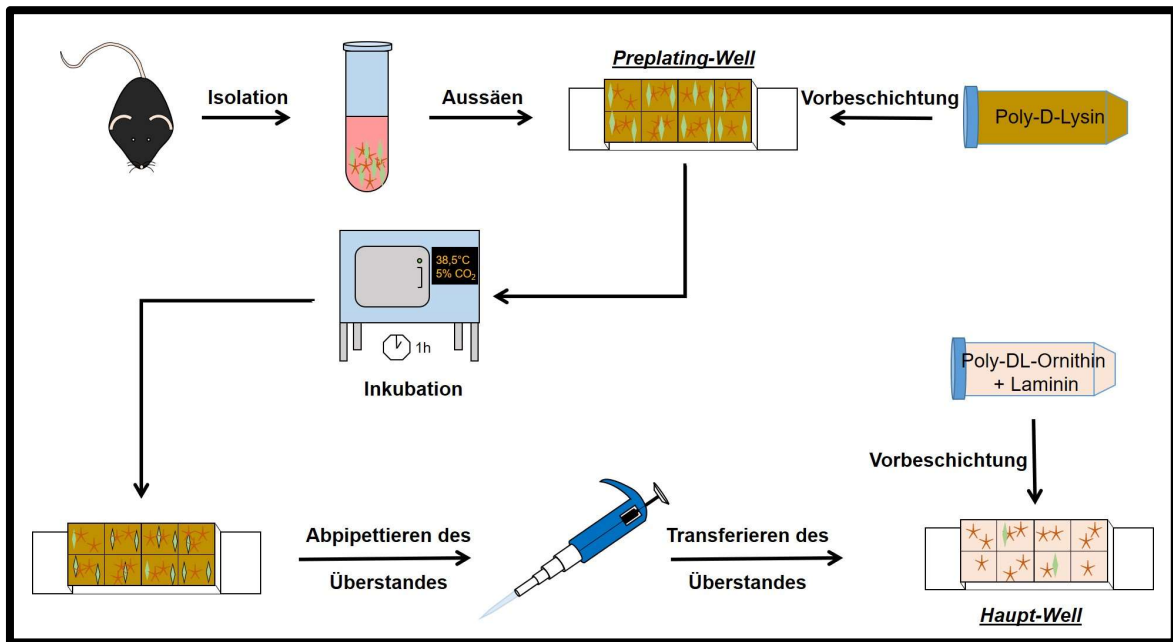


Abbildung 7: Ablauf des *Preplatings*

Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des *Preplatings* bei Isolation intrakardialer Neruone. Die isolierten Neurone befinden sich am Ende des Isolationsprozesses in Neurozyten-Medium (vergleiche auch Abbildung 6). Diese werden dann auf ein mit Poly-D-Lysin vorbeschichtetes *Well* gegeben (*Preplating-Well*) und für 1 Stunde inkubiert. Die nicht-neuronalen Zellen (grün) haben eine stärkere Adhäsion zum *Preplating-Well* als die Neurone (rot). Dadurch kann die Lösung, die eine hohe Dichte an neuronalen und geringe Dichte an nicht-neuronalen Zellen enthält, aus den Wells abpipettiert werden. Die Lösung wird auf das *Haupt-Well* gegeben, welches mit Poly-DL-Ornithin und Laminin vorbeschichtet wurde.

3.6 Morphometrische Charakterisierung des neuronalen Wachstums unter Basisbedingungen

Es wurden in insgesamt 6 Versuchen die ICN von je 2 Mäusen isoliert und in Kultur gebracht, um die Neuritenlängen zu den Zeitpunkten 48, 72 und 96 Stunden nach Isolation (n. I.) zu bestimmen. Für die Zeitpunkte 24 und 120 Stunden n. I. waren zusätzlich 3 Versuche mit je 2 Mäusen nötig.

Die isolierten ICN wurden nach der Isolation 48 Stunden im Inkubator kultiviert, danach fand alle 24 Stunden ein Wechsel des Neurozyten-Mediums statt. Die Dokumentation des Wachstums der Zellfortsätze erfolgte jeweils alle 24 Stunden n. I. unter dem Mikroskop. Für die Zeit der Messung (ca. 20 Minuten) wurden die *Wells* mit den Zellen einzeln aus dem Inkubator entnommen.

Für die systematische Klassifizierung der Zellen und Messung ihrer Fortsätze wurden neun Messfelder pro *Well* determiniert, in denen jeweils ein Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen wurde. Zu den darauffolgenden Messungen, wie auch in den anderen Versuchsreihen, wurden nur die entsprechenden Messfelder dokumentiert und nur die dort sichtbaren Zellen klassifiziert bzw. vermessen. Die Klassifizierung der ICN erfolgte anhand zuvor festgelegter morphologischer Kriterien:

- länglich-ovaler bis runder Nervenzellkörper (Xi et al., 1991, Rysevaite et al., 2011a)
- scharf begrenzter Umriss der Zelle (Pauza et al., 1997b)
- gut erkennbarer *Nucleus* mit *Nucleoli* (Her et al., 2000)
- variable Anzahl an Fortsätzen (Hoard et al., 2007).

Die Zellen wurden in drei Typen entsprechend der Zahl ihrer Zellfortsätze klassifiziert: unipolare mit einem, bipolare mit zwei oder multipolare Neurone mit drei oder mehr Zellfortsätzen (Xi et al., 1991, Pauza et al., 1997b, Her et al., 2000).

Zellen, die morphologische Unregelmäßigkeiten wie Membran-Unterbrechungen, Blasenbildung oder ein Schrumpfen der Zelle mit Abrundung aufwiesen (Rello et al., 2005) wurden von der Messung ausgeschlossen. Ebenso wurden Zellen, die apoptotische Körper (Ziegler und Groscurth, 2004) oder einen spindelförmigen Zellkörper zusammen mit stark verbreiterten, blattförmigen bzw. irregulär verzweigten Fortsätzen zeigten (De Maziere et al., 1992, Camelliti et al., 2005a) nicht gewertet.

Es wurden alle auf den Aufnahmen vorhandenen Zellen von zwei unabhängigen Beobachtern nach den oben genannten Kriterien klassifiziert.

3.7 Hypoxie-Modell

Um den Einfluss einer Hypoxie auf das Wachstum der ICN zu untersuchen, wurden die kultivierten Zellen in eine Hypoxiekammer gegeben und dort einer Atmosphäre mit vermindertem Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt. Die ICN wurden, wie im Abschnitt 3.5 dargestellt, isoliert und danach (wie auch im weiteren Verlauf) inkubiert. Das Neurozyten-Medium wurde 48 Stunden nach Isolation durch 37 °C warmes Neurozyten-Medium ersetzt und die *Wells* mit den Zellen unmittelbar danach ohne

Deckel in die Hypoxiekammer gegeben. Diese bestand aus einer zylindrischen Kammer mit je einem Zufluss aus einer Gasflasche und einem Abfluss über einen Schlauch. Zu- und Abfluss waren über Klemmen, die Kammer selbst durch einen Metallverschluss luftdicht verschließbar. Zusätzlich war dem Zufluss ein Flussmessgerät vorgeschaltet (s. Abbildung 8). Die Hypoxiekammer wurde mit einem Gasgemisch aus 95 % Stickstoff (N_2) und 5 % CO_2 für 5 Minuten bei einem Durchfluss von circa 25 Liter pro Minute begast. Anschließend wurde die Hypoxiekammer luftdicht verschlossen und für 3 Stunden in den Inkubator gegeben.

Danach wurde der Verschluss der Kammer in der Sterilbank geöffnet und das Neurozyten-Medium erneut gegen frisches, erwärmtes Neurozyten-Medium ausgetauscht. Die Zellen befanden sich dadurch wieder in einem normoxyschen Milieu. Die *Wells* wurden mit dem Deckel verschlossen und das Wachstum der Zellfortsätze unmittelbar danach und jeweils nach weiteren 24 Stunden mit dem Mikroskop nach oben genanntem Schema dokumentiert. Eine Kontrollgruppe ohne künstliche Hypoxie wurde jeweils parallel angelegt und vermessen (s. Abbildung 9). Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit werden die nach Hypoxie-Behandlung erhobenen Zeitpunkte im Folgenden als 72, 96, 120 Stunden, etc. bezeichnet. Dies betrifft auch die Versuche der Kokultur (s. u.).

Es wurden für die Monokultur-Untersuchungen in insgesamt 6 Versuchen die ICN von jeweils zwei Mäusen isoliert, für 48 Stunden kultiviert und anschließend in der Hypoxiekammer einer dreistündigen Hypoxie ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen reoxygeniert ($\triangleq$ Reperfusion) und das Neuritenwachstum dokumentiert.

Für die Kokultur-Versuche wurden in insgesamt 3 Versuchen 48 Stunden nach Isolation der ICN ca. 5.000 atriale Myozyten pro Well zu diesen gegeben und für weitere 48 Stunden ohne Intervention (außer Mediumwechsel) inkubiert. Dann wurden diese Kokulturen einer dreistündigen Hypoxie ausgesetzt und die Neuritenlänge der ICN alle 24 Stunden dokumentiert.

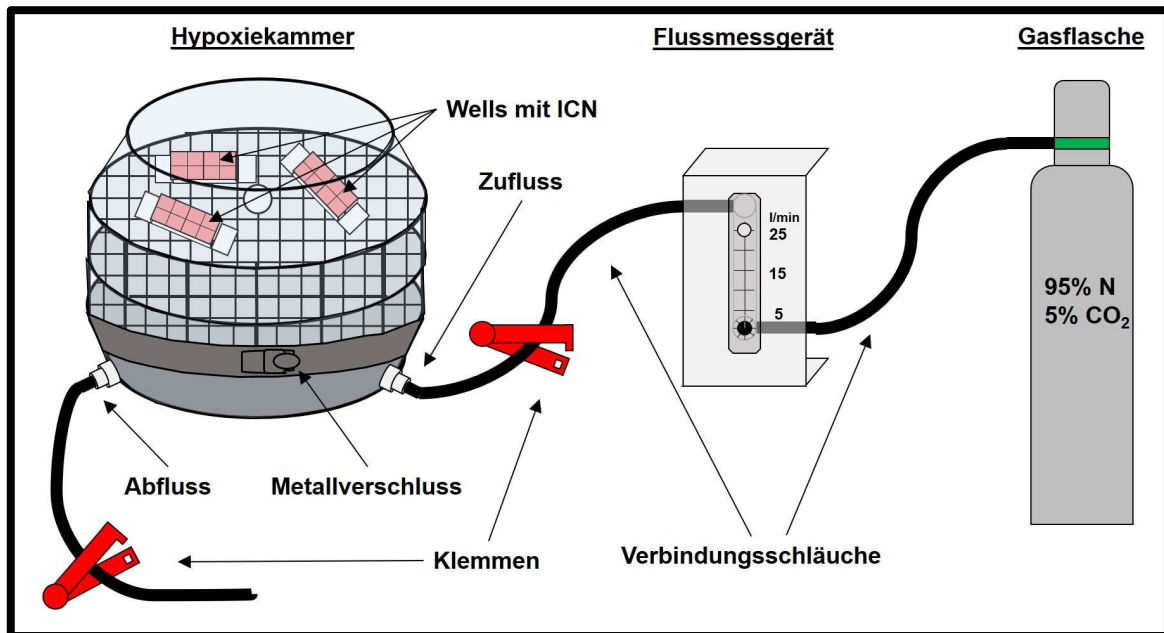


Abbildung 8: Aufbau des Hypoxie-Modells

Das aus 95 % Stickstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid bestehende Gas wird durch Verbindungsschläuche in die Hypoxiekammer geleitet. Das vorgeschaltete Flussmessgerät reguliert den Gasfluss auf 25 Liter/ Minute. Die Wells mit den ICN werden auf der obersten der drei Plattformen der Hypoxiekammer platziert. Diese ist mit Klemmen am Zu- und Abfluss sowie durch einen Metallring luftdicht verschließbar.

3.8 Kultivierung atrialer Myozyten

Für die Kokulturversuche wurden HL-1-Zellen zu den ICN gegeben. HL-1-Zellen wurden erstmals 1998 von William C. Claycomb et al. beschrieben (Claycomb et al., 1998), sind bereits in vielen Bereichen der kardiologischen Forschung etabliert und finden häufig Verwendung in der Grundlagenforschung (White et al., 2004)

Es handelt sich um atriale Myozyten, die aus einem Angiotensin-1 produzierenden Tumor des Vorhofs einer Maus entnommen und kultiviert wurden. HL-1-Zellen besitzen im Gegensatz zu anderen atrialen Muskelzelllinien vier wichtige Besonderheiten:

1. sie können unendlich oft passagiert werden,
2. können sich nach Einfrieren zur Konservierung wieder erholen,
3. behalten ihren charakteristischen Phänotyp einer Herzmuskelzelle,
4. behalten ihre kontraktile Eigenschaften (Claycomb et al., 1998)

Die Beschreibung der HL-1 Zellen und deren Kultivierung durch Claycomb diente als Vorlage für das Vorgehen bei diesem Prozess (Claycomb et al., 1998), der sich grob in vier Schritte gliedern lässt:

1. Vorbereitung der Kulturflasche
2. Etablierung einer Myozytenkultur
3. Subkultivierung / Passagieren der Kultur
4. Kryokonservierung einzelner Kulturpassagen

3.8.1 Vorbereitung der Kulturflasche

Zur besseren Adhäsion der Zellen wurde eine Zellkulturflasche mit einer Lösung aus Gelatine und Fibronectin (199ml einer 0,02% Gelatine-Lösung + 1ml Fibronectin) vorbeschichtet und für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung der Lösung wurden 10 ml Myozyten-Medium (s. Tabelle 8) vorgelegt.

3.8.2 Etablierung einer Myozytenkultur

Die zu kultivierenden atrialen Myozyten wurden in einem Kryoröhrchen mit Einfriermedium (s. u.) bei -80 °C gelagert. Dieses wurde für 2 Minuten zum Auftauen in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben, dann dessen Inhalt mit 10 ml erwärmtem Myozyten-Medium versetzt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 500 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das *Pellet* in 5 ml Myozyten-Medium resuspendiert und in die vorbereitete Zellkulturflasche gefüllt. Die Zelldichte wurde mikroskopisch überprüft, die Zellkulturflasche danach in den Inkubator gelegt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Myozyten-Mediums zur Kultivierung der HL-1-Zellen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Herstellung</u>
Supplementiertes Claycomb Medium („Myozyten- Medium“)	Claycomb Medium (ohne Mg^{2+} , ohne Ca^{2+})		pH auf 7,4 titrieren und steril filtrieren
	Fetales Kälberserum	10 %	
	Penicillin /Streptomycin	100 μ g/ml	
	Norepinephrin (10 mM Stammlösung)	0,1 mM	
	L-Glutamin (200 mM Stocklösung)	2 mM	

(Bezugsquelle und Artikelnummer im Anhang)

3.8.3 Subkultivierung / Passagieren der Kultur

Zum Erhalt der Kultur erfolgte ein Mediumwechsel alle 24 Stunden. Zuvor wurde die Zelldichte unter dem Mikroskop überprüft. Bei entsprechender Zelldichte, meist nach 3 bis 4 Tagen in Kultur, wurden die atrialen Myozyten passagiert:

Nach Beschichtung der Platten wurde die Zellkulturflasche mit den kultivierten HL-1-Zellen mit 3 ml erwärmtem DPBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung) gespült und zweimal mit Trypsin-EDTA (jeweils 3 ml) versetzt und inkubiert (1 bzw. 2 Minuten). Kräftiges Klopfen auf die Seiten der Kulturflaschen löste die noch adhärenen atrialen Myozyten. Erwärmtes Myozyten-Medium wurde zugegeben, um die Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen zu überführen. Nach Zentrifugation mit 500 xg für 5 Minuten, wurde der Überstand entfernt und das Pellet aus HL-1-Zellen in Myozyten-Medium resuspendiert.

Jeweils die Hälfte der Zellsuspension wurde in eine vorbereitete Zellkulturflasche gegeben und die Zelldichte mikroskopisch kontrolliert. Die zwei so erhaltenen Kulturen wurden wie oben beschrieben versorgt.

3.8.4 Kryokonservierung einzelner Kulturpassagen

Zur Sicherung einzelner Zellpassagen wurden die Zellen, wie oben beschrieben, in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in unmittelbar zuvor angesetztem Einfrier-Medium (s. Tabelle 9) resuspendiert und im Mikroreaktionsgefäß im Kühlbehälter Nalgene® Cryo in einem -80 °C kalten Eisschrank um jeweils 1 °C/Stunde heruntergekühlt. Nach 24 h wurde das Mikroreaktionsgefäß zur Dauerlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Einfriermediums zur Kryokonservierung

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Herstellung</u>
Einfriermedium	Fetales Kälberserum	95 %	Kurz vor Gebrauch ansetzen
	Dimethylsulfoxid	5 %	

(Bezugsquelle und Artikelnummer im Anhang)

3.9 Kokultur von ICN und atrialen Myozyten

Um die Interaktion der atrialen Myozyten und der ICN zu untersuchen, wurde eine Kokultur aus diesen beiden Zellarten angelegt. Das Neuritenwachstum wurde als Parameter für die Interaktion der Zellen untersucht.

Die ICN wurden wie zuvor beschrieben isoliert und für 48 Stunden im Inkubator belassen. Eine Kulturflasche mit atrialen Myozyten wurde passagiert (s. 3.8). Zur Bestimmung der Zelldichte der Lösung wurde ein geringer Anteil der Lösung mit Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dadurch konnte die Gesamtzahl annähernd ermittelt werden. Es konnten so ca. 5.000 atriale Myozyten pro Well zu den ICN zugegeben werden. Die Länge der Neuriten der ICN wurde alle 24 Stunden dokumentiert. Die Hypoxie der Kokultur wurde analog zur Monokultur 48 Stunden nach Zugabe der atrialen Myozyten (= 96 h nach Isolation) durchgeführt. Abbildung 9 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf.

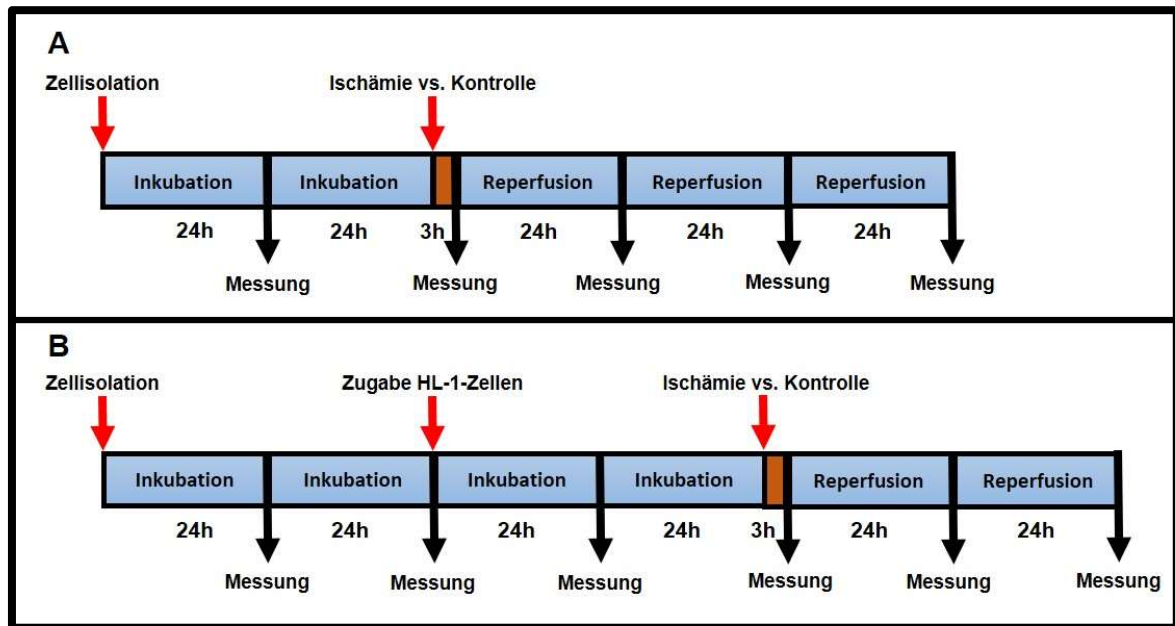


Abbildung 9: Zeitplan der Isolation der ICN

Nach Isolation der ICN aus dem epikardialen Fettgewebe werden diese für 48 h inkubiert bzw. kultiviert. Die Neuritenlänge wird alle 24 Stunden mikroskopisch dokumentiert (Messung). Nach 48 h bzw. bei Zugabe von HL-1-Zellen nach 96 h in Kultur werden die ICN einer dreistündigen Ischämie mit anschließender Reperfusion ausgesetzt. Parallel wird jeweils das Neuritenwachstum einer Kontrollgruppe ohne Hypoxie dokumentiert.

A) Monokultur der ICN mit Hypoxie 48 h nach Isolation

B) Kokultur der ICN mit Zugabe der HL-1-Zellen 48 h nach Isolation sowie Hypoxie 96 h nach Isolation.

Alle Interventionen an der Zellkultur sind mit roten, alle Messungen mit schwarzen Pfeilen zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt.

3.10 Statistische Auswertung

Alle Variablen sind als Mittelwert $\pm$ Standardfehler, Zähler (n) oder Prozentwerte angegeben. Zum Vergleich der Neuritenlängen der unterschiedlichen Gruppen und unterschiedlichen Zeiten wurden die gemessenen Zellpopulationen zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Da der Großteil der Gruppen keine Normalverteilung aufwies, war ein ANOVA-Test nicht möglich. Es wurde daher der Kruskal-Wallis-Test, anschließend der Mann-Whitney U-Test zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander verwendet. Falls die Gruppen normalverteilt waren, wurde zum Einzelvergleich der unabhängige t-Test angewandt. Es wurde eine statistische Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Zur Auswertung der Statistik wurden die Statistikprogramme Graph-Pad Prism und IBM SPSS Statistics sowie für die Erfassung und Dokumentation der Daten Microsoft Excel verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Histologische Untersuchung

Zur Identifizierung und Lokalisierung der ICN wurden fünf Mäuseherzen, wie unter 3.2 beschrieben, entnommen, in Paraffin eingebettet, geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Abbildung 10 zeigt einen Sagittalschnitt durch das Herz auf Höhe des Herzhilums HE gefärbt. Die Übersichtsaufnahme (Bild A) diente zur Orientierung, erlaubte aber noch keine genaue Differenzierung des Gewebes. Erst bei 100-facher Vergrößerung (Bild B) war im Fettgewebe (F) zwischen *Vena cava superior* (VCS), *Truncus pulmonalis* (TP) und Myokard (My) eine ovale bis spindelförmige Struktur mit einem dünnen Ausläufer zum Myokard (*) erkennbar. Sie bestand aus relativ großen, ovalen bis rundlichen Zellen, den Nervenzellkörpern (NZK), und den sie umgebenden, relativ kleinen Satellitenzellen (SZ) (Bild C). Das gesamte histologische Erscheinungsbild (Aufbau, Lage, Färbeverhalten) wies auf ein ICG hin.

Es wurden bei allen untersuchten Herzen so aufgebaute Ganglien in ähnlicher Lokalisation gefunden: im Fettgewebe (Fe) zwischen Bronchus (Br), *Truncus pulmonalis* (TP) und Pulmonalvenen (Pve) (s. Abbildung 11) bzw. linkem Vorhof (LA) und Aorta (Ao) (s. Abbildung 12). Die Ganglien präsentierten sich als länglich-ovale bis zigarrenförmige Strukturen im epikardialen Fettgewebe und beinhalteten große, ovale, randständig gelegene Nervenzellkörper mit basophilem Zytoplasma. Weiterhin fanden sich ebenfalls stark basophil gefärbte, die Nervenzellkörper umgebende, kleine Satellitenzellen sowie schwach basophile Nervenfasern im Zentrum der Ganglien. Die Nervenzellkörper waren durch eine dünne Kapsel vom umgebenden Gewebe abgegrenzt. Es waren prominente, stark basophile *Nucleoli* in blassen Zellkernen zu erkennen, in einigen Zellen konnten sogar zwei *Nucleoli* gefunden werden (s. Abbildung 11-13).

Die Zahl der Ganglien variierte zwischen den untersuchten Herzen: So konnten z. T. bis zu drei verschiedene Ganglienanschnitte an einem Herzen gefunden werden (Abbildung 11 B-F). Ebenso konnte der *Nervus vagus* jeweils kranial der intrakardialen Ganglien meist in unmittelbarer Nähe zum Ösophagus gefunden werden (s. Abbildung 13).

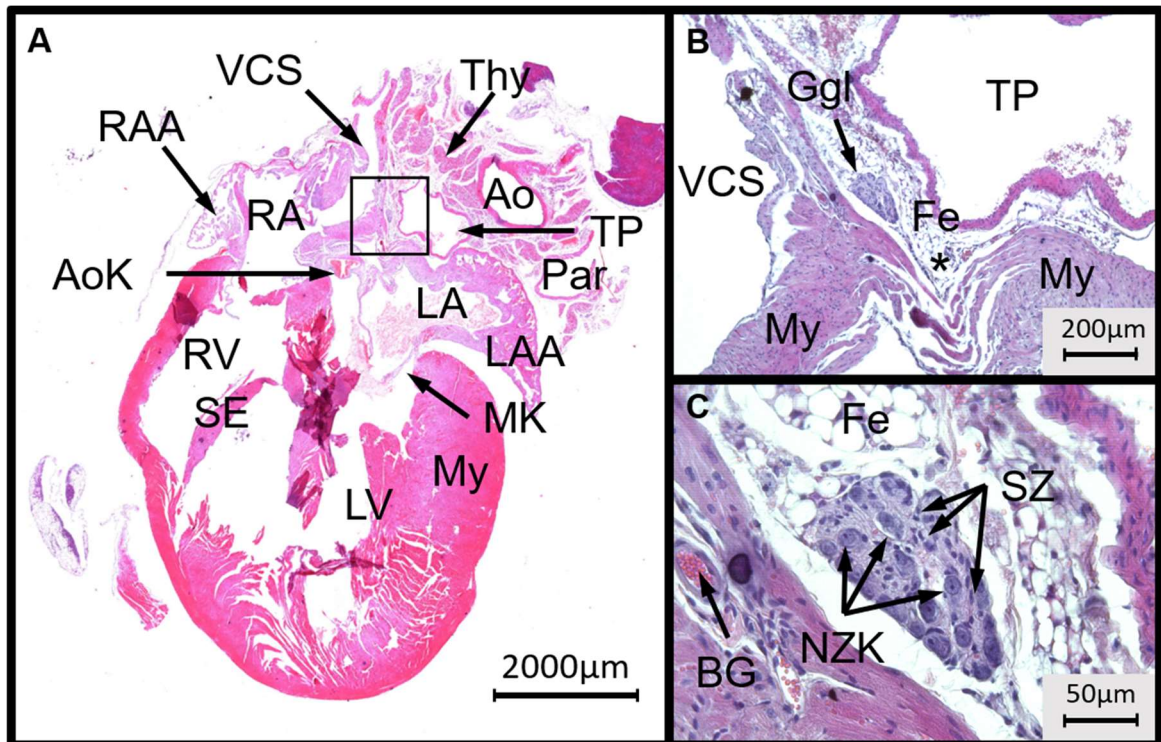


Abbildung 10: Ganglienlokalisierung im epikardialen Fettgewebe

HE gefärbter Längsschnitt des Herzens durch das Herzhilum. Erkennbar sind rechter und linker Ventrikel (RV bzw. LV) mit Septum (SE) sowie rechtes und linkes Atrium (RA bzw. LA) und rechtes bzw. linkes Herzohr (RAA bzw. LAA). Weiterhin finden sich Anschnitte der Mitralklappe (MK), der Aortenklappe (AoK), von Thymus (Thy), Aorta (Ao), *Truncus pulmonalis* (TP), *Vena cava superior* (VCS) und einer Pulmonalarterie (Par) (Bild A). Das intrakardiale Ganglion (Ggl) ist im epikardialen Fettgewebe (Fe) zwischen *Truncus pulmonalis* (TP), *Vena cava superior* (VCS) und Myokard (My) gelegen (Bild B). Gut erkennbar sind die großen ovalen Nervenzellkörper (NZK) und die kleinen Satellitenzellen (SZ) des Ganglions sowie ein langer schmaler Ausläufer (*) zum Myokard. Auch ein Blutgefäß (BG) findet sich in unmittelbarer Nähe zum Ganglion (Bild C).

A: Längsschnitt durch das Herz auf Höhe des Herzhilums (Maßstab: 2.000 µm)

B: Vergrößerter Bereich aus A (s. Kasten): Lage des intrakardialen Ganglions (Maßstab: 200 µm)

C: Aufbau des Ganglions (Maßstab: 50 µm)

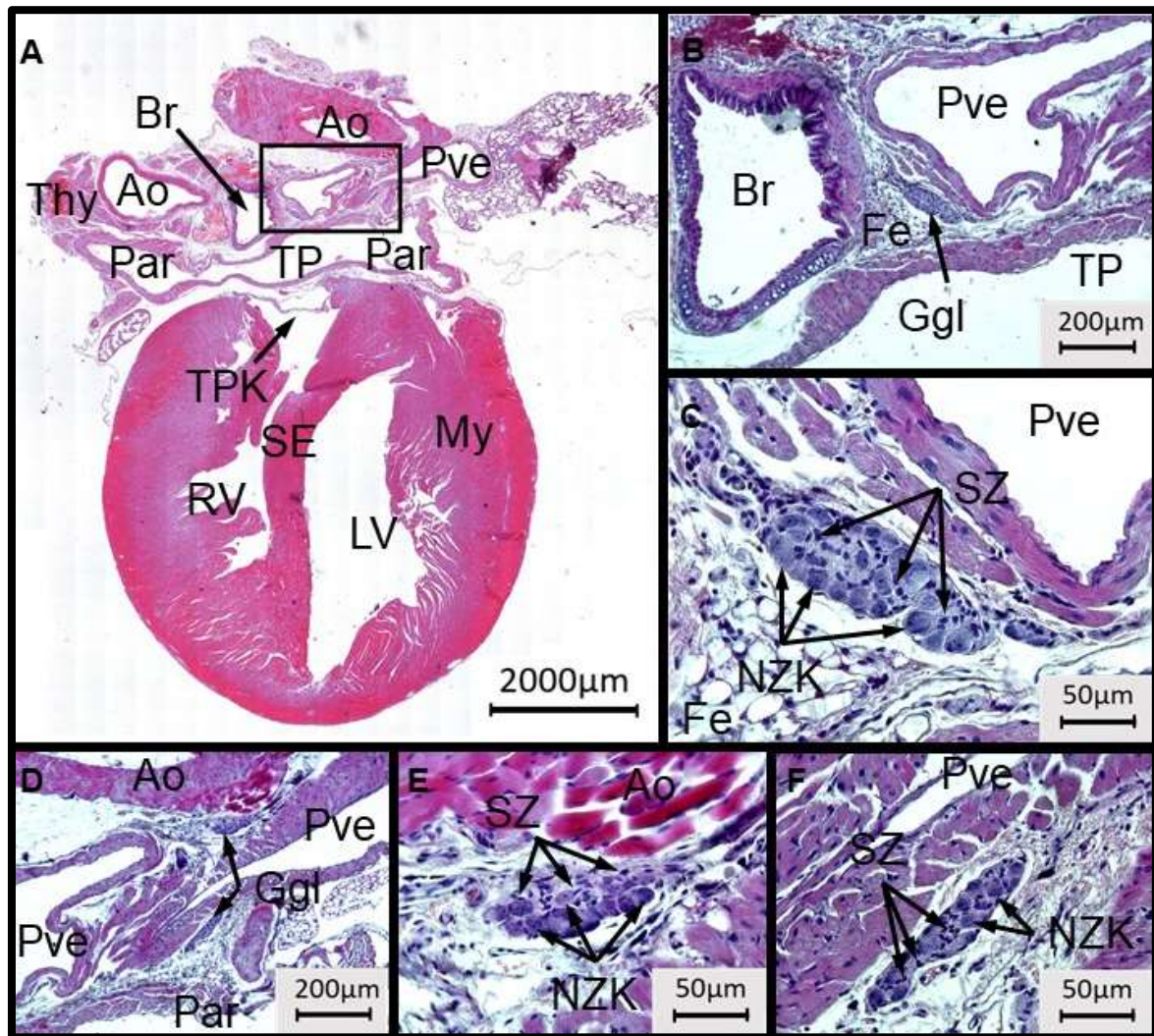


Abbildung 11: Mehrfachanschnitt von Ganglien an den Pulmonalvenen

HE gefärbter Längsschnitt des Herzens zur Identifizierung und Lokalisierung weiterer Ganglien.

In der Übersichtsaufnahme (Bild A) sind *Truncus pulmonalis* (TP) mit Pulmonalarterien (Par) sowie zwei Anschnitte von Pulmonalvenen (Pve) und Aorta (Ao) zu erkennen (Bild A). Es zeigen sich mehrfache Anschnitte intrakardialer Ganglien (Ggl) (Bild B-F). Diese befinden sich zwischen den Pulmonalvenen (Pve) und *Truncus pulmonalis* (TP) bzw. Bronchus (Br), Pulmonalvene und *Truncus pulmonalis* im epikardialen Fettgewebe (Fe). Die Ganglien sind aus Nervenzellkörpern (NZK) und Satellitenzellen (SZ) aufgebaut und variieren in ihrer Form bzw. Größe. Die NZK liegen vorrangig am Rand des Ganglions.

A: Längsschnitt durch das Herz auf Höhe des Herzhilums (Maßstab: 2.000 µm)

B: Ausschnittvergrößerung aus A: Lage eines intrakardialen Ganglions (Maßstab: 200 µm)

C: Detailaufnahme eines Ganglions zwischen Pulmonalvene und Bronchus (Maßstab: 50 µm)

D-F: weitere Anschnitte von intrakardialen Ganglien zwischen den Pulmonalvenen (D Maßstab: 200µm, E und F Maßstab 50 µm)

(Rechtes Herzohr (RAA), linkes Herzohr (LAA) Thymus (Thy) Rechter Ventrikel (RV), Linker Ventrikel (LV) Septum (SE) Linkes Atrium (LA), Rechtes Atrium (LA), Trikuspidalklappe (TPK))

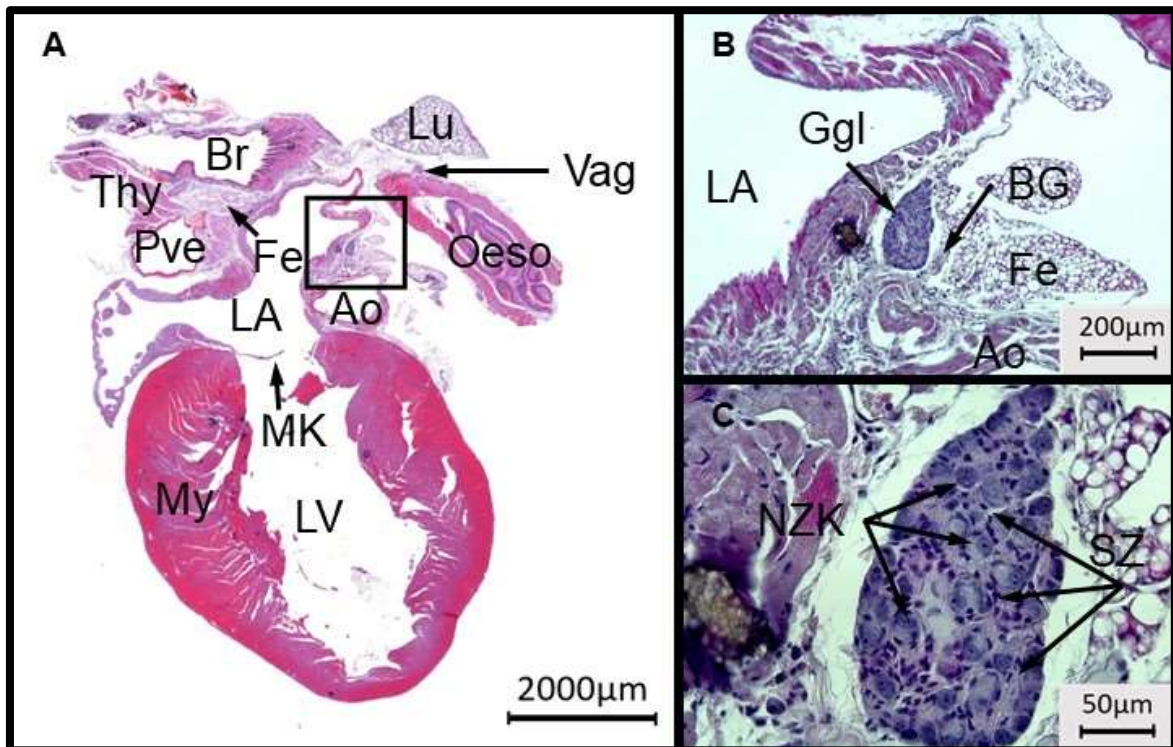


Abbildung 12 : Intrakardiales Ganglion zwischen linkem Vorhof und Aorta

HE gefärbter Längsschnitt des Herzens mit bereits in der Übersichtsaufnahme erkennbarem intrakardialen Ganglion (Ggl) zwischen Aorta (Ao) und linkem Vorhof (LA) bzw. Myokard (My). Weiter kranial ist der *Nervus vagus* (Vag) zwischen Lunge (Lu) und Ösophagus (Oeso) sichtbar (Bild A). Das ovale, 251 x 121 µm große Ganglion liegt dem Myokard an, ist auf der anderen Seite von epikardialen Fettgewebe (Fe) umgeben.

A: Querschnitt durch das Herz auf Höhe des Herzhilums (Maßstab: 2.000 µm)

B: Ausschnitt aus A: Lage des intrakardialen Ganglions (Maßstab: 200 µm)

C: Aufbau des Ganglions mit Nervenzellkörpern (NZK) und Satellitenzellen (SZ) (Maßstab: 50 µm)

(linkes Herzohr (LAA), Thymus (Thy), Linker Ventrikel (LV), Lunge (Lu)).

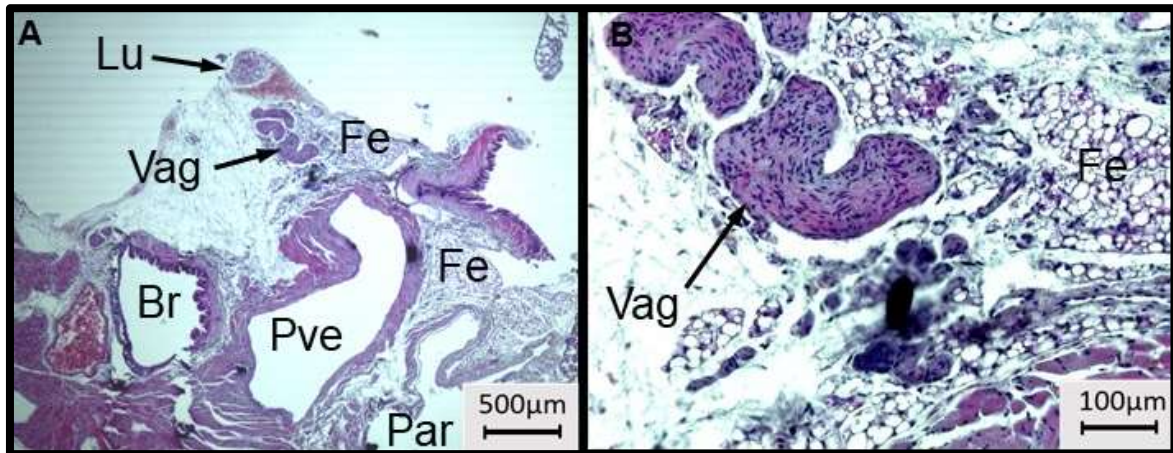


Abbildung 13: Abgrenzung der Ganglien zum *Nervus vagus*

HE gefärbter Anschnitt des *Nervus vagus* (Vag) *kranial* einer Pulmonalvene (Pve). Der *Nervus vagus* verläuft kranial der gezeigten Ganglien (s. a. Abbildung 11) und liegt zwischen Lungengewebe (Lu) und epikardialen Fettgewebe (Fe) sowie ebenfalls kranial der Pve und eines Bronchus (Br). Weiterhin zu erkennen ist eine Pulmonalarterie (Par) unterhalb der Pve (Bild A). Die histologische Struktur des *Nervus vagus* unterscheidet sich von der der Ganglien: So sind rötlich gefärbte, gewellt verlaufende Nervenfaserbündel und bläuliche Kerne von Schwann-Zellen erkennbar (B).

A: Übersichtsaufnahme zur Lage des *Nervus vagus* (Maßstab: 500 µm)

B: Aufbau des *Nervus vagus* im Mehrfachanschnitt im Detail (Maßstab: 100 µm)

4.2 Immunhistochemische Analyse

Die aufgefundenen Ganglien wurden zur genaueren Charakterisierung immunhistochemisch gegen Tyrosinhydroxylase (TH), beta-III-Tubulin (bIII) und Neurofilament (NF) gefärbt.

Abbildung 14 zeigt eine immunhistochemische Färbung gegen Tyrosinhydroxylase und Neurofilament zusammen mit einer Zellkernfärbung (Hoechst) und einer Negativ-Kontrolle (ohne primären Antikörper). Zur Orientierung ist ein benachbarter, HE gefärbter Schnitt dargestellt. Auf diesem ist ein Ganglion zwischen *Truncus pulmonalis* und Pulmonalvene sowie der *Nervus vagus* kranial der Pulmonalvene zu erkennen. Auf diesen Bereich des Herzens wurde sich daher bei der immunhistochemischen Untersuchung fokussiert.

Es zeigten sich zwei größere, spindelförmige Ansammlung NF-exprimierender Zellen direkt zwischen *Truncus pulmonalis* und Pulmonalvene, entsprechend der Position des Ganglions. Von einer der beiden Ansammlungen zog ein länglicher, fadenförmiger Ausläufer in Richtung Myokard bzw. zur Herzbasis (Bild G). In gleicher

Anordnung waren gegen TH gefärbte Zellen zu erkennen, allerdings in relativ geringerer Zahl (Bild H). Vor allem kleine Zellen exprimierten NF (Bild L), dagegen zeigten größere, ovale Zellen eine Fluoreszenz nach Färbung gegen TH. Letztere waren nicht im beschriebenen Ausläufer erkennbar (Bild M). In der Überlagerung der Bilder (*Merge*) wurde deutlich, dass die Zellen entweder NF oder TH exprimierten, jedoch nie beides (Bild N). Eine nur durch erhöhte Zelldichte hervorgerufene Fluoreszenz konnte durch die Zellkernfärbung ausgeschlossen werden (Bild F). Eine zweite Ansammlung NF-positiver, aber TH-negativer Zellen oberhalb der Pulmonalvene war vereinbar mit dem Verlauf des *Nervus vagus* an dieser Stelle (Bild G). Durch die nicht-fluoreszierende Negativ-Kontrolle war eine Autofluoreszenz bzw. nicht durch die immunhistochemische Färbung hervorgerufene Fluoreszenz der Zellen ausgeschlossen worden (Bild B-E).

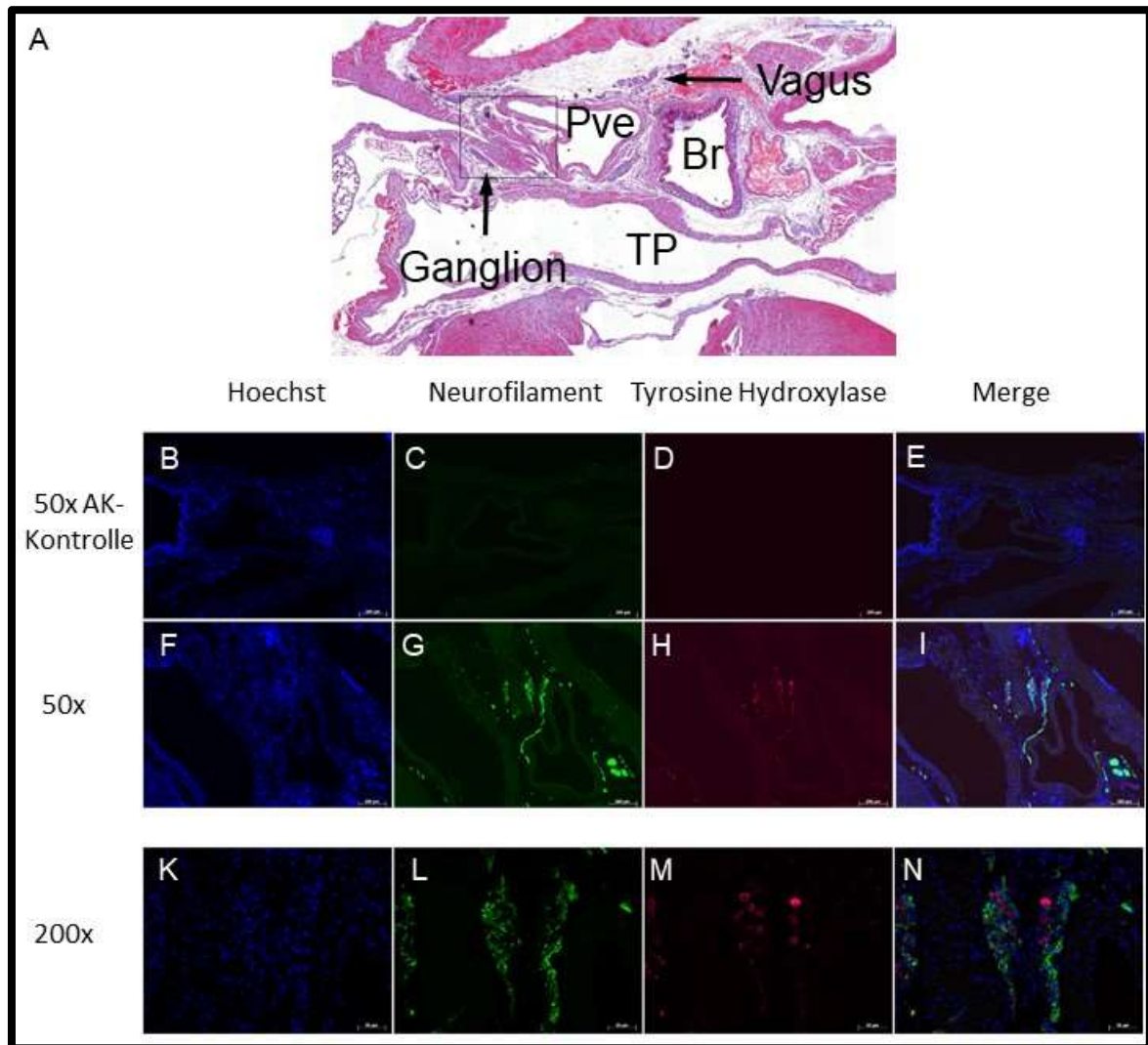


Abbildung 14: Immunhistochemische Untersuchung des epikardialen Fettgewebes zwischen Pulmonalvene und *Truncus pulmonalis*

Die Region zwischen Pulmonalvenen und *Truncus pulmonalis* am Herzhilum wurde immunhistochemisch auf die Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) sowie Neurofilament (NF) untersucht. Bild G und L zeigen das mit *rabbit-anti-TH* und *goat-anti-rabbit* gemessene Signal. Das mit *chicken-anti-NF* und *goat-anti-chicken* detektierte Signal ist in Bild H & M zu sehen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Die Zusammenführung der Signale (*Merge*) ist auf den Bildern E, I und N zu sehen, dabei ist NF grün, TH rot und Hoechst blau dargestellt. Die Negativ-Kontrolle (Bilder B-E) wurde ohne Zusatz des primären Antikörpers durchgeführt. Maßstab 200 µm bei 50 x Vergrößerung (Bilder B-I) bzw. 50 µm bei 200 x Vergrößerung (Bilder K-N)

Es wurden weitere Ganglien immunhistochemisch mit höherer mikroskopischer Auflösung zur besseren Differenzierung der Zellen untersucht:

Abbildung 15 stellt die Ergebnisse von drei weiteren Färbungen gegen TH und NF bzw. blII dar:

Die Übersichtsaufnahme (Bild A) zeigt einen HE gefärbten Längsschnitt durch das Herz. Zu erkennen ist ein angeschnittenes Ganglion zwischen linkem Vorhof (LA) Aorta (Ao) und Ösophagus (Oeso). Etwas weiter kranial, in Nachbarschaft zu einem Lungenanschnitt, ist der *Nervus vagus* zu erkennen.

Im Bereich des Ganglions war eine, seiner Form entsprechend verstärkte Fluoreszenz zu erkennen, die eine Expression von NF in fast allen angeschnittenen Zellen anzeigte (Bild C). Nur zwei Zellen, davon eine große, ovale Zelle mit ausgesparter Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns, waren positiv gegenüber TH. Diese befanden sich am unteren Pol des Ganglions (Bild D). Die Zellkernfärbung (Hoechst) schloss eine verstärkte Fluoreszenz durch Überlagerung bzw. erhöhte Dichte der Zellkerne aus. Durch das Zusammenführen der Einzelbilder (*Merge*) ließ sich erkennen, dass auch diese Ganglienzellen entweder eine Expression von TH oder von NF aufwiesen.

Die weiteren Bilder anderer untersuchter Ganglien zeigen dies ebenso: So ist in Bild G ein starkes Fluoreszenzsignal durch kleine, gegen NF gefärbte Zellen sichtbar. Dabei erstreckte sich die Fluoreszenz relativ diffus innerhalb der Fläche des Ganglions. Es waren viele große, ovale Zellen mit großem Zellkern zu erkennen, die durch eine TH-Expression auffielen (Bild H). Wiederum zeigte das *Merge*, dass keine Zelle gleichzeitig gegen TH und NF anfärbbar war, alle Zellen jedoch jeweils einen der beiden Marker aufwiesen. Bild L zeigt, dass bIII ähnlich wie NF in den kleinen Zellen des Ganglions vorhanden war, jedoch fluoreszierten auch vereinzelt größere, oval geformte Zellen mit großem Zellkern. Eine Koexpression von TH und bIII konnte durch das *Merge* nicht belegt werden, es verhielt sich damit wie bei TH und NF: Entweder wurde bIII oder TH exprimiert. Außerdem fielen nicht fluoreszierende, ebenfalls randständige Zellen als dunkle Aussparungen im Ganglion auf (Bild I).

Festzuhalten war, dass die intrakardialen Ganglien aus großen, ovalen, TH-exprimierenden Zellen mit großem Zellkern und eher randständiger Lage sowie kleinen NF- bzw. bIII- exprimierenden Zellen aufgebaut waren. Weiterhin zeigten sich Zellen, die keinen der beiden Marker aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sprachen gegen eine Koexpression von TH und NF bzw. bIII.

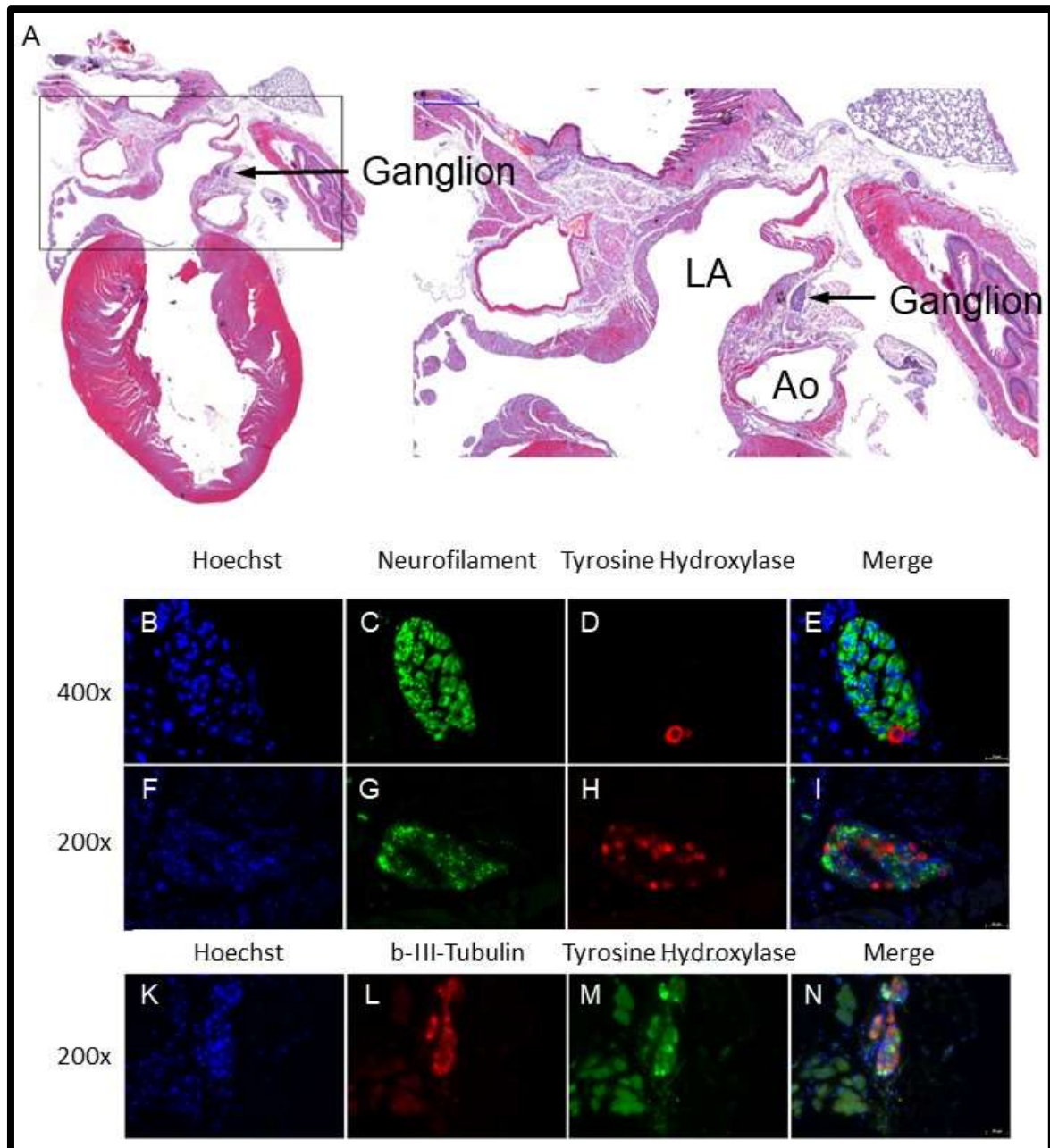


Abbildung 15: Immunhistochemie verschiedener intakardialer Ganglien mit Neurofilament, beta-III-Tubulin und Tyrosinhydroxylase

Das im HE gefärbten Schnitt (Bild A) gefundene Ganglion wurde immunhistochemisch auf Expression von Tyrosinhydroxylase (TH), Neurofilament (NF) bzw. beta-III-Tubulin (bIII) analysiert. Die Bilder C und G zeigen das durch *rabbit-anti-TH* und *goat-anti-rabbit* gemessene Signal, D und H dagegen das mit *chicken-anti-NF* und *goat-anti-chicken* detektierte Signal. Die Zellkerne sind mit Hoechst gefärbt. Die Zusammenführung der Signale (*Merge*) ist auf den Bildern E und I zu sehen, dabei ist NF grün, TH rot und Hoechst blau dargestellt. Auf den Bildern L bzw. M ist die Expression von bIII durch *Mouse anti β -III-tubulin* und *goat-anti-mouse* bzw. von TH durch *rabbit-anti-TH* und *goat-anti-rabbit* dargestellt. Das *Merge* (Bild N) zeigt TH grün, bIII blau und Hoechst blau. Eine Negativ-Kontrolle ohne Zugabe des primären Antikörpers wurde durchgeführt. Die Maßstäbe betragen bei 400 x Vergrößerung 25 μ m bzw. bei 200 x Vergrößerung 50 μ m.

4.3. Isolation der ICN

Nachdem intrakardiale Ganglien bzw. ICN im epikardialen Fettgewebe nachgewiesen werden konnten, wurde aus dieser Erkenntnis eine Isolationstechnik entwickelt. Dabei wurde nach Entnahme des Herzens das epikardiale Fettgewebe entlang der Pulmonalvenen, der Aorta sowie der *Vena cava superior*, an der Hinterwand des linken Vorhofs und z. T. am rechten Vorhof abpräpariert (s. Abbildung 5). Die ICN wurden, wie im Methodenteil unter 3.5. beschrieben, isoliert und kultiviert.

Das *Preplating* schien die Qualität der Isolation deutlich zu verbessern: Es fand sich eine insgesamt geringere Dichte an Zellen unabhängig des Typs. Die vorhandenen Zellen zeigten zum Großteil die morphologischen Charakteristika von Neurozyten (Abbildung 16). Dadurch wäre trotz geringerer Gesamtzahl an isolierten Zellen, die Ausbeute an ICN pro Isolation erhöht. Dies galt auch für die abgewandelte Variante mit anderer Beschichtung des Haupt-*Wells*.

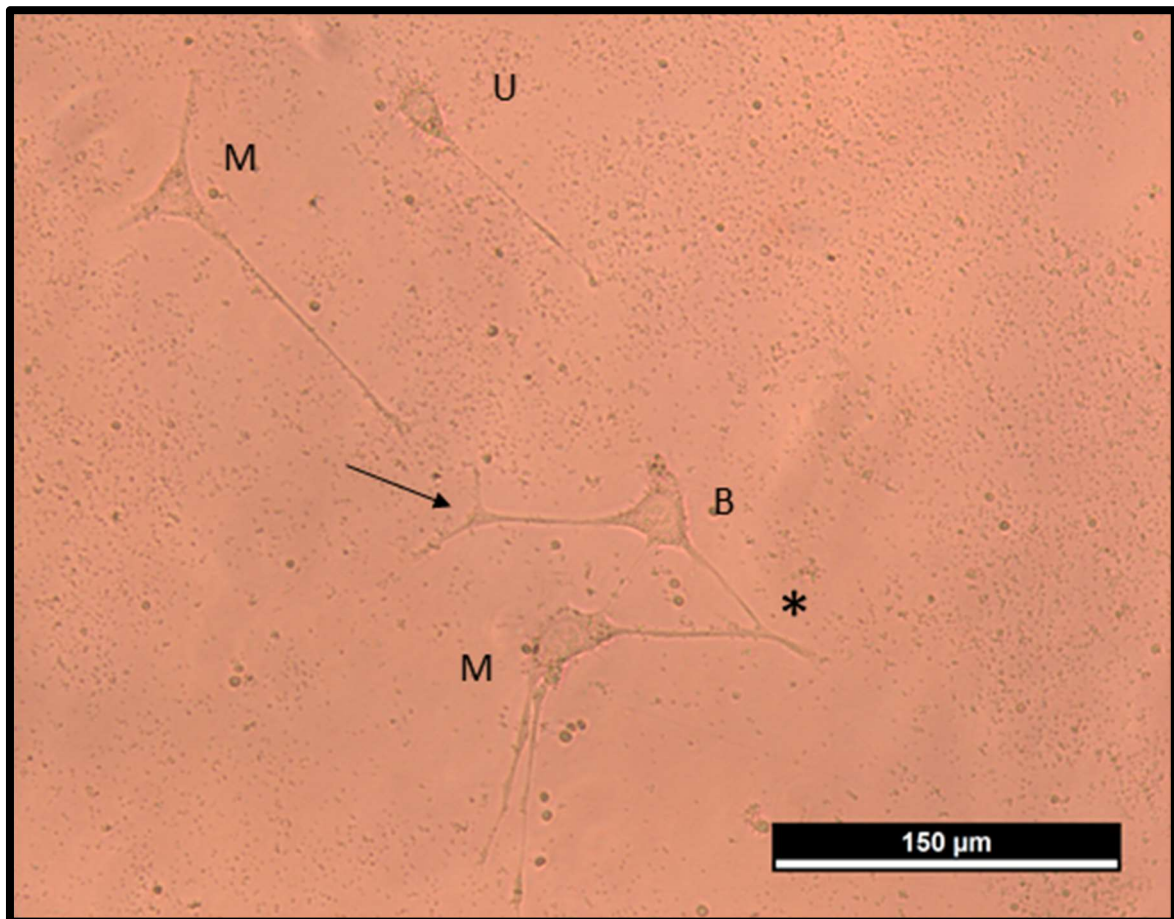


Abbildung 16: ICN-Kultur mit Preplating

Durch das Preplating selektionierte ICN verschiedenen Typs: Unipolare (U), Bipolare (B) und Multipolare (M) Neurone sind deutlich zu erkennen. Es werden auch Verzweigungen der Neuriten (Pfeil) und Verbindung zwischen den ICN (*) sichtbar. Maßstab 150µm

Es wurde sich gegen das Preplating entschieden, da in den meisten Fällen bereits nach wenigen Stunden die Zellen in die Apoptose übergangen und nur in circa 20 % der Fälle eine ICN-Kultur mit vitalen, wachsenden Neuronen und einem geringen Anteil an nicht-neuronalen Zellen gewonnen werden konnte.

Durch eine Optimierung des Isolationsprozesses (u. a. kürzere Isolationsdauer, vorsichtigere Resuspension) und Entwicklung des Neurozyten-Mediums (s. 3.2) konnte eine adäquate Isolationsqualität mit hoher Zahl an vitalen ICN in den verschiedenen Kulturgruppen auch ohne *Preplating* erzielt werden (s. Abbildung 17).

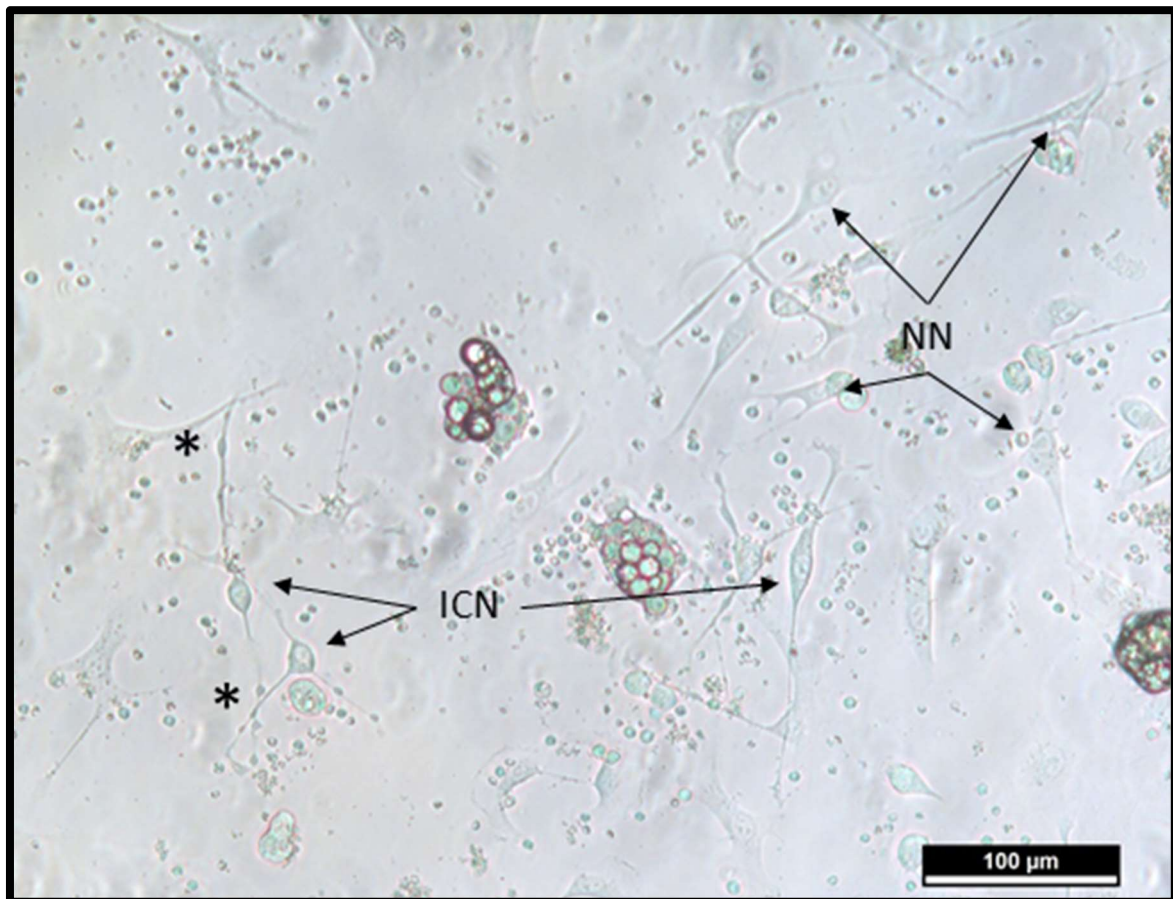


Abbildung 17: ICN-Kultur mit optimierter Isolation ohne *Preplating*

Aufnahme eines Kulturausschnitts nach Isolation anhand des optimierten Isolationsprotokolls. Es sind deutlich weniger nicht-neuronale Zellen (NN) sowie eine höhere Ausbeute an gut messbaren, intrakardialen Neuronen (ICN) vorhanden. Die Qualität des *Preplatings* in Bezug auf die ICN-Dichte kann nicht erreicht werden. Die ICN zeigen einen runden Nervenzellkörper mit unterschiedlicher Anzahl an Neuriten mit Varikositäten (*) in deren Verlauf. Maßstab 100 µm

4.4 Neuritenwachstum der ICN in Monokultur

Um den Einfluss von atrialen Myozyten und/oder Hypoxie auf die ICN bestimmen zu können, wurden in einem ersten Schritt Monokulturen der ICN unter Basisbedingungen angelegt und deren Neuritenlänge bestimmt (s. Abbildung 18, Bild A):

Die Isolation und Kultivierung der Neurone erfolgten wie unter 3.5 beschrieben. Es wurden insgesamt 1787 Neuriten vermessen (561 von uni-, 537 von bi- und 689 von multipolaren Neuronen).

Die Neuritenlänge stieg bei unipolaren und bipolaren Zellen bis zum 72 h-Zeitpunkt n. l. signifikant an ($p < 0,05$) und erreichte zu diesem Zeitpunkt ihren Höhepunkt

(81,94 ± 3,40 µm, unipolar bzw. 58,73 ± 2,13 µm, bipolar), bei den multipolaren Zellen war dies bereits 48 h n. I. zu sehen (36,20 ± 1,73 µm) (s. a. Tabelle 10).

Weitere Änderungen der Neuritenlänge der unipolaren Zellen waren nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Neuritenlänge der bi- und multipolaren ICN 96 h n. I. war signifikant geringer als zum 72 h- (bipolare und multipolare ICN) bzw. 120 h-Zeitpunkt (nur bipolare ICN), bei den unipolaren ICN war lediglich eine Tendenz im Vergleich zum 72 h-Zeitpunkt erkennbar ($p = 0,053$). Die Zahl der messbaren ICN war 24 h n. I. geringer als zu den darauffolgenden Messzeitpunkten, nach 96 h in Kultur sank die Zahl der gemessenen ICN durch eine höhere Dichte nicht-neuronaler Zellen. Dies war bei dieser und allen weiteren Untersuchungsgruppen gleichermaßen feststellbar.

Tabelle 10: Durchschnittliche Fortsatzlängen der ICN in Monokultur in µm (Mittelwert ± Standardfehler)

<u>Zeitpunkt nach Isolation</u>	<u>Unipolare ICN</u>	<u>Bipolare ICN</u>	<u>Multipolare ICN</u>
24 h	40,27 ± 2,48	34,03 ± 1,98	29,80 ± 3,24
48 h	59,23 ± 2,52	49,97 ± 2,07	36,20 ± 1,73
72 h	81,94 ± 3,40	58,73 ± 2,13	35,62 ± 1,26
96 h	73,70 ± 2,50	44,49 ± 2,07	32,81 ± 1,15
120 h	77,33 ± 3,63	54,68 ± 4,65	35,58 ± 3,06
p-Wert*	<0,0001	<0,0001	0,0799
*Kruskal-Wallis-Test			

4.5 Einfluss der atrialen Myozyten auf das Neuritenwachstum der ICN

Um den Einfluss der atrialen Myozyten auf das Neuritenwachstum der ICN zu bestimmen, wurden diese, wie unter 3.9 beschrieben, in einer Kokultur zusammengeführt und das Wachstum der Neuriten dokumentiert (s. Abbildung 18, Bild B). Es wurden insgesamt 1687 Neuriten vermessen (717 von uni-, 549 von bi- und 421 von multipolaren Neuronen).

Das Maximum der gemessenen Neuritenlänge erreichten die unipolaren und multipolaren ICN 48 h n. I. bzw. direkt im Anschluss an die Zugabe der atrialen Myozyten

($75,35 \pm 2,90 \mu\text{m}$, unipolar bzw. $39,82 \pm 1,95 \mu\text{m}$, multipolar) (s. a. Tabelle 11). Die bipolaren ICN taten dies dagegen erst zum 72h-Zeitpunkt, jedoch ohne signifikanten Unterschied zum 48h-Zeitpunkt ($58,38 \pm 2,74 \mu\text{m}$, 48 h n. I., $58,47 \pm 2,99 \mu\text{m}$, 72 h n. I., $p = 0,726$). Nach Zugabe der atrialen Myozyten war keine signifikante Änderung der Neuritenlänge bei unipolaren und bipolaren Neuronen festzustellen. Der Abfall der durchschnittlichen Neuritenlänge bipolarer ICN zwischen den Zeitpunkten 72h und 96 h n. I. war nicht signifikant ($58,47 \pm 2,99 \mu\text{m}$, 72 h n. I. gegen (gg.) $53,93 \pm 2,05 \mu\text{m}$, 96 h n. I., $p = 0,302$).

Die Neuritenlänge der multipolaren ICN veränderte sich durch Hinzufügen der atrialen Myozyten bis 96 h n. I. nicht signifikant. Zwischen dieser und der folgenden Messung (120 h n. I.) war der einzige signifikante Abfall der Neuritenlänge nach Zugabe der atrialen Myozyten messbar ($39,76 \pm 1,62 \mu\text{m}$, 96 h n. I. gg. $29,80 \pm 2,06 \mu\text{m}$, 120 h n. I., $p = 0,003$).

Tabelle 11: Durchschnittliche Neuritenlänge der ICN in Kokultur in μm (Mittelwert $\pm$ Standardfehler)

<u>Zeitpunkt nach Isolation</u>	<u>Unipolare ICN</u>	<u>Bipolare ICN</u>	<u>Multipolare ICN</u>
48 h	$75,35 \pm 2,90$	$58,38 \pm 2,74$	$39,82 \pm 1,95$
72 h	$72,25 \pm 2,75$	$58,47 \pm 2,99$	$35,74 \pm 1,57$
96 h	$72,37 \pm 2,08$	$53,93 \pm 2,05$	$39,76 \pm 1,62$
120 h	$66,92 \pm 2,54$	$51,80 \pm 2,14$	$29,80 \pm 2,06$
p-Wert*	$<0,0001$	$0,0003$	$0,0221$
*Kruskal-Wallis-Test			

4.6 Neuritenwachstum unter Hypoxie in der Monokultur

Der Effekt einer Hypoxie auf das Neuritenwachstum der ICN wurde in Monokultur untersucht (s. a. 3.7). Dabei wurden insgesamt 1247 Neuriten vermessen (459 von uni-, 398 von bi- und 390 von multipolaren Neuronen).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Abbildung 18 (Bild C) dargestellt: Die Neuritenlängen aller Zelltypen waren 72 h n. I. signifikant höher als unmittelbar nach Hypoxie ($\triangleq$ 48 h n. I.) ($p = 0,022$ für multipolare bzw. $p < 0,001$ für uni- und bipolare ICN) (s. a. Tabelle 12). Unipolare ICN besaßen ihre höchste Neuritenlänge

96 h n. l. ($81,96 \pm 2,65 \mu\text{m}$), bipolare und multipolare ICN zum 72 h-Zeitpunkt ($62,30 \pm 2,77 \mu\text{m}$, bipolar, bzw. $43,87 \pm 1,88 \mu\text{m}$, multipolar). Sowohl unipolare als auch bipolare ICN zeigten danach keine signifikanten Änderungen der Neuritenlänge. Ein signifikanter Abfall war dagegen zwischen dem 72 h- und 96 h-Zeitpunkt der multipolaren ICN erkennbar ($43,87 \pm 1,88 \mu\text{m}$, 72 h n. l. gg. $37,72 \pm 1,70 \mu\text{m}$, 96 h n. l., $p = 0,033$).

Tabelle 12: Durchschnittliche Neuritenlänge der ICN in Monokultur unter Hypoxie in μm (Mittelwert $\pm$ Standardfehler)

<u>Zeitpunkt nach Isolation</u>	<u>Unipolare ICN</u>	<u>Bipolare ICN</u>	<u>Multipolare ICN</u>
48 h	$60,94 \pm 2,52$	$43,72 \pm 1,89$	$36,59 \pm 1,82$
72 h	$79,84 \pm 3,07$	$62,30 \pm 2,77$	$43,87 \pm 1,88$
96 h	$81,96 \pm 2,65$	$55,75 \pm 2,41$	$37,72 \pm 1,70$
p-Wert*	$<0,0001$	$0,0003$	$0,0332$
*Kruskal-Wallis-Test			

4.7 Einfluss der Hypoxie auf das Neuritenwachstum in der Kokultur

Da sowohl die Hypoxie als auch die Zugabe von atrialen Myozyten das Neuritenwachstum der ICN veränderten, wurden diese beiden Einflussfaktoren in einem weiteren Experiment kombiniert. Es wurden hierbei insgesamt 1622 Neuriten vermessen (510 von uni-, 349 von bi- und 763 von multipolaren Neuronen).

Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 18 (Bild D) dargestellt:

Die unipolaren und bipolaren ICN erreichten ihre maximale Neuritenlänge 120 h n. l. ($80,19 \pm 43,84 \mu\text{m}$, unipolar, bzw. $60,33 \pm 32,22 \mu\text{m}$, bipolar). Dabei war der Unterschied zwischen dem 96 h- und 120 h-Zeitpunkt bei den unipolaren ICN signifikant ($66,28 \pm 4,52 \mu\text{m}$, 96 h gg. $80,19 \pm 3,74 \mu\text{m}$, 120 h, $p = 0,032$), bei den bipolaren ICN dagegen nicht ($54,61 \pm 2,51 \mu\text{m}$, 96 h gg. $60,33 \pm 2,74 \mu\text{m}$, 120 h, $p = 0,468$). Weitere Änderungen der Neuritenlänge waren bei beiden Zelltypen nicht signifikant. Die Neuriten der multipolaren ICN erreichen 144 h n. l. ihr vorläufiges Längenmaximum ($44,42 \pm 26,44 \mu\text{m}$). Dabei waren die Neuriten signifikant länger als 96 h bzw. 120 h n. l. ($34,81 \pm 1,24 \mu\text{m}$, 96 h n. l. gg. $44,42 \pm 1,44 \mu\text{m}$, 144 h n.

4. Ergebnisse

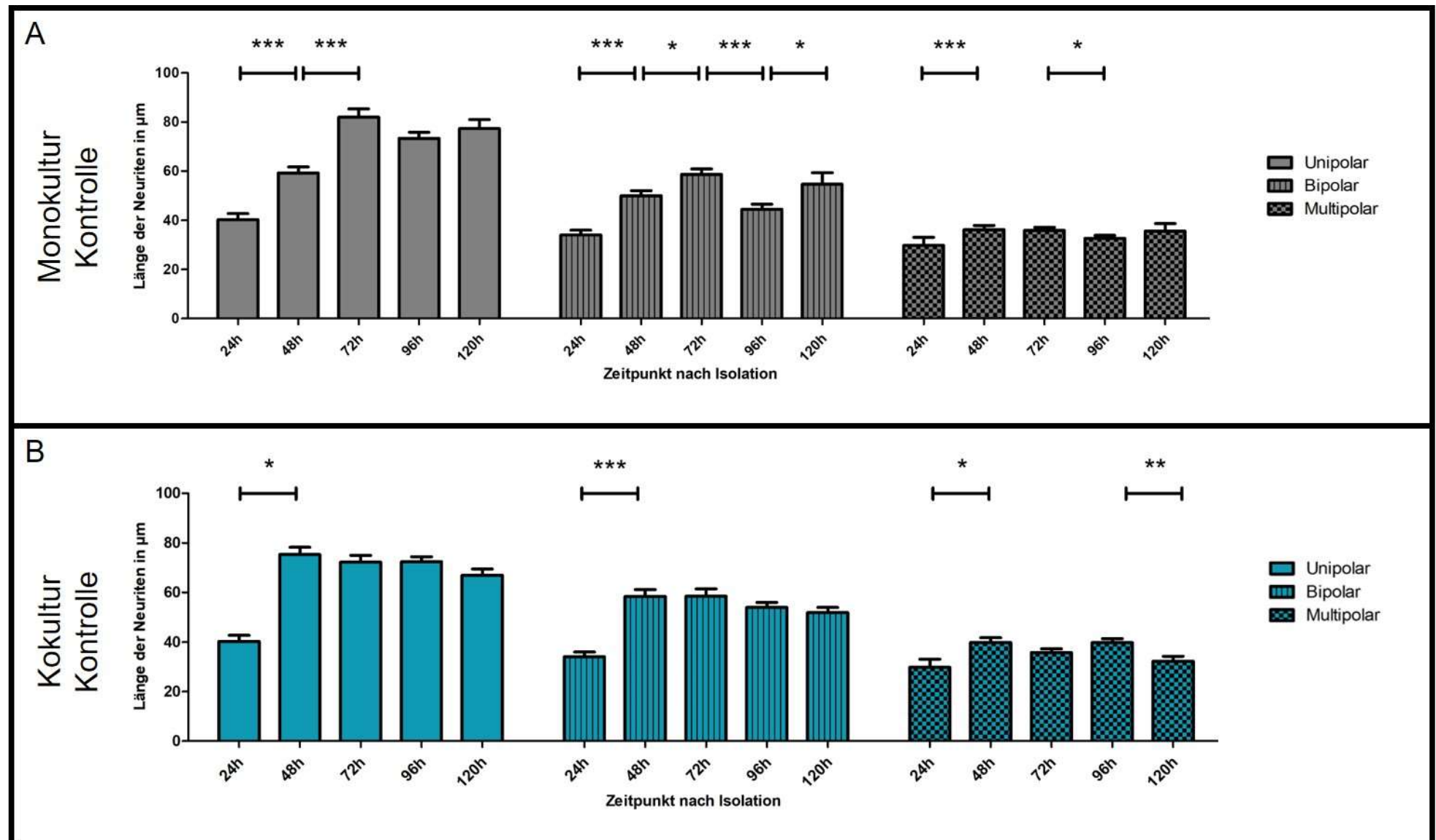
l., $p < 0,001$ bzw. $37,42 \pm 1,35 \mu\text{m}$, 120 h n. l. gg. $44,42 \pm 1,44 \mu\text{m}$, 144 h n. l., $p = 0,010$). Tabelle 13 stellt die gemessenen Neuritenlängen dar.

Tabelle 13: Durchschnittliche Neuritenlänge der ICN in Kokultur unter Hypoxie in μm (Mittelwert $\pm$ Standardfehler)

<u>Zeitpunkt nach Isolation</u>	<u>Unipolare ICN</u>	<u>Bipolare ICN</u>	<u>Multipolare ICN</u>
96 h	$66,28 \pm 4,52$	$54,61 \pm 2,51$	$34,81 \pm 1,24$
120 h	$80,19 \pm 3,74$	$60,33 \pm 2,74$	$37,42 \pm 1,35$
144 h	$78,82 \pm 3,13$	$55,98 \pm 2,43$	$44,42 \pm 1,44$
p-Wert*	0,0185	0,6292	0,0011
*Kruskal-Wallis-Test			

Beispielhafte Bilder der isolierten und gemessenen ICN in den verschiedenen Kulturgruppen finden sich im Anhang.

4. Ergebnisse



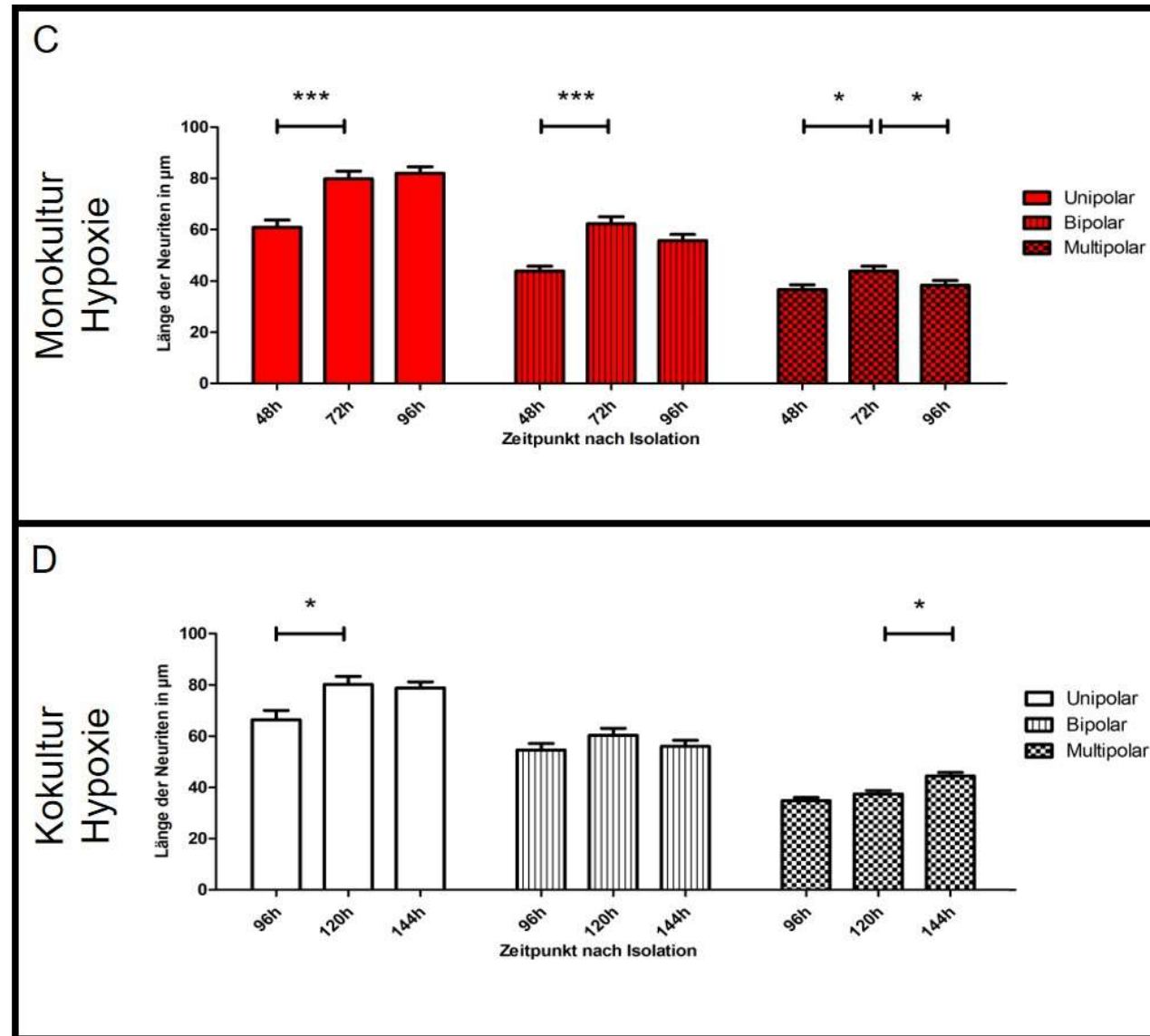


Abbildung 18: Neuritenlängen der verschiedenen Kulturformen im Verlauf

Die durchschnittliche Länge der Neuriten unipolarer (kein Muster), bipolarer (längs gestreift) und multipolarer (kariert) ICN wurde in den verschiedenen Kulturformen gemessen und mit dem jeweils vorherigen Zeitpunkt verglichen (Mittelwert + SEM, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die Monokultur ohne Hypoxie („Monokultur Kontrolle“, grau, Bild A) weist dabei bei allen Zelltypen einen Abfall der durchschnittlichen Längen nach anfänglichem Wachstum auf (Abfall zwischen 72h und 96h). Durch Zugabe der atrialen Myozyten („Kokultur Kontrolle“, türkis, Bild B) bleibt dieser Abfall aus, ferner werden die maximalen Neuritenlängen bei den uni- und bipolaren Zellen früher erreicht (48h gegenüber 72h in der Monokultur). Unter Hypoxie ist in der Monokultur („Monokultur Hypoxie“, rot, Bild C) zu Beginn ein signifikantes Neuritenwachstum auch der multipolaren Neurone, gefolgt von einem Längenabfall nur dieses Zelltyps sichtbar. Nur in der einer Hypoxie ausgesetzten Kokultur („Kokultur Hypoxie“, weiß, Bild D) kommt es nach initialem Anstieg zu einem weiteren, signifikanten Wachstum der Neuriten.

4.8 Vergleich der verschiedenen Kulturmethoden

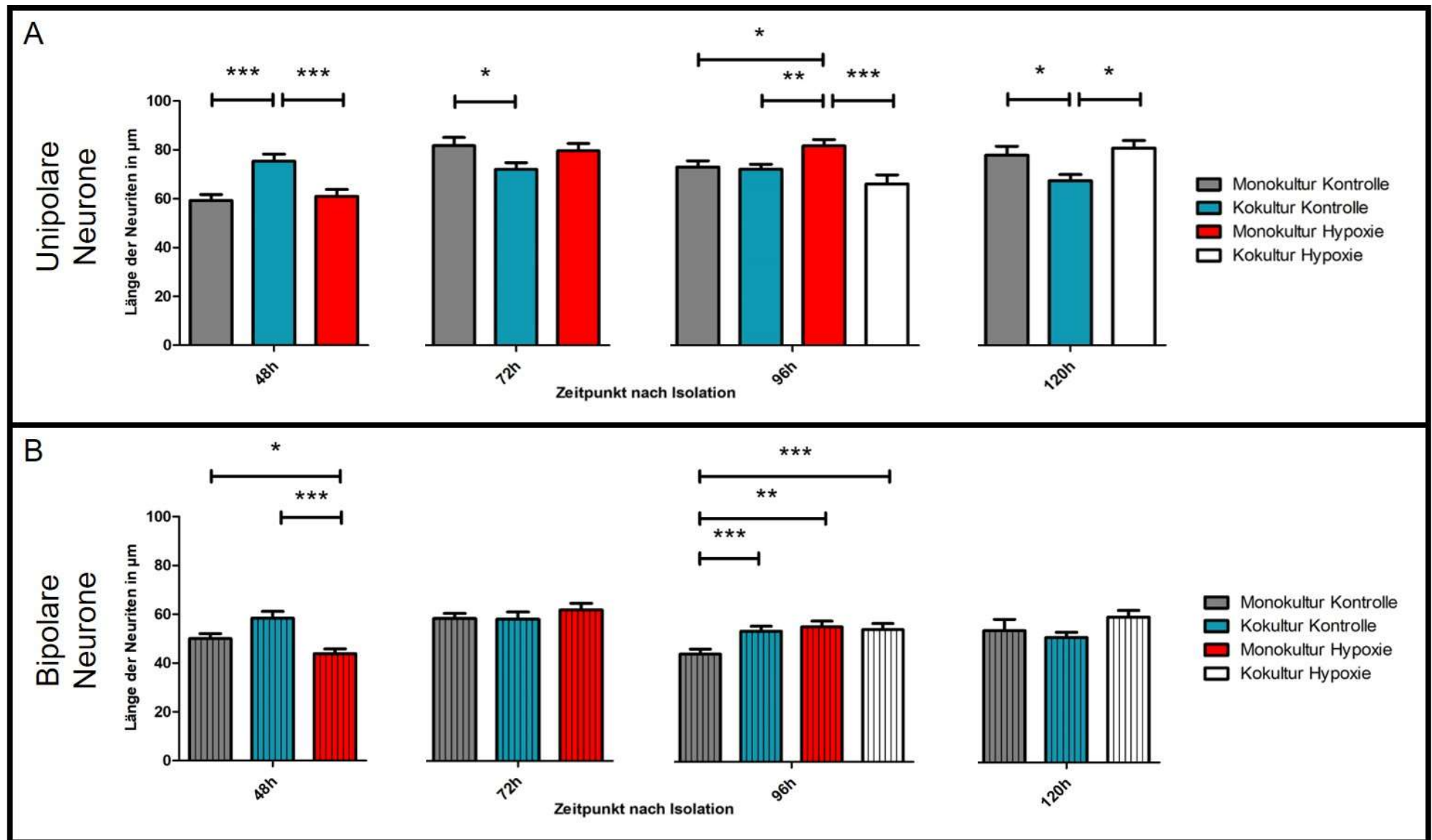
Der direkte Vergleich der Neuritenlängen zu den einzelnen Zeitpunkten ist aufgeteilt nach Kulturmethode (Monokultur gg. Kokultur bzw. Kontrolle gg. Hypoxie) in Abbildung 19:

Die Neuriten der unipolaren ICN der Kokultur mit atrialen Myozyten wiesen ab 48h n. I. keine signifikanten Längenänderungen zu den jeweils vorausgehenden Messpunkten auf und besaßen damit die größte Länge, verglichen mit den anderen Gruppen ($75,35 \pm 2,90 \mu\text{m}$ gg. $59,23 \pm 2,52 \mu\text{m}$, $p < 0,001$ Monokultur Kontrolle bzw. gg. $60,94 \pm 2,52 \mu\text{m}$, Monokultur Hypoxie, $p < 0,001$). Einen Messzeitpunkt später (72h n. I.) ist die Monokultur Kontrolle dagegen signifikant länger ($81,94 \pm 3,40 \mu\text{m}$, Monokultur Kontrolle gg. $72,25 \pm 2,75 \mu\text{m}$, Kokultur Kontrolle, $p = 0,046$). Im Gegensatz dazu besitzen die Neuriten der unipolaren ICN aus der Monokultur Hypoxie 96h n. I. die größte Länge ($81,96 \pm 2,65 \mu\text{m}$) und unterscheiden sich damit signifikant gegenüber allen anderen Gruppen ($73,70 \pm 2,50 \mu\text{m}$, Monokultur Kontrolle, $p = 0,014$ bzw. $72,37 \pm 2,08 \mu\text{m}$, Kokultur Kontrolle, $p = 0,007$ bzw. $66,28 \pm 4,52 \mu\text{m}$, Kokultur Hypoxie, $p < 0,001$). Zum 120h-Zeitpunkt weisen die Neuriten der Kokultur Kontrolle die geringste Länge auf ($66,92 \pm 2,54 \mu\text{m}$), es besteht ein signifikanter Unterschied gegenüber der Monokultur Kontrolle ($77,33 \pm 3,63 \mu\text{m}$, $p = 0,013$) sowie der Kokultur Hypoxie ($66,28 \pm 4,52 \mu\text{m}$, $p = 0,024$).

Die Neuriten der bipolaren ICN (Bild B) der Monokultur nach Hypoxiebehandlung weisen 48h n. I. die signifikant kürzeste Neuritenlänge auf ($43,72 \pm 1,89 \mu\text{m}$ gg. $49,97 \pm 2,07 \mu\text{m}$, Monokultur Kontrolle, $p = 0,024$ bzw. $58,38 \pm 2,74 \mu\text{m}$, Kokultur Kontrolle, $p < 0,001$), besitzen zum 72h-Zeitpunkt aber bereits die größte Neuritenlänge ($62,30 \pm 2,77 \mu\text{m}$), jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den anderen Gruppen ($58,73 \pm 2,13 \mu\text{m}$, Monokultur Kontrolle, $p = 0,429$ bzw. $58,47 \pm 2,99 \mu\text{m}$, Kokultur Kontrolle, $p = 0,528$). Im weiteren Verlauf der Messungen findet sich, aufgrund des signifikanten Abfalls innerhalb dieser Gruppe, ein signifikanter Unterschied zwischen der Monokultur Kontrolle und den anderen Gruppen. Es gibt keine weiteren signifikanten Längendifferenzen. Die Monokultur-Hypoxie-Gruppe verfügt 96h n. I. über die längsten Neuriten ($55,75 \pm 2,41 \mu\text{m}$), 120h n. I. haben die Neuriten der Kokultur Hypoxie die durchschnittlich größte Länge ($60,33 \pm 2,74 \mu\text{m}$), ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe der Kokultur besteht nicht ($p = 0,07$).

Ähnlich den unipolaren ICN besitzen die multipolaren ICN (Bild C) aus der Kokultur-Kontroll-Gruppe 48h n. l. eine größere Länge als die anderen Gruppen ($39,82 \pm 1,95 \mu\text{m}$ gg. $36,20 \pm 1,73 \mu\text{m}$, Monokultur Kontrolle, $p = 0,041$ bzw. $36,59 \pm 1,82 \mu\text{m}$, Monokultur Hypoxie, $p = 0,041$). Durch die Zunahme der Neuritenlänge im Vergleich zum 48h-Zeitpunkt (s. o.) stellt die Monokultur-Hypoxie-Gruppe die längsten Neuriten 72h n. l. ($43,87 \pm 1,88 \mu\text{m}$), mit signifikanter Längendifferenz zur Monokultur Kontrolle ($35,62 \pm 1,26 \mu\text{m}$, $p = 0,001$), nicht jedoch zur Kokultur Kontrolle ($35,74 \pm 1,57 \mu\text{m}$, $p = 0,064$). Die Kokultur Kontrolle weist 96h n. l. die größte Neuritenlänge auf ($39,76 \pm 1,62 \mu\text{m}$), signifikant verschieden zur Monokultur Kontrolle ($32,81 \pm 1,15 \mu\text{m}$, $p < 0,001$) und Kokultur Hypoxie ($34,81 \pm 1,24 \mu\text{m}$, $p = 0,031$). Auch unterscheidet sich die Monokultur ohne Signifikanz von der Monokultur mit Hypoxiebehandlung ($37,72 \pm 1,70 \mu\text{m}$, $p = 0,007$). 120h n. l. besitzt die Kokultur Hypoxie die durchschnittlich längsten Neuriten ($37,42 \pm 1,35 \mu\text{m}$), signifikant länger als die der Kokultur Kontrolle ($29,80 \pm 2,06 \mu\text{m}$, $p = 0,034$).

4. Ergebnisse



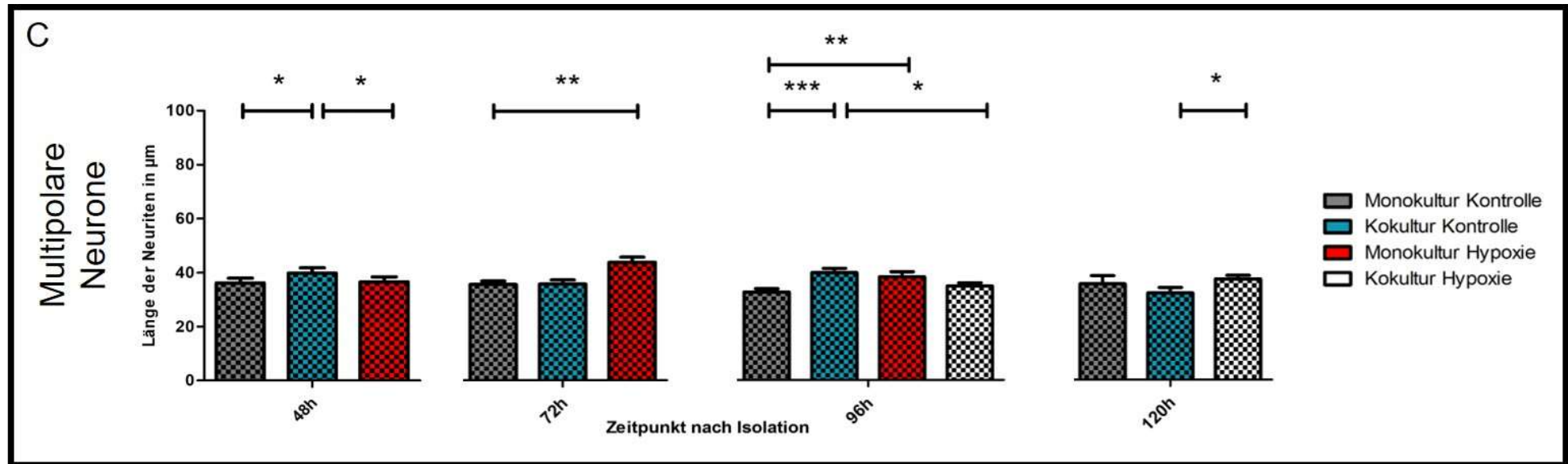


Abbildung 19: Neuritenlängen der verschiedenen Kulturformen im direkten Vergleich

Dargestellt sind die Neuritenlängen zu den jeweiligen Messzeitpunkten, aufgeteilt nach Kulturmethode (Monokultur Kontrolle in grau, Kokultur Kontrolle in türkis, Monokultur Hypoxie in rot, Kokultur Hypoxie in weiß) und Neurontyp (unipolar ohne Muster, bipolar mit Längsstreifung und multipolar kariert; Mittelwert + SEM, Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001).

Durch Zugabe der atrialen Myozyten („Kokultur Kontrolle“, türkis) sind 48h nach Isolation die Neuriten unabhängig des Neurontyps signifikant am längsten (Ausnahme: keine signifikanter Unterscheid gegenüber den bipolaren Neuronen der „Monokultur Kontrolle“, grau). Nach Hypoxiebehandlung weisen die multipolaren Neurone in Monokultur die signifikant größte Länge mit einem klaren Längenzuwachs zum Vorzeitpunkt auf (48h n. I., „Monokultur Hypoxie“, rot). Dies gilt ebenso für die unipolaren Neurone jedoch erst zum folgenden Messzeitpunkt (96h n. I.). Auch durch Hypoxiebehandlung der Kokulturen („Kokultur Hypoxie“, weiß) weisen diese im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit atrialen Myozyten signifikant längere Neuriten bei uni- und multipolaren Neuronen am letzten Messpunkt (120h n. I.) auf.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde Einfluss einer passageren Hypoxie auf das Neuritenwachstum der ICN in Mono- und Kokultur mit atrialen Myozyten untersucht.

Hierzu wurden durch konventionelle sowie immunhistochemische Untersuchungen die Lage der ICG im epikardialen Fett sowie deren vornehmlich parasymphischer Phänotyp bestätigt (Wake und Brack, 2016). Dies ermöglichte eine gezielte sowie reproduzierbare Isolation und Kultivierung der ICN in Monokultur. Durch Zugabe von atrialen Myozyten und/oder Versetzen in einen passageren hypoxischen Zustand wurde der Einfluss der Einzelereignisse als auch deren Zusammenwirken auf die ICN durch Veränderungen ihres Neuritenwachstums sichtbar.

In dieser Arbeit konnte (1.) ein Kokultur-Modell aus ICN und atrialen Myozyten mit stetigem Neuritenwachstum der ICN erfolgreich etabliert werden. Überdies wurde gezeigt, dass (2.) das Neuritenwachstum durch den Hypoxieeinfluss gesteigert und (3.) durch die Kokultivierung mit atrialen Myozyten moduliert werden konnte.

5.1 Histologie der intrakardialen Ganglien

5.1.1 Lokalisation der intrakardialen Ganglien am Herzhilum

Als erster Schritt zur Auffindung der intrakardialen Ganglien wurden diese in der histologischen Untersuchung der Mäuseherzen im epikardialen Fettgewebe um das Herzhilum gesucht. Die Ganglien fanden sich zwischen *Truncus pulmonalis* bzw. Pulmonalarterien, Pulmonalvenen, Myokard und *Vena cava superior* bzw. *Aorta*.

In Ratten wurden vier Hauptlokalisationen der intrakardialen Ganglien beschrieben (Pardini et al., 1987, Richardson et al., 2003): (1.) kranial des rechten Atriums zwischen *Vena cava* und *Aorta*, (2.) kranial des *Septum interatriale*, zwischen den Atrien und *Truncus pulmonalis* bzw. Pulmonalarterien, (3.) dorsal des linken Atriums bzw. der linken *Vena cava superior* sowie (4.) dorsal des inferioren Teils des *Septum interatriale* und rechten Atriums mit Ausbreitung in die Nähe des rechten Bronchus.

Eine ähnliche Topographie weisen die GPs der Maus auf: Diese sind größtenteils auf drei im epikardialen Fettgewebe befindliche Bereiche verteilt: (1.) kranial und

(2.) kaudal der Pulmonalvenen sowie (3.) im *Sulcus interatrialis* (Maifrino et al., 2006). Neuere Daten bestätigen die Lage der Ganglien um die Pulmonalvenen bzw. an deren Wurzel (Rysevaite et al., 2011a) sowie an der Wurzel der rechten *Vena cava superior* bis zum *Sulcus terminalis* (Pauza et al., 2013).

Die Topographie der in dieser Arbeit dargestellten Ganglien deckt sich mit der Literatur: Die Ganglien fanden sich im epikardialen Fettgewebe des Herzens, durch lockeres Bindegewebe vom Myokard abgegrenzt (Pardini et al., 1987, Yuan et al., 1994). Daher ist anzunehmen, dass die in dieser Untersuchung entdeckten Ganglien zu den intrakardialen Ganglien gehören.

5.1.2 Aufbau und Größe der intrakardialen Ganglien der Maus im Vergleich zu anderen Spezies

Durch die histologische Untersuchung konnten die ICG mit ihrer charakteristischen länglich-ovalen bis zigarrenförmige Struktur im epikardialen Fettgewebe dargestellt werden.

Die Größe und Form der gefundenen Strukturen wurden mit der gegenwärtigen Literatur abgeglichen: Die ICG variieren in ihrer jeweiligen Größe, z. T. konnten auch einzeln gelegene Neurone außerhalb von Ganglien nachgewiesen werden (Yuan et al., 1994). ICG besitzen meist eine ovale oder runde Form mit einer ausgeprägten Kapsel aus Bindegewebe, die bei größeren Ganglien stärker ausgeprägt ist (King und Coakley, 1958, Pardini et al., 1987, Yuan et al., 1994). Diese Beschreibungen decken sich mit der vorgefundenen Morphologie. Kleine Blutgefäße, v. a. Kapillaren innerhalb der Ganglien wurden nicht gefunden, obwohl diese in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sehr gut darstellbar waren (Baluk und Gabella, 1987).

Unter höherer mikroskopischer Auflösung fanden sich große, ovale, randständig gelegene Nervenzellkörper mit basophilem Zytoplasma und diese umgebende, kleine Satellitenzellen sowie schwach basophile Nervenfasern innerhalb der gefundenen Strukturen. Die Nervenzellkörper waren durch eine dünne Kapsel vom umgebenden Gewebe abgegrenzt und besaßen prominente, stark basophile *Nucleoli* in blassen Zellkernen.

Laut Literatur finden sich in ICG charakteristischerweise Neurone, Satellitenzellen, *small intensely fluorescent cells* (SIF-Zellen) (s. 5.2.3) (Baptista und Kirby, 1997)

und, wie auch in anderen peripheren autonomen Ganglien, Nervenfasern (Koblov, 1963, Xi et al., 1991). Durch Untersuchungen an verschiedenen Säugetieren (darunter Ratten, Meerschweinchen, Katzen und Affen) konnten die morphologischen Eigenschaften der ganglionären Neurone genauer bestimmt werden: sie präsentieren sich als große Zellen mit blassem Zellkern und prominenten *Nucleoli* (Ellison und Hibbs, 1976). Diese werden, wie in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt, von Satellitenzellen mantelförmig umlagert, um diese damit gegenüber anderen Neuronen und dem Extrazellulärraum zu isolieren (Baluk und Gabella, 1987).

5.1.3 Die intrakardialen Neurozyten exprimieren TH oder NF

Zur Bestätigung, dass es sich bei den dargestellten Ganglien um intrakardiale Ganglien handelte und, um die Ausbreitung der neuronalen Zellen erfassen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die innerhalb der Ganglien gelegenen Zellen immunhistochemisch gegen TH, NG und bIII anfärbbar waren. Dabei konnte vor allem in kleineren Zellen NF bzw. bIII nachgewiesen werden. Diese machten den Großteil der Zellen aus. Dagegen gab es nur wenige, große, ovale, TH-exprimierende (adrenerge) Zellen, die einen großen, nicht fluoreszierenden Zellkern aufwiesen, und randständig lagen. Die untersuchten Ganglienzellen zeigten jeweils die Expression entweder von NF bzw. bIII oder TH. Einige große, ovale Zellen waren dagegen gegenüber beiden Proteinen negativ.

Die meisten Neurone der intrakardialen Ganglien der Maus konnten über ChAT als cholinerg identifiziert werden (Mabe et al., 2006). Rysevaite et al. demonstrieren, dass dies für 83% der Neurone gilt, nur 4% waren als adrenerg durch alleinige TH-Expression zu bezeichnen. Einen gemischten Phänotyp zeigten 14 % der Neurone, diese sind damit cholinerg und adrenerg (Rysevaite et al., 2011b). Andere immunhistochemische Untersuchungen der Maus haben gezeigt werden, dass etwa 30 % der cholinergen Neurone auch adrenerg sind (Hoard et al., 2008). In Zellkulturversuchen sind es dagegen nur 21 % (Hoard et al., 2007). In den atrialen ICG der Ratte sind alle Neurone aufgrund von ChAT-Expression als cholinerg einzustufen, nur kleine, randständige, in Gruppen angeordnete Zellen sind adrenerg (Richardson et al., 2003). Die meisten menschlichen intrakardialen Ganglien besitzen cholinerge Neurone, es finden sich nur wenige adrenerge Nervenzellen

(Hoover et al., 2009). Dies gilt in gleicher Relation für die Nervenfasern (Hoover et al., 2009). Die Ganglien selbst zeigen starke Immunreaktivität gegenüber Acetylcholinesterase (AChE) und sind damit als cholinerg zu bezeichnen (Pauza et al., 2002). Auch gibt es topographische Unterschiede: So zeigen v. a. die großen Ganglien an der Herzbasis sowie am Epikard nahe der Einmündung der rechten VCS cholinerge Axone, adrenerg sind dagegen v. a. die Nervenfasern ventral und dorsal des linken Atriums. Auch die die Ganglien verbindenden Nervenfasern exprimieren ChAT (Rysevaite et al., 2011b).

Die Verteilung der adrenergen Neurone der beschriebenen Untersuchung bestätigen die Angaben der Literatur, wobei sie allein anhand der Zahl der TH-positiven Neurone die Daten von Hoard et al. besser widerspiegeln, als die von Rysevaite et al. Die neuronalen Marker NF bzw. bIII wurden statt ChAT verwendet, um die neuronalen Strukturen, unabhängig von cholinergem, adrenergem oder ähnlichem Charakter darzustellen (Lee et al., 1990, Yuan et al., 2012). Dabei war zu beachten, dass Neurofilament (NF) nicht in allen nervalen Strukturen vorhanden ist (Sharp et al., 1982, Gulbenkian et al., 1987). Eine mögliche Alternative wäre das *protein gene product* 9.5 (PGP 9.5) gewesen, da es speziell Neurone im kardiovaskulären System darstellen kann (Gulbenkian et al., 1987). PGP 9.5 wurde bereits zur Identifizierung von Ganglien verwendet (Arora et al., 2003) und ist in allen Nervenzellkörper der Atrien des Meerschweins zusammen mit ChAT nachweisbar (Leger et al., 1999). Für eine grundlegende Unterscheidung, ob es sich um Neurone handelt oder nicht, war NF allerdings vollkommen ausreichend.

Der Nachweis von TH diene der Abgrenzung zu anderen neuronalen Strukturen, wie etwa dem *Nervus vagus* (Coote, 2013). Zwar sind neben anderen autonomen Ganglien, wie dem *Ganglion stellatum* (Maslyukov et al., 2006) oder höher gelegenen sympathischen Ganglien (Weihe et al., 2005), auch die intrakardialen Neurone der Maus z. T. adrenerg (Hoard et al., 2008, Rysevaite et al., 2011b), allerdings muss dies kritisch betrachtet werden: Kleine randständige, in Gruppen angeordnete Zellen innerhalb der intrakardialen Ganglien der Ratte exprimieren ebenfalls TH, es handelt sich in diesem Fall aber um *SIF-Zellen* (*small intensely fluorescent cells*). Dies sind vereinzelt liegende, z. T. auch in Gruppen um kleine Blutgefäße angeordnete, kleine Zellen, die extrem stark fluoreszieren und Katecholamine in großer Menge enthalten (Eränkő, 1976). SIF-Zellen wurden ebenso

in intrakardialen Ganglien von Mäusen, Ratten und anderen Spezies nachgewiesen, allerdings wurden sie auch außerhalb der Ganglien, u. a. im umgebenden Fettgewebe und zwischen Myokardzellen gefunden (Ehinger et al., 1968). Dies trifft in der vorliegenden Untersuchung nicht für die TH-fluoreszierenden Zellen zu.

Im Unterschied zu TH-exprimierenden Neuronen mit relativ großem Durchmesser zeigen die SIF-Zellen keine Expression der Dopamin- β -Hydroxylase (Slavikova et al., 2003). In weiteren Untersuchungen könnte über diesen Unterschied eine sichere Differenzierung zwischen Neuronen und SIF-Zellen gelingen. Die Größe und Morphologie der gefundenen, TH-exprimierenden Zellen sprechen stark dafür, dass es sich um Neurone, nicht um SIF-Zellen handelt. Außerdem weist hoher Anteil an adrenergen Zellen (bis zu 50%) auf intrakardiale Ganglien hin (Weihe et al., 2005).

Durch die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Lage der Ganglien, wie in der Literatur beschrieben, bestätigt. Dadurch war die Isolation eben dieser Ganglien bzw. der enthaltenen ICN in den darauffolgenden Schritten möglich.

5.2 Kultivierung der ICN

5.2.1 Voraussetzungen für die Isolation und Kultivierung der ICN

Zur Bestimmung ihrer Neuritenlänge wurden ICN aus dem Fettgewebe um das Herzhilum der Maus isoliert, kultiviert sowie darauffolgend die Neuritenlänge bestimmt.

Als Grundvoraussetzung dafür war es nötig, die Lokalisation der zu isolierenden Neurone zu bestimmen. Dies erfolgte durch die histologische und immunhistochemische Untersuchung der Herzen (s. 4.1 und 4.2), unter Einbeziehung der in der Literatur beschriebenen Neuroanatomie der Maus.

Das weitere methodische Vorgehen orientierte sich an bereits beschriebenen Isolationsverfahren ICN (Her et al., 2000, Hoard et al., 2007, Verkerk et al., 2012). Durch die veränderte Zusammensetzung des Isolationsmediums (Neurozyten-Medium) konnte die Kultivierung optimiert werden, da durch die Zugabe von Ascorbinsäure,

Gibco B27 und Gibco Fungizone die Überlebensbedingungen der Neurone optimiert werden konnten (s. 3.5.1).

Eine Möglichkeit zur Optimierung der Zellisolation stellt das *Preplating* dar. Mit einer qualitativ besseren Isolation und damit einer höheren ICN-Dichte bietet es eine gute Alternative zur angewandten Isolationstechnik. Es wurde jedoch aufgrund der methodenbedingt geringen Zellausbeute sowie avitaler Zellen nach Isolation nicht als Standardverfahren verwendet. Ein genauer Grund für die Störanfälligkeit dieser Methode konnte nicht eruiert werden. Zu vermuten ist jedoch ein hoher Verlust an Zellen beim Transferieren bzw. eine Schädigung der Zellen durch das relativ häufigere Transferieren. Dabei wirken v. a. Scherkräfte auf die Zellen, was wiederum zum Zellschaden bzw. Zelltod führen kann (Ludwig et al., 1992, Tanzeglock et al., 2009). Ein weiterer unerwünschter Aspekt des *Preplatings* ist, dass die mit *Preplating* isolierten Neurone und deren Neuriten nach wenigen Tagen in Kultur im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne *Preplating* deutlich kleiner sind (Hoard et al., 2007). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die geringe Zahl/ Abwesenheit von wachstumsfördernden Fibroblasten (Mias et al., 2013) sowie anderer durch das *Preplating* reduzierter Faktoren zurückzuführen.

5.2.2 Die morphologische Identifizierung der ICN

In der vorliegenden Arbeit konnten die ICN bis zu einer Zeit von maximal 120 h in Monokultur bzw. 144 h in Kokultur beurteilt werden. Spätere Zeitpunkte boten nicht mehr die Möglichkeit, Neurone von nicht-neuronalen Zellen zu unterscheiden, da die Zelldichte in der Kultur zu groß war. Die Kulturen wurden daher nach spätestens 144 h verworfen.

Die Einteilung der dokumentierten Zellen in neuronale und nicht-neuronale Zellen erfolgte dabei anhand der Zellmorphologie. Die Beschreibungen der ICN von Ratten und Meerschweinchen boten eine gute Orientierung und dienten der Einteilung der Zellen in unipolare, bipolare und multipolare Neurone (Horackova et al., 1996, Pauza et al., 1997b, Richardson et al., 2003).

Es war davon auszugehen, dass, der Isolationsmethode geschuldet, nicht nur neuronale Zellen, sondern auch nicht-neuronale Zellen in der Kultur vorhanden waren. Den überwiegenden Teil dieser Zellen machten kardiale Fibroblasten aus (Banerjee et al., 2007). Diese Zellen konnten aufgrund ihrer flachen, spindelartigen Form mit

zahlreichen Ausläufern (Souders et al., 2009) bzw. ihrer sternartigen Form (Eghbali et al., 1991) sowie der Eigenschaft, netzwerkartige, sehr dichte Zellverbände mit einer Vielzahl an Kontakten zwischen den einzelnen Zellen zu bilden, von den Neuronen abgegrenzt werden (Camelliti et al., 2005b). Überdies ist bekannt, dass ihre Zahl mit steigenden Kultivierungsdauer zunimmt (Baum und Duffy, 2011).

Mit Hilfe dieser Kriterien konnten die ICN objektiv von den nicht-neuronalen Zellen abgegrenzt werden. Ferner erfolgten eine Begutachtung und Einteilung der Zellen von mehreren, unabhängigen Untersuchern. Dies erhöhte die Objektivität und die Genauigkeit der Einteilung weiter. Eine immunzytologische Färbung könnte dennoch für zukünftige Forschungen eine Identifizierung mit höherer Zuverlässigkeit, speziell bei längerer Kulturdauer mit hoher Zelldichte, ermöglichen bzw. die Identifizierung erleichtern.

5.3 Die Neuriten der ICN zeigen kein lineares Wachstum

Die Neuritenlängen der ICN in Monokultur wurden gemessen, um das Wachstumsverhalten der Neuriten unter Einfluss der Kokultur und/oder Hypoxie mit einem Basiswert vergleichen zu können.

Es konnte in dieser Arbeit folgendes Neuritenwachstum der isolierten ICN in Monokultur festgestellt werden: Die unipolaren und bipolaren ICN erreichten 72 h nach Isolation ihre maximale Neuritenlänge, die multipolaren ICN bereits 48 h nach Isolation.

In der Literatur wurde bisher das Neuritenwachstum der murinen ICN in Kultur bis drei Tage nach Isolation beschrieben, wobei die ersten Neuriten erst am Tag nach der Isolation sichtbar waren (Hoard et al., 2007). Eine genaue Angabe über die durchschnittliche Länge der Neuriten wurde dabei nicht gemacht, nur der längste Neurit wurde jeweils betrachtet (Hoard et al., 2007).

Es ist kein direkter Vergleich der gemessenen Neuritenlängen der ICN-Kulturen mit anderen Arbeiten möglich, da keine ähnlichen Versuche in der Literatur beschrieben bzw. die Neuritenlängen dabei bestimmt wurden. Es konnte jedoch für die Axone der Neurone aus dem Spinalganglion des Huhns eine Wachstumsgeschwindigkeit

von 20-40 $\mu\text{m}/\text{h}$ nachgewiesen werden, allerdings wurde ein anderes Kulturmedium (modifiziertes F12 + fetales Kälberserum) als in vorliegenden Arbeit verwendet (Yamada et al., 1970). Eine relativ neue Studie zeigt eine durchschnittliche Neuritenlänge ($\pm$ SD) von $420,37 \pm 192,92 \mu\text{m}$ mit bzw. $229,42 \pm 102,15 \mu\text{m}$ ohne Zugabe von *nerve growth factor* (NGF) nach insgesamt achttägiger Kultivierung von lumbalen Spinalganglienzellen der Ratte (Kim et al., 2015). Die doch deutlich dazu unterschiedlichen Neuritenlängen in der vorliegenden Arbeit (maximale Länge: $81,94 \pm 3,40 \mu\text{m}$, unipolar, ICN-Monokultur nach 72 h), sind am ehesten durch die verschiedenen Zelltypen (Spinalganglienzellen gg. ICN) sowie durch die unterschiedliche Dauer (8 Tage gg. maximal 5 Tage) und die 3D-Kulturtechnik von Kim et al. erklärbar.

Andere Untersuchungen der Neurone muriner, lumbaler Spinalganglien zeigten nach vorheriger, artifizieller Nervenverletzung, dass die Neuritenlängen unter NGF-Zugabe nach 48 stündiger Kultivierung 800 – 900 μm maßen (Edstrom et al., 1996). Dabei übertraf dies die Länge der Kontrolle (ohne NGF) etwa um das Doppelte (Edstrom et al., 1996). Hierbei dürften die erneut größeren Neuritenlängen verglichen mit den Ergebnissen der hier dargestellten Untersuchung auf u. a. die vorher zugefügte Nervenverletzung, die unterschiedlichen Zelltypen, als auch auf die Kultivierungsmethode (Matrigel, RPMI-Medium) zurückzuführen sein (Edstrom et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Abfall der Neuritenlänge bei bi- und multipolaren Neuronen zwischen 72 und 96 h in Kultur beobachtet. Insgesamt ist aber festzustellen, dass sich am jeweils letzten erfolgten Messzeitpunkt (120 h n. l.) die gemessene Länge der Neuriten nicht signifikant von ihrem Maximalwert unterscheidet. Untersuchungen an spinalen Neuronen des Zebrafisches zeigten einen Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit der Neuriten nach 12 h, wobei die kultivierten Zellen mindestens 24 h überlebten (Chen et al., 2013). Dies erklärt zwar nicht den beobachteten Abfall der Neuritenlänge, jedoch zeigt dies ein nichtlineares Wachstumsverhalten der Neurone an. Es könnte in weiteren Untersuchungen im Rahmen der Zellkultur, auch an anderen Spezies, überprüft werden, ob generell ein Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit, gegebenenfalls (ggf.) sogar ein Abfall der Neuritenlänge beobachtbar ist. Denkbar wäre auch, dass durch eine Zunahme der abso-

luten Zahl an Neuriten im Verlauf der Kultivierung (Hoard et al., 2007) der durchschnittliche Längenwert abfällt, es sich also nur um ein statistisches Phänomen handelt.

Ein weiterer, das Wachstum der Neuriten beeinflussender Faktor stellt die Vorbeschichtung der Kulturplatten dar: Poly-D-Lysin stimuliert das Neuritenwachstum von sympathischen Ganglienzellen nur relativ schwach aufgrund seiner klebrigen Konsistenz (He und Baas, 2003). Vielmehr wird durch die Zugabe von Laminin zum Kulturmedium oder zur Vorbeschichtung mit Poly-D-Lysin das Neuritenwachstum gefördert. Dabei haftet das Laminin an dem positiv-geladenen Poly-D-Lysin und ist daher gut zugänglich für die Zellen (He und Baas, 2003). Auch beim Zebrafisch, bei Mäusen und bei Ratten konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsrate der Neuriten abhängig von der Vorbeschichtung ist und, dass mit Laminin vorbeschichtete Kulturplatten im Vergleich zu D-Lysin höhere Wachstumsraten ermöglichen (Baird et al., 1992, Lein et al., 1992, Chen et al., 2013). Diese Faktoren sollten bei der Beurteilung des Wachstumsverlaufs berücksichtigt werden, können jedoch für den Abfall der Neuritenlänge keine Erklärung liefern. Eine Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit in den Kulturen dieser Arbeit durch die Vorbeschichtung ist jedoch aufgrund der Literatur anzunehmen.

Weiterhin sind andere Einflussfaktoren zu beachten: So wurde nachgewiesen, dass Acetylcholin und Carbamylcholin (cholinerges Rezeptorantagonist) das Neuritenwachstum hemmen, Acetylcholinesterase dagegen stimulierend wirkt (Small et al., 1995). Auch die Cholinacetyltransferase führt zu einem vermehrten Neuritenwachstum (Bignami et al., 1997, De Jaco et al., 2002). Da in der Kultur von vorwiegend cholinergen Neuronen auszugehen ist (Hoard et al., 2007), könnte eine vermehrte Freisetzung von Acetylcholin oder eine verminderte Expression der Acetylcholinesterase bzw. der Cholinacetyltransferase das Neuritenwachstum beeinflussen. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Faktoren das Wachstum der dargestellten Kulturen beeinflusst haben.

Ebenso könnten die nicht-neuronalen Zellen in der Kultur Einfluss auf die Neurone nehmen. So wurde gezeigt, dass Schwann-Zellen Wachstumsfaktoren wie NGF sezernieren und dadurch das Axonwachstum regulieren (Webber und Zochodne,

2010). Aber auch eine autokrine Sekretion des Neurotrophins wurde bereits für sympathische Nervenzellen nachgewiesen und wäre denkbar (McWilliams et al., 2015). Für NGF wurden bereits in vielen Studien positive Effekte auf das Neuritenwachstum sowie das Überleben von ganglionären Neuronen beschrieben (Ruit et al., 1990, Wiesmann und De Vos, 2001). Daher ist es wahrscheinlich, dass auch in den hier dargelegten Untersuchungen ein wachstumsfördernder Effekt durch nicht-neuronale Zellen z. B. über NGF-Freisetzung erzielt wurde.

Ein Störfaktor der Messung der Neuritenlänge könnte auch in der kurzen Kultivierungszeit liegen: Zentrale Neurone bilden ihre Axone in fünf Schritten aus, wobei sich zunächst die Neuriten ausbilden (Takano et al., 2015). Erst nach sieben bis zehn Tagen ist eine sichere Abgrenzung von Dendriten und Axonen möglich (Takano et al., 2015). Bei hippocampalen Neuronen ist 36 – 72 h nach Isolation erkennbar, welcher der Neuriten sich zu einem Axon entwickelt, die restlichen Neuriten werden dann zu Dendriten (Dotti et al., 1988, Takano et al., 2015). Aufgrund der Kultivierungszeit von maximal fünf bzw. sechs Tagen in dieser Arbeit, war es daher nicht möglich zwischen Axonen und Dendriten zu differenzieren. Es wurde daher von Neuriten gesprochen. Eine differenzierte Messung zwischen Axonen und Dendriten könnte einen anderen Wachstumsverlauf zeigen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sprechen insgesamt für ein nichtlineares Neuritenwachstum der ICN mit Einflussnahme verschiedener zellulärer als auch chemisch-hormoneller Faktoren. Der Abfall der Neuritenlänge zwischen 72 und 96 h ist dagegen bisher durch die Literatur nicht ausreichend erklärbar.

5.4. Myozyten stabilisieren das Neuritenwachstum

Durch Zugabe der atrialen Myozyten wurde der Effekt der Myozyten bzw. des Zusammenspiels von Myozyten und ICN auf das Neuritenwachstum der ICN untersucht. In der Kokultur änderte sich die maximale Länge der ICN-Neuriten nicht, jedoch erreichten die unipolaren Neurone diese bereits nach 48 h in Kultur. Die multipolaren Neurone nahmen erst zwischen 96 h und 120 h nach Isolation an Neuritenlänge ab. Insgesamt war ein modulierender Effekt auf die Neuritenlänge zu er-

kennen: So fiel diese zwischen 72h und 96h n. I. nicht ab, weiterhin war der Unterschied der Durchschnittslängen zwischen den gemessenen Zeitpunkten beginnend bei 48h n. I. im Vergleich zur Monokultur vermindert.

In vorherigen Studien konnten Langzeit-Kulturen (3-10 Wochen) mit ventrikulären Myozyten und Neuronen aus dem *Ganglion stellatum* bzw. den intrakardialen Ganglien etabliert werden (Horackova et al., 1993). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Kulturen konnten Verbindungen zwischen Neuronen und Myozyten in Form von Synapsen *en passant* dargestellt werden (Horackova et al., 1993). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die Neurone der intrakardialen Ganglien in Kokultur mit ventrikulären Myozyten nur wenige Neuriten ausbilden und diese, im Verhältnis zu Neuronen aus dem *Ganglion stellatum*, kleiner erscheinen (Horackova et al., 1996). Durch die Kokultur haben sich die elektrophysiologischen Eigenschaften der Myozyten, verglichen mit Monokulturen, so verändert, dass sie solchen aus *in-vivo*-Untersuchungen gleichen (Horackova et al., 1993). Daher wurde von einer funktionellen Interaktion zwischen Myozyten und Neuronen ausgegangen (Horackova et al., 1993). Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass in Kokulturen von suprazervikalen Ganglien und ventrikulären Myozyten der Ratte zwischen 20 und 50 % der Neurone direkte Verbindungen zu den Myozyten ausbildeten, über die die Myozyten nachweisbar innerviert wurden (Ogawa et al., 1992).

Aufgrund dieser Angaben aus der Literatur und der beobachteten Veränderungen des Neuritenwachstums ist von einer funktionellen Verbindung zwischen atrialen Myozyten und ICN in der hier beschriebenen Kokultur auszugehen. Diese Verbindung zeigt sich durch eine relative konstante Neuritenlänge, sobald ein bestimmtes Niveau erreicht wurde. Direkte Verbindungen zwischen den Zellarten wurden in dieser Arbeit nicht fokussiert beobachtet, jedoch ist aufgrund der Literaturangaben von diesen auszugehen (Beaumont et al., 2015, Jungen et al., 2017).

Folgende Faktoren könnten einen Einfluss auf das hier beobachtete Neuritenwachstum haben: Es konnte gezeigt werden, dass kultivierte, neonatale Kardiomyozyten der Ratte NGF produzieren (Lockhart et al., 1997). NGF zählt zu den Neurotrophen, die für Erhalt und Überleben zentraler und peripherer Neurone sowie deren Wachstum essentiell sind (Wiesmann und De Vos, 2001, Tucker, 2002). NGF hat auch einen positiven Effekt auf das Überleben von Kardiomyozyten (Caporali et

al., 2008). Diese sezernieren NGF nach Stimulation mit Endothelin-1 und fördern dadurch die Ausbildung der sympathischen Innervation des Herzens und das Überleben der Neurone (Ieda et al., 2004). Ferner reguliert NGF die Ausbildung neuronaler Netzwerke zwischen Myozyten und Neuronen (Lockhart et al., 2000) sowie die synaptische Transmission dieser Verbindung (Lockhart et al., 1997).

Dies macht die Etablierung eines funktionellen Netzwerks zwischen Myozyten und ICN in der Kokultur hochwahrscheinlich. Eine mögliche Freisetzung von neurotrophen Faktoren könnte erklären, warum eine Abnahme der Neuritenlänge zwischen 72 und 96 h n. l. in der Kokultur (verglichen mit der Monokultur) nicht zu beobachten war. Bekräftigt wird diese Vermutung durch den Nachweis von NGF-Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) in den atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten (Matheson et al., 1997). Dadurch sind diese Zellen in der Lage, NGF z. B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu produzieren (Martinelli et al., 2002, Martinelli et al., 2006). In anderen Arbeiten wurde allerdings gezeigt, dass kardiale Fibroblasten den Großteil des NGF in gesunden Rattenherzen produzieren und der myozytäre Anteil der NGF-Produktion nur sehr gering ist (Mias et al., 2013).

Außerdem könnte eine Aktivitätserhöhung von ChAT durch Herz- und Skelettmuskulatur der Ratte (gezeigt an Zellen des *Ganglion ciliare*) das Neuritenwachstum, wie unter 5.3 beschrieben, verstärken (McLennan und Hendry, 1978). Die Aktivität von ChAT war ebenfalls in Kokulturen aus Rückenmarks- und Muskelzellen stark erhöht (Giller et al., 1977). Es wurde daraus geschlossen, dass Muskelzellen Mediatoren freisetzen, die zu dieser Erhöhung führen (Giller et al., 1977). Dabei ist v. a. an Acetylcholin zu denken, das in kardialen Myozyten synthetisiert und aktiv sezerniert werden kann (Rocha-Resende et al., 2012). Eine abschließende Beurteilung, welche Faktoren einen Einfluss auf das Neuritenwachstum speziell in der Kokultur haben, kann durch diese Arbeit nicht erfolgen, da diese Faktoren nicht untersucht wurden. Allerdings könnte in zukünftigen Arbeiten die Messung dieser Faktoren im entnommenen Kulturmedium erfolgen und darüber der Einfluss der einzelnen Faktoren bestimmt werden.

Weitere zu diskutierende Punkte sind die Verteilung der neuronalen Polarität in der Kokultur: In der Literatur heißt es, dass die große Mehrheit der Neurone einen bipolaren Phänotyp aufweist, kaum bzw. z. T. keine unipolaren Neurone in den Kokul-

turen gefunden werden konnten (Horackova et al., 1996). Dies steht im starken Kontrast zu den hier vorliegenden Ergebnissen: Die unipolaren Neurone machten immer den größten Anteil der Neuronentypen aus. Multipolare Neurone bildeten die kleinste Fraktion der identifizierten Neurone in der Kokultur ohne Hypoxie, bipolare Neurone in der Kokultur mit Hypoxie. Eine Änderung der Polarität, z. B. durch längere Kultivierungszeit, ist dabei nicht möglich: Die Polarität der Zelle bleibt dem Neuron lebenslang erhalten (Tahirovic und Bradke, 2009). Es bestünde die Möglichkeit, dass sich zunächst nur auf einer Seite des Neurons ein Neurit ausbildet, später dann auch auf der anderen Seite, wie es bei zerebellären Neuronen der Fall ist (Powell et al., 1997). Allerdings umfasst der Kultivierungszeitraum der untersuchten Neurone die Zeitspanne (36 – 72 h n. I.), in der weitere Neuriten ausgebildet werden würden (Powell et al., 1997). Daher hätte dies in den beschriebenen Kulturen erkennbar sein müssen. Andere Studien wiederum bestätigen die vorgefundene Verteilung: In Monokulturen machten die unipolaren Neurone fast zwei Drittel aller Zellen aus (Pauza et al., 1997b).

Es ist daher anzunehmen, dass die Verteilung der Polarität u. a. abhängig ist von der Art der kultivierten Zellen (atriale gg. Ventrikuläre Neurozyten). Interessanterweise zeigt die Literatur für das *Ganglion ciliare*, dass, obwohl zunächst der Großteil der Neurone einen multipolaren Phänotyp aufweist, im Laufe der Zeit die meisten Zellen unipolar wurden (Role und Fischbach, 1987). Diese Veränderung wurde auf das normale, *in-vivo* ablaufende Entwicklungsprogramm der Neurone zurückgeführt (Role und Fischbach, 1987).

5.5. Hypoxie stimuliert das Neuritenwachstum

Die ICN-Monokultur wurde einer artifiziell generierten Hypoxie für drei Stunden mit anschließender Reperfusion ausgesetzt und der weitere Wachstumsverlauf der Zellfortsätze dokumentiert. Dadurch wurde versucht, einen passageren hypoxischen Zustand wie im Rahmen verschiedener Erkrankungen (u. a. Myokardinfarkt, OSAS, etc.) zu simulieren. Die Fortsätze aller Zelltypen sind 96 h n. I. länger als im Vergleich zur Monokultur ohne Hypoxie, für die multipolaren ICN gilt dies bereits nach 72 h. Auffällig ist hier der, wie schon in der Kokultur gezeigte, ausbleibende bzw. nicht signifikante Abfall der Neuritenlänge zwischen 72 und 96 h nach Isolation.

Dies könnte auf die Ausschüttung von neurotrophen Substanzen durch die Hypoxie zurückzuführen sein: Nach einer Hypoxie im Rattenhirn wird vermehrt NGF ausgeschüttet (Lorez et al., 1989), was wiederum das neuronale Wachstum und die Sprossung der Neuriten induziert (Cao et al., 2000). Eine Übertragung dieses Mechanismus auf die intrakardialen Ganglien ist insofern sehr wahrscheinlich, als dass dies auch bei anderen Neuronen beobachtet wurde. So bildeten Neurone des *Ganglion cervicale superius* der Ratte, kultiviert mit Myokardzellen aus einer Periinfarktzone, mehr und robustere Neuriten aus als bei Kultivierung mit vitalen Myokardzellen (Hasan et al., 2006). Dabei wurde nachgewiesen, dass BDNF (*brain derived neurotrophic factor*)- und NGF-mRNA in Zellen, die an der Grenze eines infarzierten Areals (periinfarziell) liegen, zwischen 2 und 120 h nach einer Ischämie mit Reperfusion hochreguliert werden (Hiltunen et al., 2001, Hasan et al., 2006). Es findet sich dort 120 h nach Hypoxie auch eine diffuse NGF-Expression, weshalb angenommen wurde, dass NGF für die postinfarziellen neuronalen Veränderungen von Bedeutung ist (Hiltunen et al., 2001). Auch wurden erhöhte NGF-Level unmittelbar nach Myokardinfarkt bei Tieren und Menschen nachgewiesen und für das postinfarzielle Nervenwachstum verantwortlich gemacht (Li und Li, 2015). Dabei ist im nicht-infarzierten Bereich des Herzens eine höhere Dichte an neu gebildeten sympathischen Nervenfasern als im Infarktareal nachweisbar (Zhou et al., 2004). Das Infarktareal zeigt zwar einen früheren und deutlicheren Anstieg an NGF-mRNA, dennoch ist das Nervenwachstum im nicht-infarzierten Bereich insgesamt größer (Zhou et al., 2004). Dies bestätigend wurde eine vermehrte Bildung von Neutrophinen beim Myokardinfarkt aufgezeigt, welche länger und stärker in der Periinfarktzone als im Infarktgebiet nachweisbar sind (Oh et al., 2006).

Weiterhin wurde festgestellt, dass NGF von parasympathischen Neuronen gebildet wird und dies durch sympathische Neurone stimuliert werden kann (Hasan und Smith, 2000). Dadurch könnte die Ausbildung von autonomen axo-axonalen Netzwerken erklärt werden (Hasan und Smith, 2000). Berücksichtigt man zudem, dass durch einen kurzzeitigen Verschluss der koronaren Blutgefäße mit anschließender Reperfusion die Aktivität der intrakardialen Neurone verändert wird (Huang et al., 1993), so ließe sich eine wachstumsinduzierende Freisetzung neurotropher Substanzen ggf. auch durch die Neurone selbst erklären. Eine kardioprotektive, erhöhte ACh-Freisetzung durch ICG in isoliert-perfundierten Herzen (Langendorff-Preparation) nach Hypoxie und Reperfusion wurde bereits nachgewiesen (Pickard et al.,

2017). Eine Freisetzung wachstumsinduzierender Faktor durch Neurone ist daher möglich, scheint allerdings eher unwahrscheinlich, da die Aktivitätsregulation jedes einzelnen Neurons verschieden sein kann, somit auch eine Verminderung der Aktivität unter Hypoxie möglich ist (Huang et al., 1993).

Überdies spielt die 1 α -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren-Faktors (HIF, *hypoxia inducible factor*) eine wichtige Rolle im Rahmen des Neuritenwachstums. Unter niedriger Sauerstoffkonzentration kommt es zu einer Akkumulierung sowie Translokation dieser HIF-Untereinheit in den Zellkern und folgend einer vermehrten Transkription bestimmter Gene wie z. B. dem Gen des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors A (VEGFA, *vascular endothelial growth factor A*). VEGFA führt wiederum zu einer erhöhten Neuritenwachstum sowie Regeneration von Neuronen (Genetos et al., 2010, Cho et al., 2015).

Diese Angaben aus der Literatur sprechen für eine vermehrte Produktion von NGF oder von anderen Neurotrophen bzw. Wachstumsfaktoren, induziert durch die Hypoxie. Der verstärkte Wachstumsreiz für die neuronalen Zellen und damit der fehlende Abfall der Neuritenlänge sowie der Längenunterschied zur Kontrollgruppe 96 h n. l. ließen sich somit erklären.

Dem gegenüber steht eine Untersuchung von P12-Zellen, einer Phäochromozytom-Zelllinie: Es konnte eine Induktion des Neuritenwachstums durch Hypoxie festgestellt werden, die weiteren Ergebnisse dieser Studie geben aber Hinweise darauf, dass dieser Effekt nicht auf die Ausschüttung von NGF zurückzuführen ist, da bestimmte, mit NGF in Verbindung stehende Marker nicht exprimiert wurden (O'driscoll und Gorman, 2005). Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine durch den Adenosin-Rezeptor vermittelte Reaktion für das Neuritenwachstum verantwortlich sein könnte (O'driscoll und Gorman, 2005). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten schließen diese Möglichkeit der Förderung des Neuritenwachstums weder aus noch bestätigen sie diese. Eine Untersuchung der in das Kulturmedium sezernierten Faktoren, speziell von Neurotrophen, könnte hier Klarheit bringen.

Darüber hinaus weisen periphere Nerven eine zunächst langsame Regenerationsgeschwindigkeit auf, die bis zum dritten Tag nach einer Läsion ansteigt und dann auf konstantem Niveau verweilt (Sjöberg und Kanje, 1990). Bezieht man dies auf

das Wachstumsverhalten der Neuriten, so wäre eine längere Kultivierungszeit wünschenswert, um den stimulierenden Effekt auf das Neuritenwachstum durch die Hypoxie besser beurteilen zu können.

Zusammenfassend stellt die Freisetzung von Neurotrophinen durch kardiale Fibroblasten und Kardiomyozyten die wahrscheinlichste Ursache des verstärkten Neuritenwachstums nach Hypoxie dar. Zwar ließe sich dadurch der fehlende Abfall der Neuritenlänge bei den uni- und bipolaren Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe erklären, der signifikante Abfall der Neuritenlänge der multipolaren Neurone zwischen 72 und 96 h n. I. ist allerdings dadurch nicht hinreichend begründet.

5.6. Die Freisetzung neurotropher Substanzen durch Myozyten während einer Hypoxie kann einen zusätzlichen Wachstumsreiz darstellen

Nach Zugabe von atrialen Myozyten zur ICN-Kultur wurde diese Kokultur 48 h später unter Hypoxie gesetzt. Dadurch konnte ein Wachstumsreiz für die ICN gesetzt werden: Unipolare und multipolare ICN zeigten auch nach 96 bzw. 120 h in Kultur einen signifikanten Zuwachs ihrer Neuritenlänge.

Im Vergleich mit der Kokultur ohne Hypoxie zeigte sich 96 n. I. bei den unipolaren ICN ein deutlich geringe Neuritenlänge in der Kokultur-Hypoxie-Gruppe, die multipolaren Neurone besaßen sogar signifikant kürzere Neuriten. Einen Messzeitpunkt später (120h n. I.) besaßen die uni- und multipolaren Neurone in Kokultur nach Hypoxie allerdings signifikant längere Neuriten als in der Kokultur ohne vorherige Hypoxie. Da die beiden Gruppen dieser Untersuchung parallel isoliert und kultiviert wurden, scheint ein wachstumsmodulierender Effekt durch die Hypoxie wahrscheinlich.

Dies könnte u. a. auf die Hypoxie-bedingten Veränderungen an den bzw. durch die Myozyten zurückzuführen sein: So sind kardiale Myozyten in der Lage, die Sauerstoffkonzentration zu messen und den Gefäßtonus der zuführenden Blutgefäße den Bedingungen des Myokards anzupassen (Winegrad et al., 1999). Dies geschieht durch Sekretion von Adenosin bei zu geringen Sauerstoffkonzentrationen, durch Angiotensin I bei zu hohen (Winegrad et al., 1999). Adenosin fördert in Nervenzellen das Wachstum der Neuriten sowie die Aufzweigung der Dendriten (O'driscoll und

Gorman, 2005, Ribeiro et al., 2016). Auch für Angiotensin II, das durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) aus Angiotensin I entsteht (Erdos, 1976), wurde ein wachstumsfördernder Effekt auf Neuriten nachgewiesen (Jing et al., 2012).

Ein für ventrikuläre Myozyten von Ratten entwickeltes Hypoxie-Modell zeigte eine erhöhte Laktatproduktion durch anaerobe Glykolyse, eine Abnahme des pH-Werts (intra- und extrazellulär), ATP-Degradierung sowie Membranschäden durch eine Ischämie (Tumiati et al., 1994). Dabei hat die Azidose selbst einen vor Zelltod schützenden Effekt (Lemasters et al., 1996), die anschließende Reperfusion verursacht starken Schaden an der Zellmembran sowie einen Verlust von ATP (Tumiati et al., 1994) und eine Mitochondrienschwellung, die letztendlich zum Zelltod führen kann (Chiong et al., 2011). Die dabei freigesetzten Stoffe könnten einen das Wachstum der Neuriten fördernden Effekt haben: So wird z. B. ATP in großer Menge im Rahmen einer Hypoxie freigesetzt (Cosentino et al., 2012). ATP kann über einen speziellen Purin-Rezeptoren (P2Y₂) die Sensitivität gegenüber NGF erhöhen und damit das Neuritenwachstum verstärken (Arthur et al., 2005, Belliveau et al., 2006). Die Menge der ATP-Freisetzung ist dabei auch von der Dauer der Ischämie abhängig: Myozyten, die einer Ischämie für 60 und 90 Minuten mit anschließender Reperfusion ausgesetzt waren, nahmen nur leichte Schäden (geringer ATP-Verlust), nach 120 Minuten Ischämie war ein Überleben der Zellen bzw. eine Erholung von der Ischämie nur selten möglich (hoher ATP-Verlust) (Tumiati et al., 1994).

Ferner konnte der Einfluss des pH-Wertes auf die neuronale Aktivität bereits nachgewiesen werden: eine pH-Wert-Erhöhung führt zu einer gesteigerten Aktivität der Neurone und umgekehrt (Sinning und Hubner, 2013). Bei einer Hypoxie kommt es innerhalb der Myozyten durch eine anaerobe Glykolyse zur Laktatproduktion und Senkung des pH-Wertes (Graham et al., 2004). Somit ist es denkbar, dass beim Zelltod der Myozyten durch eine Ischämie Protonen aus dem Zellinneren freigesetzt werden und somit über die Veränderung des pH-Werts ein Einfluss auf die Aktivität der Neurone genommen wird. Auch ein Transport von Protonen aus dem Zellinneren findet im Rahmen einer Ischämie bzw. durch zu hohe Konzentrationen von Protonen intrazellulär über Transportproteine statt (Graham et al., 2004).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass während der Hypoxie vom Myokard freigesetztes H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) die Aktivität der intrakardialen Neurone, jeweils abhängig von der Zellpopulation, steigert oder hemmt (Thompson et al., 1998).

Die im Vergleich zur Kontrollgruppe größeren Längen der Neuriten 120 h n. I. sind, wie bereits unter 5.5 beschrieben, am wahrscheinlichsten durch eine Hypoxie-getriggert vermehrte Freisetzung neurotropher Substanzen zu erklären. Weitere Veränderungen der Neuritenlänge sind auf die Zugabe der atrialen Myozten zurückzuführen, wahrscheinlich sind dabei die während der Ischämie von ihnen freigesetzten Substanzen entscheidend. Es kann durch die Literatur keine sichere Erklärung für den genauen Verlauf der Neuritenlänge in der Kokultur mit passagerer Hypoxie gegeben werden.

5.7 Klinische Relevanz

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer Hypoxie das Neuritenwachstum der ICN gesteigert wird. Dies könnte zu einer veränderten Verschaltung innerhalb der und zwischen den GPs und damit zu einer veränderten autonomen Beeinflussung des Herzens mit der Folge von häufigeren Arrhythmien führen.

In der Literatur ist bekannt, dass im Fettgewebe um die Pulmonalvenen gelegene ICG direkten Kontakt zum Erregungsleitungssystem des Herzens, speziell dem Sinusknoten, besitzen (Zarzoso et al., 2013). Diese Ganglien enthalten sowohl sympathische als auch parasympathische Fasern und können sowohl negativ chronotrope (parasympathisch) als auch positiv chronotrope (sympathisch) Effekte über den Sinusknoten vermitteln (Zarzoso et al., 2013).

Auch für den AV-Knoten konnte eine parasympathische Innervation über intrakardiale Ganglien im Fettgewebe zwischen VCI und linkem Atrium gezeigt werden, über die die Überleitungszeit des AV-Knotens verändert wird (Gatti et al., 1995). Ebenso wird ein negativ inotroper Effekt auf die linksventrikuläre Kontraktilität über ein intrakardiales Ganglion vermittelt, das am oberen Rand, ventral des linken Ventrikels, am Übergang zum rechten Ventrikel gelegen ist (Gatti et al., 1997). Eine Dysregulation zwischen zentralen Einflüssen, den intrathorakalen und intrakardialen Ganglien nach Myokardinfarkt, wurde bereits nachgewiesen (Kember et al., 2013), ebenso wie eine Aktivität der intrakardialen Ganglien vor dem Auftreten atrialer Arrhythmien (Choi et al., 2010).

Es ist daher davon auszugehen, dass die über die Ganglien vermittelte Regulation der Chronotropie, Dromotropie und Inotropie durch Hypoxie pathologisch beeinträchtigt und infolgedessen die Arrhythmie-Entstehung begünstigt wird.

Das in dieser Arbeit gezeigte Neuritenwachstum der Neurone unter Hypoxie ist wahrscheinlich auf eine Freisetzung neurotropher Substanzen zurückzuführen.

Dafür sprechen die erhöhten NGF-Level unmittelbar nach MI bei Hunden (Zhou et al., 2004) und Ratten (Hasan et al., 2006), der Nachweis über Bildung in den Kardiomyozyten (Ieda et al., 2004) sowie das Wachstums von sympathischen Fasern nach NGF-Infusion (Cao et al., 2000). Dies ist kongruent mit Beobachtungen, dass nach MI sowie bei Ischämie mit folgender Reperfusion die Häufigkeit von Arrhythmien zunimmt und dies mit dem Wachstum von Nervenfasern sowie Umstrukturierung der sympathischen Innervation einhergeht (Du und Dart, 1999, Billman, 2006a). Sowohl die mögliche Provokation von Arrhythmien durch erhöhte sympathische Aktivität (Billman, 2006b, Jiang et al., 2008) als auch deren Verhinderung durch Reduzierung des sympathischen Tonus (De Ferrari et al., 1993, Kendall et al., 1995), lassen eine Kausalität vermuten (Li und Li, 2015). Daher könnte die erhöhte NGF-Freisetzung zu einem Nervenwachstum von sympathischen Fasern führen und damit eine tragende Rolle für die Arrhythmie-Entstehung spielen (Durães Campos et al., 2018). Allerdings kann auch eine zu geringe NGF-Produktion (u. a. bei diabetischer Polyneuropathie) eine Arrhythmie begünstigen (Fukuda et al., 2015). Durch eine gezielte Anpassung der NGF-Verfügbarkeit entsprechend den physiologischen Bedingungen könnte die Entstehung von Arrhythmien daher verhindert werden.

Jedoch zeigen andere Studien auch einen positiven Effekt durch Gabe von NGF nach MI auf, da NGF durch Angiogenese sowohl das Überleben von Endothelzellen als auch Myokardzellen im periinfarziellen Gebiet fördert (Meloni et al., 2010). Durch ein Fehlen des NGFs könnte sogar eine Abnahme der linksventrikulären Funktion sowie Dilatation erklärt werden (Meloni et al., 2010). Außerdem wurde bei Kardiomyozyten für NGF ein die Proliferation induzierender Effekt (Lam et al., 2012) sowie ein direkter anti-apoptotischer Effekt nachgewiesen (Caporali et al., 2008).

Es ist somit anzunehmen, dass NGF sowohl die Arrhythmie-Entstehung unter Hypoxie begünstigt, allerdings auch förderliche Effekte auf das Myokard hat. Eine einfache Inhibition von NGF unter Hypoxie, z. B. im Rahmen einer KHK oder nach MI,

über NGF-Antikörper, wie sie in der Schmerztherapie getestet werden (Bannwarth und Kostine, 2014), wäre daher wahrscheinlich mit verschiedenen negativen Effekten behaftet. Hier bedarf es weiterer Forschung.

Therapeutische Optionen bei persistierendem Vorhofflimmern bestehen in einer Ablation der GPs, wobei in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass eine Pulmonalvenenisolation kombiniert mit einer Ablation der GPs deutlich bessere Ergebnisse hervorbringt als eines der Verfahren alleine (Choi et al., 2017). Durch eine Ablation der ICG nach Myokardinfarkt könnte die Entstehung von Arrhythmien verhindert bzw. verringert werden. Dabei spielt die Modulation der Sympathikus-Aktivität eine entscheidende Rolle (Yu et al., 2017). Es bleibt dabei jedoch zu beachten, dass eine Ablation der GPs ebenso proarrhythmische Effekte, nach vorheriger Senkung der Arrhythmiehäufigkeit, haben kann (Mao et al., 2014).

Ein anderes therapeutisches Konzept ist die vagale Nervenstimulation (VNS): Diese kann die infarktbedingten Folgen auf neuronaler und myozytärer Ebene abschwächen (Beaumont et al., 2015). Durch VNS werden sowohl AP-Rate und synaptische Übertragungsrate erniedrigt, als auch pro-apoptotische Signale auf das Myokard reduziert (Beaumont et al., 2015). Zusammenfassend wird der VNS ein die kardiale Kontraktion und damit den kardialen Auswurf verbessernder (Beaumont et al., 2015) sowie ein anti-arrhythmischer Effekt zugeschrieben (Hou et al., 2016).

Somit basiert bereits ein wichtiger Teil der Therapie kardialer Arrhythmien auf der Modulation des intrinsischen kardialen autonomen Nervensystems (Waldron et al., 2019). Durch weitere Erforschung der ICN könnten gezieltere und somit risikoärmere Therapie- ggf. sogar Präventionsoptionen zur Behandlung von kardialen Arrhythmien entwickelt werden.

5.8 Limitationen der Arbeit

Es ist anzumerken, dass v. a. die Dichte der Zellen in den einzelnen Kulturen den Auswertungszeitraum deutlich eingegrenzt hat. So konnte eine klare Abgrenzung der Neurone zu nicht-neuronalen Zellen (v. a. Fibroblasten) 144 h n. I. nicht sicher erfolgen. Nur in der Kokultur mit Hypoxie, aufgrund einer geringen Dichte von nicht-neuronalen Zellen, konnte dieser Zeitpunkt bestimmt werden.

Hinzu kommt, dass es nicht möglich war, immer die gleiche(n) Zelle(n) zu beobachten, um so den Wachstumsverlauf genauer charakterisieren und ggf. Unterschiede zwischen einzelnen Zelltypen im Detail feststellen zu können. Dies lag daran, dass beim Wechsel des Mediums, welcher einmal pro Tag durchgeführt werden musste, die Zellen ihre Position veränderten oder bereits einige Bereiche von nicht-neuronalen Zellen flächenhaft verdeckt wurden. Da durch die hier angewandte Isolationsmethodik immer auch Fibroblasten bzw. nicht-neuronale Zellen in relevanter Zahl in der Kultur zu finden waren, konnte die Dichte an ICN nicht erhöht werden, indem mehr Gewebe pro Kulturschale ausgesät wurde, da die nicht-neuronalen Zellen die ICN dann früher überwachsen hätten. Daher war es auch nicht möglich, die Ausbildung von Netzwerken innerhalb der ICN bzw. Kontakte zwischen ICN und Kardiomyozyten langfristig zu beobachten.

Das Vorhandensein von Kardiomyozyten, Neuronen und Fibroblasten in der Kokultur entspricht annähernd der tatsächlichen Situation im Herzen, jedoch fehlen entscheidende Einflüsse, wie etwa die elektrische Stimulation der Myozyten, zirkulierende Hormone oder das Zusammenspiel der ICN mit intrathorakalen Ganglien oder dem Rückenmark bzw. Gehirn. Diese Einflüsse könnten allerdings in zukünftigen Untersuchungen simuliert werden, z. B. indem eine elektrische Stimulation der Zellen über das Medium erfolgt.

6. Zusammenfassung

Im epikardialen Fettgewebe gelegene intrinsische kardiale GPs sind an der Regulation des Herzrhythmus beteiligt und spielen in der Pathophysiologie verschiedener Rhythmusstörungen (u. a. Vorhofflimmern und Arrhythmien nach Myokardinfarkt) eine bedeutende Rolle. Die genaue Funktion dieser intrinsischen kardialen Ganglien bzw. intrakardialen Neurone (ICN) sowie ihre Interaktion mit anderen Zellen sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Interaktion zwischen atrialen Myozyten und ICN im Hinblick auf das Neuritenwachstum zu untersuchen. Dazu wurde ein Kokultur-Modell von ICN und atrialen Myokardzellen (HL-1-Zellen) der Maus etabliert und der Einfluss einer Hypoxie auf das Neuritenwachstum untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Es konnte ein Kokultur-Modell aus ICN und atrialen Myozyten mit stetigem Neuritenwachstum der ICN etabliert werden.
2. Unter Hypoxie kommt es zu einem vermehrten Neuritenwachstum der ICN.
3. Durch die Kokultivierung mit atrialen Myozyten wird das Neuritenwachstum der ICN moduliert.

Somit konnte auf zellulärer Ebene der Einfluss einer direkten Interaktion zwischen atrialen Myozyten und Neuronen sowie einer Hypoxie auf das Neuritenwachstum der ICN in der Maus dargestellt werden. Durch die Etablierung der Kokultur- und des Hypoxie-Modells bietet sich die Möglichkeit, molekulare Mechanismen der Entstehung von Arrhythmien zu untersuchen und pharmakologische Wirkstoffe zu testen. In weiteren Schritten könnte auch der Einfluss von elektrischer Stimulation auf die ICN-Kulturen untersucht werden.

7. Abstract

Intrinsic cardiac ganglia, arranged in plexus located in the epicardial fat pads, take part in the regulation of heart rhythm and play a significant role in the genesis of diversive rhythmologic pathologies (e.g. atrial fibrillation and arrhythmia induction after myocardial infarction). The specific function of these ganglia resp. the intrinsic cardiac neurons (ICN) contained and their interaction with other cells haven't been completely understood yet. Thus the intention of this work was to investigate the interaction between HL-1-cells (atrial myocytes) and ICN regarding their neurites' growth.

A coculture-model of ICN and HL-1-cells was established and the influence of hypoxia on neurites' length was examined. The results can be summarized as following:

1. A coculture of ICN and HL-1-cells with steady neurites' growth could be established
2. Hypoxia causes an increase in growth of ICN's neurites
3. Coculturing ICN with HL-1-cells modulates the neurites' growth of ICN.

Therefore, the influence of a direct interaction between neurons and cardiac myocytes as well as of a hypoxia was proven on a cellular level. By establishing the coculture and by usage of the hypoxia-model we get the chance to do further research on the molecular mechanisms that cause an arrhythmia and on the effect of pharmacological agents. Furthermore the influence of electrical stimulation on ICN could be investigated.

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AD-GP	anteriöer absteigender Ganglienplexus
ANS	Autonomes Nervensystem
AP	Aktionspotenzial
AR-GP	Aortenwurzel-Ganglienplexus
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikular-Knoten
AV-Überleitungszeit	atrioventrikuläre Überleitungszeit
BDNF	<i>brainderived neurotrophic factor</i>
BG	Blutgefäß
βIII	Beta/III-Tubulin
Br	Bronchus
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ChAT	Cholinacetyltransferase
CKD	chronisches Nierenversagen
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
d. h.	das heisst
DADs	verzögerte Nachdepolarisationen
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPN	Efferente parasymphatische Neurone
ESN	Efferente symphatische Neurone
etc.	et cetera
Fe	Fettgewebe
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
ggü.	Gegenüber
GP	Ganglienplexus
h	Stunde(n)
H ⁺	Proton
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser

HE	Haematoxylin-Eosin
ICG	intrinsische kardiale Ganglien
ICN	intrakardiale Neurone
K ⁺	Kalium
KHK	Koronare Herzerkrankung
LSGP	superiorer linksatrialer Ganglienplexus
M	Molar
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-Rezeptoren	muskarinerge Rezeptoren
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
My	Myokard
n. l.	nach Isolation
N ₂	Stickstoff
NA	Noradrenalin
Na ⁺	Natrium
NaCl-Lösung	isotonische Kochsalzlösung
NF	Neurofilament
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nM	Nanomolar
NZK	Nervenzellkörper
OM-GP	links-marginaler Ganglienplexus
OSAS	obstruktives Schlafapnoesyndrom
Par	Pulmonalarterie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphat buffered saline</i>)
PD-GP	posteriorer absteigender Ganglienplexus
PGP 9.5	protein gene product 9.5
PLLAGP	posterolateraler linksatrialer Ganglienplexus
PMLAGP	posteromedialer linksatrialer Ganglienplexus
PNS	Peripheres Nervensystem
PVI	Pulmonalvenenisolation
RAGP	superiorer rechtsatrialer Ganglienplexus
RAM-GP	rechts-marginaler Ganglienplexus
resp.	respektive
RIGP	posteriorer rechtsatrialer Ganglienplexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RIVP	Ramus interventricularis posterior
RLGP	rechter unterer Ganglienplexus
s.	siehe
s. a.	siehe auch
s. o.	siehe oben

8. Abkürzungsverzeichnis

s. u.	siehe unten
SE	Septum
SIF-Zellen.....	<i>small intensely fluorescent cells</i>
SZ.....	Satellitenzellen
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TH	Tyrosinhydroxylase
Thy	Thymus
TP.....	Truncus pulmonalis
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VCI	Vena cava inferior
VCS.....	Vena cava superior
VHF	Vorhofflimmern
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VNS.....	vagale Nervenstimulation
xg	relative Zentrifugalkraft
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Literaturverzeichnis

- Abboud F. M., Benson C. J. (2015) ASICs and cardiovascular homeostasis. *Neuropharmacology*. 94: 87-98.
- Ahles A., Engelhardt S. (2014) Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease. *Pharmacol Rev*. 66: 598-637.
- Akar J. G., Akar F. G. (2007) Regulation of ion channels and arrhythmias in the ischemic heart. *J Electrocardiol*. 40: S37-41.
- Allen E., Coote J. H., Grubb B. D., Batten T. F. C., 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.
- Ardell J. L., Andresen M. C., Armour J. A., Billman G. E., Chen P. S., Foreman R. D., Herring N., O'Leary D. S., Sabbah H. N., Schultz H. D., Sunagawa K., Zucker I. H. (2016) Translational neurocardiology: preclinical models and cardioneural integrative aspects. *J Physiol*. 594: 3877-3909.
- 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: H713-721.
- Ardell J. L., Rajendran P. S., Nier H. A., KenKnight B. H., Armour J. A. (2015) Central-peripheral neural network interactions evoked by vagus nerve stimulation: functional consequences on control of cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 309: H1740-1752.
- Ardell J. L., Randall W. C., Cannon W. J., Schmacht D. C., Tasdemiroglu E. (1988) Differential sympathetic regulation of automatic, conductile, and contractile tissue in dog heart. *Am J Physiol*. 255: H1050-1059.
- Armour J. A. (1994) Peripheral autonomic neuronal interactions in cardiac regulation. In: *Neurocardiology*. A. J. Armour JA (Hrg.), Oxford University Press, New York, 219-244.
- Armour J. A. (1999) Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. *Cardiovasc Res*. 41: 41-54.
- Armour J. A. (2004) Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287: R262-271.
- Armour J. A. (2008) Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Exp Physiol*. 93: 165-176.
- Armour J. A., Hopkins D. A. (1990) Activity of in vivo canine ventricular neurons. *Am J Physiol*. 258: H326-336.
- 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: 289-298.
- Arora R. C., Waldmann M., Hopkins D. A., Armour J. A. (2003) Porcine intrinsic cardiac ganglia. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 271: 249-258.
- Arthur D. B., Akassoglou K., Insel P. A. (2005) P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 19138-19143.
- Ashton J. L., Burton R. A. B., Bub G., Smaill B. H., Montgomery J. M. (2018) Synaptic Plasticity in Cardiac Innervation and Its Potential Role in Atrial Fibrillation. *Front Physiol*. 9: 240.
- Avwioro G. (2011) Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. *Journal of Physics: Conference Series*. 1: 24-34.
- Baird D. H., Hatten M. E., Mason C. A. (1992) Cerebellar target neurons provide a stop signal for afferent neurite extension in vitro. *J Neurosci*. 12: 619-634.
- Baluk P., Gabella G. (1987) Fine structure of the autonomic ganglia of the mouse pulmonary vein. *J Neurocytol*. 16: 169-184.
- Banchero N. (1987) Cardiovascular responses to chronic hypoxia. *Annu Rev Physiol*. 49: 465-476.

- Banerjee I., Fuseler J. W., Price R. L., Borg T. K., Baudino T. A. (2007) Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293: H1883-1891.
- Bangash M. N., Kong M. L., Pearse R. M. (2012) Use of inotropes and vasopressor agents in critically ill patients. *Br J Pharmacol.* 165: 2015-2033.
- Bannwarth B., Kostine M. (2014) Targeting nerve growth factor (NGF) for pain management: what does the future hold for NGF antagonists? *Drugs.* 74: 619-626.
- Baptista C. A., Kirby M. L. (1997) The cardiac ganglia: cellular and molecular aspects. *Kaohsiung J Med Sci.* 13: 42-54.
- Battipaglia I., Lanza G. A. (2015) The Autonomic Nervous System of the Heart. In: *Autonomic Innervation of the Heart.* Springer, 1-12.
- Baum J., Duffy H. S. (2011) Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* 57: 376-379.
- Baumeister P., Quinn T. A. (2016) Altered Calcium Handling and Ventricular Arrhythmias in Acute Ischemia. *Clinical Medicine Insights. Cardiology.* 10: 61-69.
- 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: 4515-4533.
- Beaumont E., Southerland E. M., Hardwick J. C., Wright G. L., Ryan S., Li Y., KenKnight B. H., Armour J. A., Ardell J. L. (2015) Vagus nerve stimulation mitigates intrinsic cardiac neuronal and adverse myocyte remodeling postmyocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 309: H1198-1206.
- Behar J., Ganesan A., Zhang J., Yaniv Y. (2016) The Autonomic Nervous System Regulates the Heart Rate through cAMP-PKA Dependent and Independent Coupled-Clock Pacemaker Cell Mechanisms. *Front Physiol.* 7.
- Belliveau D. J., Bani-Yaghoob M., McGirr B., Naus C. C., Rushlow W. J. (2006) Enhanced neurite outgrowth in PC12 cells mediated by connexin hemichannels and ATP. *J Biol Chem.* 281: 20920-20931.
- Bers D. M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415: 198-205.
- Bibevski S., Zhou Y., McIntosh J. M., Zigmond R. E., Dunlap M. E. (2000) Functional nicotinic acetylcholine receptors that mediate ganglionic transmission in cardiac parasympathetic neurons. *J Neurosci.* 20: 5076-5082.
- Bignami F., Bevilacqua P., Biagioni S., De Jaco A., Casamenti F., Felsani A., Augusti-Tocco G. (1997) Cellular acetylcholine content and neuronal differentiation. *J Neurochem.* 69: 1374-1381.
- Billman G. E. (2006a) A comprehensive review and analysis of 25 years of data from an in vivo canine model of sudden cardiac death: implications for future anti-arrhythmic drug development. *Pharmacol Ther.* 111: 808-835.
- Billman G. E. (2006b) Heart rate response to onset of exercise: evidence for enhanced cardiac sympathetic activity in animals susceptible to ventricular fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: H429-435.
- Brack K. E. (2015) The heart's 'little brain' controlling cardiac function in the rabbit. *Exp Physiol.* 100: 348-353.
- Brack K. E., Winter J., Ng G. (2013) Mechanisms underlying the autonomic modulation of ventricular fibrillation initiation—tentative prophylactic properties of vagus nerve stimulation on malignant arrhythmias in heart failure. *Heart Fail Rev.* 18: 389-408.
- Bravený P. (2002) Heart, calcium and time. *Exp Clin Cardiol.* 7: 3-6.
- Brewer G. J., Torricelli J. R., Evege E. K., Price P. J. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res.* 35: 567-576.
- Brodde O. E., Michel M. C. (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev.* 51: 651-690.

- Brown T. M., Fee E. (2002) Walter Bradford Cannon: Pioneer Physiologist of Human Emotions. *Am J Public Health*. 92: 1594-1595.
- Buffington S. A., Rasband M. N. (2011) The axon initial segment in nervous system disease and injury. *Eur J Neurosci*. 34: 1609-1619.
- Calo L., Rebecchi M., Sciarra L., De Luca L., Fagagnini A., Zuccaro L. M., Pitrone P., Dottori S., Porfirio M., de Ruvo E., Lioy E. (2012) Catheter ablation of right atrial ganglionated plexi in patients with vagal paroxysmal atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 5: 22-31.
- Camelliti P., Borg T. K., Kohl P. (2005a) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 65: 40-51.
- Camelliti P., McCulloch A. D., Kohl P. (2005b) Microstructured cocultures of cardiac myocytes and fibroblasts: a two-dimensional in vitro model of cardiac tissue. *Microsc Microanal*. 11: 249-259.
- Cannavo A., Koch W. J. (2017) Targeting β 3-Adrenergic Receptors in the Heart: Selective Agonism and β -Blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*. 69: 71-78.
- Cao J. M., Chen L. S., KenKnight B. H., Ohara T., Lee M. H., Tsai J., Lai W. W., Karagueuzian H. S., Wolf P. L., Fishbein M. C., Chen P. S. (2000) Nerve Sprouting and Sudden Cardiac Death. *Circulation Research*. 86: 816-821.
- Caporali A., Sala-Newby G. B., Meloni M., Graiani G., Pani E., Cristofaro B., Newby A. C., Madeddu P., Emanuelli C. (2008) Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell Death Differ*. 15: 299-311.
- Chen P. S., Chen L. S., Fishbein M. C., Lin S. F., Nattel S. (2014) Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res*. 114: 1500-1515.
- Chen S. A., Chiang C. E., Tai C. T., Wen Z. C., Lee S. H., Chiou C. W., Ding Y. A., Chang M. S. (1998) Intracardiac stimulation of human parasympathetic nerve fibers induces negative dromotropic effects: implication with the lesions of radiofrequency catheter ablation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 9: 245-252.
- Chen S. X., Haas K. (2011) Function directs form of neuronal architecture. *Bioarchitecture*. 1: 2-4.
- Chen Z., Lee H., Henle S. J., Cheever T. R., Ekker S. C., Henley J. R. (2013) Primary neuron culture for nerve growth and axon guidance studies in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*. 8: e57539.
- Chiong M., Wang Z. V., Pedrozo Z., Cao D. J., Troncoso R., Ibacache M., Criollo A., Nemchenko A., Hill J. A., Lavandero S. (2011) Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell death & disease*. 2: e244-e244.
- Cho Y., Shin Jung E., Ewan Eric E., Oh Young M., Pita-Thomas W., Cavalli V. (2015) Activating Injury-Responsive Genes with Hypoxia Enhances Axon Regeneration through Neuronal HIF-1 α . *Neuron*. 88: 720-734.
- Choi E.-K., Zhao Y., Everett T. H. t., Chen P.-S. (2017) Ganglionated plexi as neuromodulation targets for atrial fibrillation. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 28: 1485-1491.
- Choi E. K., Shen M. J., Han S., Kim D., Hwang S., Sayfo S., Piccirillo G., Frick K., Fishbein M. C., Hwang C., Lin S. F., Chen P. S. (2010) Intrinsic cardiac nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmia in ambulatory dogs. *Circulation*. 121: 2615-2623.
- Church D. M., Goodstadt L., Hillier L. W., Zody M. C., Goldstein S., She X., Bult C. J., Agarwala R., Cherry J. L., DiCuccio M., Hlavina W., Kapustin Y., Meric P., Maglott D., Birtle Z., Marques A. C., Graves T., Zhou S., Teague B., Potamousis K., Churas C., Place M., Herschleb J., Runnheim R., Forrest D., Amos-Landgraf J., Schwartz D. C., Cheng Z., Lindblad-Toh K., Eichler E. E., Ponting C. P. (2009) Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol*. 7: e1000112.
- Claycomb W. C., Lanson N. A., Jr., Stallworth B. S., Egeland D. B., Delcarpio J. B., Bahinski A., Izzo N. J., Jr. (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 2979-2984.
- Cole S. W., Nagaraja A. S., Lutgendorf S. K., Green P. A., Sood A. K. (2015) Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 15: 563-572.

- Coote J. H. (2013) Myths and realities of the cardiac vagus. *J Physiol.* 591: 4073-4085.
- Coote J. H., Chauhan R. A. (2016) The sympathetic innervation of the heart: Important new insights. *Auton Neurosci.* 199: 17-23.
- Corr P. B., Yamada K. A. (1995) Selected metabolic alterations in the ischemic heart and their contributions to arrhythmogenesis. *Herz.* 20: 156-168.
- Corrado D., Basso C., Thiene G. (2001) Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc Res.* 50: 399-408.
- Cosentino S., Banfi C., Burbiel J. C., Luo H., Tremoli E., Abbracchio M. P. (2012) Cardiomyocyte death induced by ischaemic/hypoxic stress is differentially affected by distinct purinergic P2 receptors. *Journal of cellular and molecular medicine.* 16: 1074-1084.
- Cullen D. K., Gilroy M., Irons H. R., LaPlaca M. C. (2010) Synapse-to-neuron ratio is inversely related to neuronal density in mature neuronal cultures. *Brain Res.* 1359: 44-55.
- Dampney R. A. L. (2016) Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Advances in Physiology Education.* 40: 283-296.
- 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: 283-290.
- De Jaco A., Augusti-Tocco G., Biagioni S. (2002) Muscarinic acetylcholine receptors induce neurite outgrowth and activate the synapsin I gene promoter in neuroblastoma clones. *Neuroscience.* 113: 331-338.
- De Maziere A. M., van Ginneken A. C., Wilders R., Jongsma H. J., Bouman L. N. (1992) Spatial and functional relationship between myocytes and fibroblasts in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol.* 24: 567-578.
- de Morree H. M., Szabó B. M., Rutten G. J., Kop W. J. (2013) Central nervous system involvement in the autonomic responses to psychological distress. *Netherlands Heart Journal.* 21: 64-69.
- Dewan N. A., Nieto F. J., Somers V. K. (2015) Intermittent Hypoxemia and OSA: Implications for Comorbidities. *Chest.* 147: 266-274.
- Doevendans P. A., Daemen M. J., de Muinck E. D., Smits J. F. (1998) Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res.* 39: 34-49.
- Dotti C. G., Sullivan C. A., Banker G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 8: 1454-1468.
- Drexel T. (2015) Bedeutung der simultanen Aktivierung des sympathischen und parasympathischen Nervensystems bei Patienten mit Vorhofflimmern. Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Driver K., Mangrum J. M. (2015) Hybrid approaches in atrial fibrillation ablation: why, where and who? *Journal of thoracic disease.* 7: 159-164.
- Du X. J., Dart A. M. (1999) Role of sympathoadrenergic mechanisms in arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 43: 832-834.
- Durães Campos I., Pinto V., Sousa N., Pereira V. H. (2018) A brain within the heart: A review on the intracardiac nervous system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 119: 1-9.
- Eccles J. C. (1982) The synapse: from electrical to chemical transmission. *Annu Rev Neurosci.* 5: 325-339.
- Edstrom A., Ekstrom P. A., Tonge D. (1996) Axonal outgrowth and neuronal apoptosis in cultured adult mouse dorsal root ganglion preparations: effects of neurotrophins, of inhibition of neurotrophin actions and of prior axotomy. *Neuroscience.* 75: 1165-1174.
- Eghbali M., Tomek R., Woods C., Bhambi B. (1991) Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 795-799.
- Ehinger B., Falck B., Persson H., Sporrang B. (1968) Adrenergic and cholinesterase-containing neurons of the heart. *Histochemie.* 16: 197-205.

- 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. *Adv Exp Med Biol.* 788: 273-282.
- Ellison J. P., Hibbs R. G. (1976) An ultrastructural study of mammalian cardiac ganglia. *J Mol Cell Cardiol.* 8: 89-101.
- Eränkö O. (1976) SIF cells : structure and function of the small, intensely fluorescent sympathetic cells, [U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health] : For sale by the Supt. of Docs., U.S. Govt. Print. Off. [Bethesda, Md.].
- Erdos E. G. (1976) Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am J Med.* 60: 749-759.
- Fagerholm V., Haaparanta M., Scheinin M. (2011) α 2-Adrenoceptor Regulation of Blood Glucose Homeostasis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology.* 108: 365-370.
- Farmakis D., Parissis J., Filippatos G. (2014) Insights into onco-cardiology: atrial fibrillation in cancer. *J Am Coll Cardiol.* 63: 945-953.
- Fasano C., Niel J. P. (2009) The mammalian sympathetic prevertebral ganglia: models for the study of neuronal networks and basic neuronal properties. *Auton Neurosci.* 150: 8-20.
- Ferreira C., Providência R., Ferreira M. J., Gonçalves L. M. (2015) Atrial Fibrillation and Non-cardiovascular Diseases: A Systematic Review. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 105: 519-526.
- Foreman R. D., Garrett K. M., Blair R. W. (2015) Mechanisms of cardiac pain. *Compr Physiol.* 5: 929-960.
- Foreman R. D., Linderorth B., Ardell J. L., Barron K. W., Chandler M. J., Hull S. S., Jr., TerHorst G. J., DeJongste M. J., Armour J. A. (2000) Modulation of intrinsic cardiac neurons by spinal cord stimulation: implications for its therapeutic use in angina pectoris. *Cardiovasc Res.* 47: 367-375.
- Francis Stuart S. D., De Jesus N. M., Lindsey M. L., Ripplinger C. M. (2016) The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 91: 114-122.
- Frost L., Molgaard H., Christiansen E. H., Hjortholm K., Paulsen P. K., Thomsen P. E. (1992) Atrial fibrillation and flutter after coronary artery bypass surgery: epidemiology, risk factors and preventive trials. *Int J Cardiol.* 36: 253-261.
- Fukuda K., Kanazawa H., Aizawa Y., Ardell J. L., Shivkumar K. (2015) Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circulation Research.* 116: 2005-2019.
- Furness J. B. (2006) The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Auton Neurosci.* 130: 1-5.
- 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. *Adv Exp Med Biol.* 817: 39-71.
- Furukawa Y., Wallick D. W., Martin P. J., Levy M. N. (1990) Chronotropic and dromotropic responses to stimulation of intracardiac sympathetic nerves to sinoatrial or atrioventricular nodal region in anesthetized dogs. *Circ Res.* 66: 1391-1399.
- Gardner R. T., Ripplinger C. M., Myles R. C., Habecker B. A. (2016) Molecular Mechanisms of Sympathetic Remodeling and Arrhythmias. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology.* 9: e001359-e001359.
- Gatti P. J., Johnson T. A., McKenzie J., Lauenstein J. M., Gray A., Massari V. J. (1997) Vagal control of left ventricular contractility is selectively mediated by a cranioventricular intracardiac ganglion in the cat. *J Auton Nerv Syst.* 66: 138-144.
- Gatti P. J., Johnson T. A., Phan P., Jordan I. K., 3rd, Coleman W., Massari V. J. (1995) The physiological and anatomical demonstration of functionally selective parasympathetic ganglia located in discrete fat pads on the feline myocardium. *J Auton Nerv Syst.* 51: 255-259.
- Gaztañaga L., Marchlinski F. E., Betensky B. P. (2012) Mechanisms of Cardiac Arrhythmias. *Revista Española de Cardiología (English Edition).* 65: 174-185.

- Genetos D. C., Cheung W. K., Decaris M. L., Leach J. K. (2010) Oxygen tension modulates neurite outgrowth in PC12 cells through a mechanism involving HIF and VEGF. *Journal of molecular neuroscience* : MN. 40: 360-366.
- Ghuran A. V., Camm A. J. (2001) Ischaemic heart disease presenting as arrhythmias. *British Medical Bulletin*. 59: 193-210.
- Gibbins I. (2013) Functional organization of autonomic neural pathways. *Organogenesis*. 9: 169-175.
- Giller E., Neale J., Bullock P., Schrier B., Nelson P. (1977) Choline acetyltransferase activity of spinal cord cell cultures increased by co-culture with muscle and by muscle-conditioned medium. *J Cell Biol*. 74: 16-29.
- Gordan R., Gwathmey J. K., Xie L. H. (2015) Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol*. 7: 204-214.
- Gourine A., Gourine A. V. (2014) Neural Mechanisms of Cardioprotection. *Physiology*. 29: 133-140.
- Graham R. M., Frazier D. P., Thompson J. W., Haliko S., Li H., Wasserlauf B. J., Spiga M. G., Bishopric N. H., Webster K. A. (2004) A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J Exp Biol*. 207: 3189-3200.
- Gramley F., Lorenzen J., Jedamzik B., Gatter K., Koellensperger E., Munzel T., Pezzella F. (2010) Atrial fibrillation is associated with cardiac hypoxia. *Cardiovasc Pathol*. 19: 102-111.
- Gray M. A., Taggart P., Sutton P. M., Groves D., Holdright D. R., Bradbury D., Brull D., Critchley H. D. (2007) A cortical potential reflecting cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 6818-6823.
- Gulbenkian S., Wharton J., Polak J. M. (1987) The visualisation of cardiovascular innervation in the guinea pig using an antiserum to protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *J Auton Nerv Syst*. 18: 235-247.
- Haga T. (2013) Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 89: 226-256.
- Hall T. M., Gordon C., Roy R., Schwenke D. O. (2016) Delayed coronary reperfusion is ineffective at impeding the dynamic increase in cardiac efferent sympathetic nerve activity following myocardial ischemia. *Basic Research in Cardiology*. 111: 35.
- Harvey R. D. (2012) Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function. *Handb Exp Pharmacol*. 299-316.
- Hasan W. (2013) Autonomic cardiac innervation: development and adult plasticity. *Organogenesis*. 9: 176-193.
- 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 Res*. 1124: 142-154.
- Hasan W., Smith P. G. (2000) Nerve growth factor expression in parasympathetic neurons: regulation by sympathetic innervation. *Eur J Neurosci*. 12: 4391-4397.
- Hasenfuss G. (1998) Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular Research*. 39: 60-76.
- Hawkins J., Ahmad S. (2016) Why Neurons Have Thousands of Synapses, a Theory of Sequence Memory in Neocortex. *Front Neural Circuits*. 10.
- He B., Lu Z., He W., Wu L., Cui B., Hu X., Yu L., Huang C., Jiang H. (2013) Effects of ganglionated plexi ablation on ventricular electrophysiological properties in normal hearts and after acute myocardial ischemia. *Int J Cardiol*. 168: 86-93.
- He Y., Baas P. W. (2003) Growing and Working with Peripheral Neurons. In: *Methods in Cell Biology*. Academic Press, 17-35.
- Heckmann M., Dudel J. (2010) Synaptische Übertragung. In: *Physiologie des Menschen*. R. F. Schmidt, F. Lang, M. Heckmann (Hrg.), Springer, Heidelberg, 76-97.
- Heijman J., Voigt N., Nattel S., Dobrev D. (2014) Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res*. 114: 1483-1499.

- Her W. Y., Fu Y. S., Liu T. S., Liu K. M. (2000) Morphological study of cultured cardiac ganglionic neurons from different postnatal stages of rats. *Auton Neurosci.* 84: 89-97.
- Heusch G., Libby P., Gersh B., Yellon D., Bohm M., Lopaschuk G., Opie L. (2014) Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet.* 383: 1933-1943.
- Hiltunen J. O., Laurikainen A., Vakeva A., Meri S., Saarna M. (2001) Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *J Pathol.* 194: 247-253.
- Hoard J. L., Hoover D. B., Mabe A. M., Blakely R. D., Feng N., Paolocci N. (2008) Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase A and p75. *Neuroscience.* 156: 129-142.
- Hoard J. L., Hoover D. B., Wondergem R. (2007) Phenotypic properties of adult mouse intrinsic cardiac neurons maintained in culture. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293: C1875-1883.
- 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: 1170-1179.
- Horackova M., Armour J. A., Hopkins D. A., Huang M. H. (1995) Nitric oxide modulates signaling between cultured adult peripheral cardiac neurons and cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 269: C504-510.
- Horackova M., Croll R. P., Hopkins D. A., Losier A. M., Armour J. A. (1996) Morphological and immunohistochemical properties of primary long-term cultures of adult guinea-pig ventricular cardiomyocytes with peripheral cardiac neurons. *Tissue Cell.* 28: 411-425.
- Horackova M., Huang M. H., Armour J. A., Hopkins D. A., Mapplebeck C. (1993) Cocultures of adult ventricular myocytes with stellate ganglia or intrinsic cardiac neurones from guinea pigs: spontaneous activity and pharmacological properties. *Cardiovasc Res.* 27: 1101-1108.
- Hou Y., Scherlag B. J., Lin J., Zhang Y., Lu Z., Truong K., Patterson E., Lazzara R., Jackman W. M., Po S. S. (2007a) 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: 61-68.
- Hou Y., Scherlag B. J., Lin J., Zhou J., Song J., Zhang Y., Patterson E., Lazzara R., Jackman W. M., Po S. S. (2007b) Interactive atrial neural network: Determining the connections between ganglionated plexi. *Heart Rhythm.* 4: 56-63.
- Hou Y., Zhou Q., Po S. S. (2016) Neuromodulation for cardiac arrhythmia. *Heart Rhythm.* 13: 584-592.
- Hu H.-S., Xue M., Xu R., Wang X.-j., Chen M.-y., Yan S.-H. (2014) Sudden asystole during radiofrequency ablation: a case report and literature review. *BMC research notes.* 7: 351-351.
- Huang M. H., Ardell J. L., Hanna B. D., Wolf S. G., Armour J. A. (1993) Effects of transient coronary artery occlusion on canine intrinsic cardiac neuronal activity. *Integr Physiol Behav Sci.* 28: 5-21.
- Huang W. A., Shivkumar K., Vaseghi M. (2015) Device-Based Autonomic Modulation in Arrhythmia Patients: the Role of Vagal Nerve Stimulation. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 17: 379.
- Hung M. J., Hu P., Hung M. Y. (2014) Coronary Artery Spasm: Review and Update. *Int J Med Sci.* 11: 1161-1171.
- Ieda M., Fukuda K., Hisaka Y., Kimura K., Kawaguchi H., Fujita J., Shimoda K., Takeshita E., Okano H., Kurihara Y., Kurihara H., Ishida J., Fukamizu A., Federoff H. J., Ogawa S. (2004) Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest.* 113: 876-884.
- James T. N. (1961) Myocardial infarction and atrial arrhythmias. *Circulation.* 24: 761-776.

- Jang H. S., Cho K. H., Hieda K., Kim J. H., Murakami G., Abe S., Matsubara A. (2015) Composite nerve fibers in the hypogastric and pelvic splanchnic nerves: an immunohistochemical study using elderly cadavers. *Anat Cell Biol.* 48: 114-123.
- Jänig W. (2006) Impulse transmission through autonomic ganglia. In: *The Integrative Action of the Autonomic Nervous System*. W. Jänig (Hrg.), Cambridge University Press, Cambridge, 211-274.
- Jänig W. (2014) Sympathetic nervous system and inflammation: A conceptual view. *Autonomic Neuroscience.* 182: 4-14.
- Jiang H., Hu X., Lu Z., Wen H., Zhao D., Tang Q., Yang B. (2008) Effects of sympathetic nerve stimulation on ischemia-induced ventricular arrhythmias by modulating connexin43 in rats. *Arch Med Res.* 39: 647-654.
- Jing F., Mogi M., Sakata A., Iwanami J., Tsukuda K., Ohshima K., Min L.-J., Steckelings U. M., Unger T., Dahlöf B., Horiuchi M. (2012) Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor enhances spatial memory. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 32: 248-255.
- Johnson M. (1998) The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med.* 158: S146-153.
- Jungen C., Scherschel K., Eickholt C., Kuklik P., Klatt N., Bork N., Salzbrunn T., Alken F., Angendohr S., Klene C., Mester J., Klocker N., Veldkamp M. W., Schumacher U., Willems S., Nikolaev V. O., Meyer C. (2017) Disruption of cardiac cholinergic neurons enhances susceptibility to ventricular arrhythmias. *Nat Commun.* 8: 14155.
- Kalia M. (1981) Brain stem localization of vagal preganglionic neurons. *J Auton Nerv Syst.* 3: 451-481.
- Kalogeris T., Baines C. P., Krenz M., Korthuis R. J. (2012) Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 298: 229-317.
- Kampaktsis P. N., Oikonomou E. K., D Y. C., Cheung J. W. (2017) Efficacy of ganglionated plexi ablation in addition to pulmonary vein isolation for paroxysmal versus persistent atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Interv Card Electrophysiol.* 50: 253-260.
- Kandel E. R. (2000) Nerve Cells and Behavior. In: *Principles of Neural Science*. E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell (Hrg.), McGraw-Hill Professional, New York, 19-36.
- Katritsis G. D., Katritsis D. G. (2014) Cardiac Autonomic Denervation for Ablation of Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 3: 113-115.
- Kazory A., Ross E. A. (2009) Anemia: The Point of Convergence or Divergence for Kidney Disease and Heart Failure? *Journal of the American College of Cardiology.* 53: 639-647.
- Kember G., Armour J. A., Zamir M. (2013) Neural control hierarchy of the heart has not evolved to deal with myocardial ischemia. *Physiol Genomics.* 45: 638-644.
- Kendall M. J., Lynch K. P., Hjalmarson A., Kjekshus J. (1995) Beta-blockers and sudden cardiac death. *Ann Intern Med.* 123: 358-367.
- Killu A. M., Fender E. A., Deshmukh A. J., Munger T. M., Araoz P., Brady P. A., Cha Y. M., Packer D. L., Friedman P. A., Asirvatham S. J., Noseworthy P. A., Mulpuru S. K. (2016) Acute Sinus Node Dysfunction after Atrial Ablation: Incidence, Risk Factors, and Management. *Pacing Clin Electrophysiol.* 39: 1116-1125.
- Kim H., T W. C., Shah S. B., Hsieh A. H. (2015) Effects of proinflammatory cytokines on axonal outgrowth from adult rat lumbar dorsal root ganglia using a novel three-dimensional culture system. *Spine J.* 15: 1823-1831.
- King T. S., Coakley J. B. (1958) The intrinsic nerve cells of the cardiac atria of mammals and man. *J Anat.* 92: 353-376.353.
- Kirchhof P., Calkins H. (2017) Catheter ablation in patients with persistent atrial fibrillation. *Eur Heart J.* 38: 20-26.
- Koblov G. A. (1963) Connections between nerve cells in peripheral autonomic ganglia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 54: 799-802.

- Kommuru H., Jothi S., Bapuji P., Sree D. L., Antony J. (2014) Thoracic Part of Sympathetic Chain and its Branching Pattern Variations in South Indian Cadavers. *J Clin Diagn Res.* 8: Ac09-12.
- Krassioukov A., Biering-Sørensen F., Donovan W., Kennelly M., Kirshblum S., Krogh K., Alexander M. S., Vogel L., Wecht J. (2012) International standards to document remaining autonomic function after spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 35: 202-211.
- Kuntz A. (1945) The autonomic nervous system, Lea & Febiger. Philadelphia.
- Lam N. T., Currie P. D., Lieschke G. J., Rosenthal N. A., Kaye D. M. (2012) Nerve Growth Factor Stimulates Cardiac Regeneration via Cardiomyocyte Proliferation in Experimental Heart Failure. *PLoS One.* 7.
- Langley J. N. (1921) The autonomic nervous system, Heffer. Cambridge, 80.
- Lee M. K., Tuttle J. B., Rebhun L. I., Cleveland D. W., Frankfurter A. (1990) The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 17: 118-132.
- Lee S.-R., Cho Y., Cha M.-J., Choi E.-K., Seo J.-W., Oh S. (2018) Atrial Innervation Patterns of Intrinsic Cardiac Autonomic Nerves. *Journal of Korean medical science.* 33: e253-e253.
- Leger J., Croll R. P., Smith F. M. (1999) Regional distribution and extrinsic innervation of intrinsic cardiac neurons in the guinea pig. *J Comp Neurol.* 407: 303-317.
- Lein P. J., Banker G. A., Higgins D. (1992) Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res.* 69: 191-197.
- Lemasters J. J., Bond J. M., Chacon E., Harper I. S., Kaplan S. H., Ohata H., Trollinger D. R., Herman B., Cascio W. E. (1996) The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *Exs.* 76: 99-114.
- Levy M. N., Ng M., Martin P., Zieske H., Rogoff T. (1966) Sympathetic and Parasympathetic Interactions upon the Left Ventricle of the Dog. *Circulation Research.* 19: 5-10.
- Li C. Y., Li Y. G. (2015) Cardiac Sympathetic Nerve Sprouting and Susceptibility to Ventricular Arrhythmias after Myocardial Infarction.
- Li Y. F., LaCroix C., Freeling J. (2009) Specific subtypes of nicotinic cholinergic receptors involved in sympathetic and parasympathetic cardiovascular responses. *Neurosci Lett.* 462: 20-23.
- 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. *Can J Cardiol.* 31: 767-774.
- Lin Y. K., Lai M. S., Chen Y. C., Cheng C. C., Huang J. H., Chen S. A., Chen Y. J., Lin C. I. (2012) Hypoxia and reoxygenation modulate the arrhythmogenic activity of the pulmonary vein and atrium. *Clin Sci (Lond).* 122: 121-132.
- Lo L. W., Scherlag B. J., Chang H. Y., Lin Y. J., Chen S. A., Po S. S. (2013) Paradoxical long-term proarrhythmic effects after ablating the "head station" ganglionated plexi of the vagal innervation to the heart. *Heart Rhythm.* 10: 751-757.
- Lockhart S. T., Mead J. N., Pisano J. M., Slonimsky J. D., Birren S. J. (2000) Nerve growth factor collaborates with myocyte-derived factors to promote development of presynaptic sites in cultured sympathetic neurons. *J Neurobiol.* 42: 460-476.
- Lockhart S. T., Turrigiano G. G., Birren S. J. (1997) Nerve growth factor modulates synaptic transmission between sympathetic neurons and cardiac myocytes. *J Neurosci.* 17: 9573-9582.
- Lodish H, Berk A, SL Z. (2000) Overview of Neuron Structure and Function. In: *Molecular Cell Biology.* Lodish H, Berk A, Z. SL (Hrg.) 4, W. H. Freeman, New York.
- Loiacono L. A., Shapiro D. S. (2010) Detection of hypoxia at the cellular level. *Crit Care Clin.* 26: 409-421, table of contents.
- Lorez H., Keller F., Ruess G., Otten U. (1989) Nerve growth factor increases in adult rat brain after hypoxic injury. *Neurosci Lett.* 98: 339-344.

- Lu Z., Nie L., He B., Yu L., Salim M., Huang B., Cui B., He W., Wu W., Jiang H. (2013) Increase in vulnerability of atrial fibrillation in an acute intermittent hypoxia model: importance of autonomic imbalance. *Auton Neurosci.* 177: 148-153.
- Luan S., Williams I., Nikolic K., Constandinou T. G. (2014) Neuromodulation: present and emerging methods. *Frontiers in neuroengineering.* 7: 27-27.
- Lucia C. d., Eguchi A., Koch W. J. (2018) New Insights in Cardiac β -Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging. *Frontiers in Pharmacology.* 9.
- Ludwig A., Kretzmer G., Schugerl K. (1992) Determination of a "critical shear stress level" applied to adherent mammalian cells. *Enzyme Microb Technol.* 14: 209-213.
- Luther J. A., Enes J., Birren S. J. (2013) Neurotrophins regulate cholinergic synaptic transmission in cultured rat sympathetic neurons through a p75-dependent mechanism. *J Neurophysiol.* 109: 485-496.
- Lymeropoulos A., Rengo G., Koch W. J. (2013) Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res.* 113: 739-753.
- Mabe A. M., Hoard J. L., Duffourc M. M., Hoover D. B. (2006) Localization of cholinergic innervation and neurturin receptors in adult mouse heart and expression of the neurturin gene. *Cell Tissue Res.* 326: 57-67.
- Macefield V. G. (2011) On the Number of Preganglionic Neurons Driving Human Postganglionic Sympathetic Neurons: A Comparison of Modeling and Empirical Data. *Front Neurosci.* 5.
- MacNee W., Maclay J., McAllister D. (2008) Cardiovascular Injury and Repair in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc.* 5: 824-833.
- Mahida S., Sacher F., Derval N., Berte B., Yamashita S., Hooks D., Denis A., Amraoui S., Hocini M., Haissaguerre M., Jais P. (2015) Science Linking Pulmonary Veins and Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 4: 40-43.
- Maifirino L. B. M., Liberti E. A., Castelucci P., De Souza R. R. (2006) NADPH- Diaphorase positive cardiac neurons in the atria of mice. A morphoquantitative study. *BMC Neurosci.* 7: 10.
- Malcolme-Lawes L., Sandler B. C., Sikkil M. B., Lim P. B., Kanagaratnam P. (2016) Ablation therapy for left atrial autonomic modification. *Autonomic Neuroscience.* 199: 80-87.
- Mao J., Yin X., Zhang Y., Yan Q., Dong J., Ma C., Liu X. (2014) Ablation of epicardial ganglionated plexi increases atrial vulnerability to arrhythmias in dogs. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 7: 711-717.
- Martinelli P. M., Camargos E. R., Azevedo A. A., Chiari E., Morel G., Machado C. R. (2006) Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Auton Neurosci.* 130: 32-40.
- Martinelli P. M., Camargos E. R., Morel G., Tavares C. A., Nagib P. R., Machado C. R. (2002) Rat heart GDNF: effect of chemical sympathectomy. *Histochem Cell Biol.* 118: 337-343.
- Maslyukov P. M., Shilkin V. V., Timmermans J. P. (2006) Immunocytochemical characteristics of neurons in the stellate ganglion of the sympathetic trunk in mice during postnatal ontogenesis. *Neurosci Behav Physiol.* 36: 851-855.
- Matheson C. R., Carnahan J., Urich J. L., Bocangel D., Zhang T. J., Yan Q. (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. *J Neurobiol.* 32: 22-32.
- May J. M., Qu Z. C., Meredith M. E. (2012) Mechanisms of ascorbic acid stimulation of norepinephrine synthesis in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 426: 148-152.
- Mazia D., Schatten G., Sale W. (1975) Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol.* 66: 198-200.
- McAllen R. M., Salo L. M., Paton J. F. R., Pickering A. E. (2011) Processing of central and reflex vagal drives by rat cardiac ganglion neurones: an intracellular analysis. *J Physiol.* 589: 5801-5818.
- McCorry L. K. (2007) Physiology of the Autonomic Nervous System. *Am J Pharm Educ.* 71.
- McDougal D. H., Gamlin P. D. (2015) Autonomic control of the eye. *Compr Physiol.* 5: 439-473.

- McLennan I. S., Hendry I. A. (1978) Parasympathetic neuronal survival induced by factors from muscle. *Neuroscience Letters*. 10: 269-273.
- McWilliams T. G., Howard L., Wyatt S., Davies A. M. (2015) Regulation of Autocrine Signaling in Subsets of Sympathetic Neurons Has Regional Effects on Tissue Innervation. *Cell Rep*.
- Mehra R., Redline S. (2014) Arrhythmia Risk Associated with Sleep Disordered Breathing in Chronic Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep*. 11: 88-97.
- Mehta R., Lopez-Berestein G., Hopfer R., Mills K., Juliano R. L. (1984) Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 770: 230-234.
- Meloni M., Caporali A., Graiani G., Lagrasta C., Katore R., Van Linthout S., Spillmann F., Campesi I., Madeddu P., Quaini F., Emanueli C. (2010) Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circ Res*. 106: 1275-1284.
- 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: 1286-1294.
- Meyers F. H. (1959) A critique of the concept of sympathetic-parasympathetic antagonism. *J Am Geriatr Soc*. 7: 120-127.
- Mias C., Coatrieux C., Denis C., Genet G., Seguelas M. H., Laplace N., Rouzaud-Laborde C., Calise D., Parini A., Cussac D., Pathak A., Senard J. M., Gales C. (2013) Cardiac fibroblasts regulate sympathetic nerve sprouting and neurocardiac synapse stability. *PLoS One*. 8: e79068.
- Michael Panneton W. (2013) The Mammalian Diving Response: An Enigmatic Reflex to Preserve Life? *Physiology*. 28: 284-297.
- Middlekauff H. R., Mark A. L. (1998) The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. *Intern Med*. 37: 112-122.
- Moss E., Cardinal R., Yin Y., Pagé P. (2013) Bilateral atrial ganglionated plexus involvement in atrial responses to left-sided plexus stimulation in canines. *Cardiovascular Research*. 99: 194-202.
- Mujović N., Marinković M., Lenarczyk R., Tilz R., Potpara T. S. (2017) Catheter Ablation of Atrial Fibrillation: An Overview for Clinicians. *Advances in Therapy*. 34: 1897-1917.
- Murata Y., Takahashi K., Yamagata M., Takahashi Y., Shimada Y., Moriya H. (2003) Variations in the number and position of human lumbar sympathetic ganglia and rami communicantes. *Clin Anat*. 16: 108-113.
- Ng G. A. (2016) Neuro-cardiac interaction in malignant ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. *Autonomic Neuroscience*. 199: 66-79.
- O'Driscoll C. M., Gorman A. M. (2005) Hypoxia induces neurite outgrowth in PC12 cells that is mediated through adenosine A2A receptors. *Neuroscience*. 131: 321-329.
- Ogawa S., Barnett J. V., Sen L., Galper J. B., Smith T. W., Marsh J. D. (1992) Direct contact between sympathetic neurons and rat cardiac myocytes in vitro increases expression of functional calcium channels. *J Clin Invest*. 89: 1085-1093.
- Oh Y. S., Jong A. Y., Kim D. T., Li H., Wang C., Zemljic-Harpe A., Ross R. S., Fishbein M. C., Chen P. S., Chen L. S. (2006) Spatial distribution of nerve sprouting after myocardial infarction in mice. *Heart Rhythm*. 3: 728-736.
- Osman F., Kundu S., Tuan J., Jeilan M., Stafford P. J., Ng G. A. (2010) Ganglionic plexus ablation during pulmonary vein isolation--predisposing to ventricular arrhythmias? *Indian pacing and electrophysiology journal*. 10: 104-107.
- Pardini B. J., Patel K. P., Schmid P. G., Lund D. D. (1987) Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat. *J Auton Nerv Syst*. 20: 91-101.
- Park H. W., Shen M. J., Lin S. F., Fishbein M. C., Chen L. S., Chen P. S. (2012) Neural mechanisms of atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol*. 27: 24-28.
- Parker T. L., Kesse W. K., Mohamed A. A., Afework M. (1993) The innervation of the mammalian adrenal gland. *J Anat*. 183: 265-276.

- Partida E., Mironets E., Hou S., Tom V. J. (2016) Cardiovascular dysfunction following spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 11: 189-194.
- Patterson E., Lazzara R., Szabo B., Liu H., Tang D., Li Y. H., Scherlag B. J., Po S. S. (2006) Sodium-calcium exchange initiated by the Ca²⁺ transient: an arrhythmia trigger within pulmonary veins. *J Am Coll Cardiol.* 47: 1196-1206.
- Pauza D. H., Pauziene N., Pakeltyte G., Stropus R. (2002) Comparative quantitative study of the intrinsic cardiac ganglia and neurons in the rat, guinea pig, dog and human as revealed by histochemical staining for acetylcholinesterase. *Ann Anat.* 184: 125-136.
- Pauza D. H., Pauziene N., Tamasauskas K. A., Stropus R. (1997a) Hilum of the heart. *Anat Rec.* 248: 322-324.
- Pauza D. H., Rysevaite K., Saburkina I., Jokubauskas M., Pauziene N. (2012) Morphological pattern of mouse intrinsic cardiac nerve plexus. *The FASEB Journal.* 26: 726.711.
- 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. *Anat Rec.* 259: 353-382.
- Pauza D. H., Skripkiene G., Skripka V., Pauziene N., Stropus R. (1997b) Morphological study of neurons in the nerve plexus on heart base of rats and guinea pigs. *J Auton Nerv Syst.* 62: 1-12.
- Pauziene N., Alaburda P., Rysevaite-Kyguoliene K., Pauza A. G., Inokaitis H., Masaityte A., Rudokaite G., Saburkina I., Plisiene J., Pauza D. H. (2016) Innervation of the rabbit cardiac ventricles. *J Anat.* 228: 26-46.
- Petersson M. E., Yoshida M., Fransén E. A. (2011) Low-frequency summation of synaptically activated TRP channel-mediated depolarizations. *The European journal of neuroscience.* 34: 578-593.
- Piascik M. T., Perez D. M. (2001) Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther.* 298: 403-410.
- Pickard J. M. J., Burke N., Davidson S. M., Yellon D. M. (2017) Intrinsic cardiac ganglia and acetylcholine are important in the mechanism of ischaemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology.* 112: 11.
- Pittman R. N. (2016) Regulation of Tissue Oxygenation, Morgan & Claypool Life Sciences. San Rafael.
- Pokushalov E., Romanov A., Shugayev P., Artyomenko S., Shirokova N., Turov A., Katritsis D. G. (2009) Selective ganglionated plexi ablation for paroxysmal atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 6: 1257-1264.
- Powell S. K., Rivas R. J., Rodriguez-Boulan E., Hatten M. E. (1997) Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J Neurobiol.* 32: 223-236.
- Precht J. C., Powley T. L. (1990) The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. *Anat Embryol (Berl).* 181: 101-115.
- Proskocil B. J., Fryer A. D. (2005) Beta2-agonist and anticholinergic drugs in the treatment of lung disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2: 305-310; discussion 311-302.
- Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., LaMantia A., McNamara J. O., Williams S. M. (2004a) Studying the Nervous Systems of Humans and Other Animals. In: Neuroscience. D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A. LaMantia, J. O. McNamara, S. M. Williams (Hrg.), Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, 1-26.
- Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., LaMantia A., McNamara J. O., Williams S. M. (2004b) The Visceral Motor System. In: Neuroscience. D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A. LaMantia, J. O. McNamara, S. M. Williams (Hrg.), Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, 469-498.

- Rajendran P. S., Challis R. C., Fowlkes C. C., Hanna P., Tompkins J. D., Jordan M. C., Hiyari S., Gabris-Weber B. A., Greenbaum A., Chan K. Y., Deverman B. E., Munzberg H., Ardell J. L., Salama G., Gradinaru V., Shivkumar K. (2018) Identification of peripheral neural circuits that regulate heart rate using optogenetic and viral vector strategies. *bioRxiv*. 456483.
- Rajendran P. S., Nakamura K., Ajijola O. A., Vaseghi M., Armour J. A., Ardell J. L., Shivkumar K. (2016) Myocardial infarction induces structural and functional remodelling of the intrinsic cardiac nervous system. *J Physiol*. 594: 321-341.
- Randall D. C. (2000) Towards an understanding of the function of the intrinsic cardiac ganglia. *J Physiol*. 528: 406.
- Randall D. C., Brown D. R., McGuirt A. S., Thompson G. W., Armour J. A., Ardell J. L. (2003) Interactions within the intrinsic cardiac nervous system contribute to chronotropic regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285: R1066-1075.
- Rello S., Stockert J. C., Moreno V., Gamez A., Pacheco M., Juarranz A., Canete M., Villanueva A. (2005) Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis*. 10: 201-208.
- Remme C. A., Wilde A. A. (2000) KATP channel openers, myocardial ischemia, and arrhythmias--should the electrophysiologist worry? *Cardiovasc Drugs Ther*. 14: 17-22.
- Remme W. J. (2000) Overview of the relationship between ischemia and congestive heart failure. *Clin Cardiol*. 23: 4-8.
- Ribeiro F. F., Neves-Tome R., Assaife-Lopes N., Santos T. E., Silva R. F., Brites D., Ribeiro J. A., Sousa M. M., Sebastiao A. M. (2016) Axonal elongation and dendritic branching is enhanced by adenosine A2A receptors activation in cerebral cortical neurons. *Brain Struct Funct*. 221: 2777-2799.
- Richardson R. J., Grkovic I., Anderson C. R. (2003) Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res*. 314: 337-350.
- Ripplinger C. M., Noujaim S. F., Linz D. (2016) The nervous heart. *Prog Biophys Mol Biol*. 120: 199-209.
- Rocha-Resende C., Roy A., Resende R., Ladeira M. S., Lara A., de Moraes Gomes Eé R., Prado V. F., Gros R., Guatimosim C., Prado M. A. M., Guatimosim S. (2012) Non-neuronal cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. *J Mol Cell Cardiol*. 53: 206-216.
- Role L. W., Fischbach G. D. (1987) Changes in the number of chick ciliary ganglion neuron processes with time in cell culture. *J Cell Biol*. 104: 363-370.
- Ruit K. G., Osborne P. A., Schmidt R. E., Johnson E. M., Jr., Snider W. D. (1990) Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse. *J Neurosci*. 10: 2412-2419.
- Rysevaite K., Saburkina I., Pauziene N., Noujaim S. F., Jalife J., Pauza D. H. (2011a) Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. *Heart Rhythm*. 8: 448-454.
- Rysevaite K., Saburkina I., Pauziene N., Vaitkevicius R., Noujaim S. F., Jalife J., Pauza D. H. (2011b) Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. *Heart Rhythm*. 8: 731-738.
- Saburkina I., Gukauskienė 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. *J Anat*. 224: 583-593.
- Sakmann B. (1992) Nobel Lecture. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Embo j*. 11: 2002-2016.
- Schauerte P., Scherlag B. J., Patterson E., Scherlag M. A., Matsudaria K., Nakagawa H., Lazzara R., Jackman W. M. (2001) Focal atrial fibrillation: experimental evidence for a pathophysiologic role of the autonomic nervous system. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 12: 592-599.

- Scheibner J., Trendelenburg A. U., Hein L., Starke K., Blandizzi C. (2002) $\alpha(2)$ -Adrenoceptors in the enteric nervous system: a study in $\alpha(2A)$ -adrenoceptor-deficient mice. *Br J Pharmacol.* 135: 697-704.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 9: 676-682.
- 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 Med Exp.* 4.
- Scott G. D., Fryer A. D. (2012) Role of Parasympathetic Nerves and Muscarinic Receptors in Allergy and Asthma. *Chem Immunol Allergy.* 98: 48-69.
- Sharp G. A., Shaw G., Weber K. (1982) Immunoelectronmicroscopical localization of the three neurofilament triplet proteins along neurofilaments of cultured dorsal root ganglion neurones. *Exp Cell Res.* 137: 403-413.
- Shen M. J., Zipes D. P. (2014) Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. *Circ Res.* 114: 1004-1021.
- Sheng X., Scherlag B. J., Yu L., Li S., Ali R., Zhang Y., Fu G., Nakagawa H., Jackman W. M., Lazzara R., Po S. S. (2011) Prevention and reversal of atrial fibrillation inducibility and autonomic remodeling by low-level vagosympathetic nerve stimulation. *J Am Coll Cardiol.* 57: 563-571.
- Shih H. T. (1994) Anatomy of the action potential in the heart. *Tex Heart Inst J.* 21: 30-41.
- Shimoda L. A., Polak J. (2011) Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300: C951-967.
- Singh S., Sayers S., Walter J. S., Thomas D., Dieter R. S., Nee L. M., Wurster R. D. (2013) Hypertrophy of neurons within cardiac ganglia in human, canine, and rat heart failure: the potential role of nerve growth factor. *J Am Heart Assoc.* 2: e000210.
- Sinning A., Hubner C. A. (2013) Minireview: pH and synaptic transmission. *FEBS Lett.* 587: 1923-1928.
- Sjoberg J., Kanje M. (1990) The initial period of peripheral nerve regeneration and the importance of the local environment for the conditioning lesion effect. *Brain Res.* 529: 79-84.
- Slavikova J., Kuncova J., Reischig J., Dvorakova M. (2003) Catecholaminergic neurons in the rat intrinsic cardiac nervous system. *Neurochem Res.* 28: 593-598.
- Small D. H., Reed G., Whitefield B., Nurcombe V. (1995) Cholinergic regulation of neurite outgrowth from isolated chick sympathetic neurons in culture. *J Neurosci.* 15: 144-151.
- Souders C. A., Bowers S. L., Baudino T. A. (2009) Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res.* 105: 1164-1176.
- Southerland E. M., Gibbons D. D., Smith S. B., Sipe A., Williams C. A., Beaumont E., Armour J. A., Foreman R. D., Ardell J. L. (2012) Activated cranial cervical cord neurons affect left ventricular infarct size and the potential for sudden cardiac death. *Auton Neurosci.* 169: 34-42.
- Spyer K. M. (1994) Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol.* 474: 1-19.
- Stewart M. (2018) An explanation for sudden death in epilepsy (SUDEP). *J Physiol Sci.* 68: 307-320.
- Stiles J., Jernigan T. L. (2010) The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev.* 20: 327-348.
- Taggart P., Critchley H., van Duijvendoden S., Lambiase P. D. (2016) Significance of neuro-cardiac control mechanisms governed by higher regions of the brain. *Autonomic Neuroscience.* 199: 54-65.
- Tahirovic S., Bradke F. (2009) Neuronal Polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1.
- Tahsili-Fahadan P., Geocadin R. G. (2017) Heart-Brain Axis: Effects of Neurologic Injury on Cardiovascular Function. *Circ Res.* 120: 559-572.

- Takano T., Xu C., Funahashi Y., Namba T., Kaibuchi K. (2015) Neuronal polarization. *Development*. 142: 2088-2093.
- Tanzeglock T., Soos M., Stephanopoulos G., Morbidelli M. (2009) Induction of mammalian cell death by simple shear and extensional flows. *Biotechnol Bioeng*. 104: 360-370.
- Thompson G. W., Collier K., Ardell J. L., Kember G., Armour J. A. (2000) Functional interdependence of neurons in a single canine intrinsic cardiac ganglionated plexus. *J Physiol*. 528: 561-571.
- Thompson G. W., Horackova M., Armour J. A. (1998) Sensitivity of canine intrinsic cardiac neurons to H₂O₂ and hydroxyl radical. *Am J Physiol*. 275: H1434-1440.
- Thygesen K., Alpert J. S., Jaffe A. S., Chaitman B. R., Bax J. J., Morrow D. A., White H. D., Group E. S. D. (2018) Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European Heart Journal*. 40: 237-269.
- Tiwari P., Dwivedi S., Singh M. P., Mishra R., Chandy A. (2013) Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. *Asian Pac J Trop Dis*. 3: 413-420.
- Torretti J. (1982) Sympathetic control of renin release. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 22: 167-192.
- Tracey K. J. (2002) The inflammatory reflex. *Nature*. 420: 853-859.
- Tsuboi M., Furukawa Y., Nakajima K., Kurogouchi F., Chiba S. (2000) Inotropic, chronotropic, and dromotropic effects mediated via parasympathetic ganglia in the dog heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279: H1201-1207.
- Tucker K. L. (2002) Neurotrophins and the control of axonal outgrowth. *Panminerva Med*. 44: 325-333.
- Tumiati L. C., Mickle D. A. G., Weisel R. D., Williams W. G., Li R.-K. (1994) An in vitro model to study myocardial ischemic injury. *Journal of tissue culture methods*. 16: 1-9.
- Turov A., Romanov A., Pokushalov E., Shirokova N., Shugayev P., Artyomenko S., Katritsis D. G. (2010) Ganglionated plexi ablation for longstanding persistent atrial fibrillation. *EP Europace*. 12: 342-346.
- Van Nieuwenhuysse E., Seemann G., Panfilov A. V., Vandersickel N. (2017) Effects of early afterdepolarizations on excitation patterns in an accurate model of the human ventricles. *PLoS one*. 12: e0188867-e0188867.
- Vaseghi M., Shivkumar K. (2008) The Role of the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death. *Prog Cardiovasc Dis*. 50: 404-419.
- Verkerk A. O., Remme C. A., Schumacher C. A., Scicluna B. P., Wolswinkel R., de Jonge B., Bezzina C. R., Veldkamp M. W. (2012) Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ Res*. 111: 333-343.
- Wake E., Brack K. (2016) Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. *Auton Neurosci*. 199: 3-16.
- Waldron N. H., Fudim M., Mathew J. P., Piccini J. P. (2019) Neuromodulation for the Treatment of Heart Rhythm Disorders. *JACC Basic Transl Sci*. 4: 546-562.
- Webber C., Zochodne D. (2010) The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp Neurol*. 223: 51-59.
- Wehrwein E. A., Oler H. S., Barman S. M. (2016) Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol*. 6: 1239-1278.
- Weihe E., Schütz B., Hartschuh W., Anlauf M., Schäfer M. K., Eiden L. E. (2005) Co-expression of Cholinergic and Noradrenergic Phenotypes in Human and Non-Human Autonomic Nervous System. *J Comp Neurol*. 492: 370-379.
- White D. W., Raven P. B. (2014) Autonomic neural control of heart rate during dynamic exercise: revisited. *J Physiol*. 592: 2491-2500.
- White S. M., Constantin P. E., Claycomb W. C. (2004) Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286: H823-829.
- Wiesmann C., de Vos A. M. (2001) Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci*. 58: 748-759.

- Wijffels M. C. E. F., Kirchhof C. J. H. J., Dorland R., Allessie M. A. (1995) Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation. A Study in Awake Chronically Instrumented Goats. 92: 1954-1968.
- Winegrad S., Henrion D., Rappaport L., Samuel J. L. (1999) Self-protection by cardiac myocytes against hypoxia and hyperoxia. *Circ Res.* 85: 690-698.
- Woo A. Y. H., Xiao R. (2012) β -Adrenergic receptor subtype signaling in heart: From bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin.* 33: 335-341.
- Xi X., Randall W. C., Wurster R. D. (1991) Morphology of intracellularly labeled canine intracardiac ganglion cells. *J Comp Neurol.* 314: 396-402.
- Xi Y., Cheng J. (2015) Dysfunction of the autonomic nervous system in atrial fibrillation. *J Thorac Dis.* 7: 193-198.
- Xie M., Burchfield J. S., Hill J. A. (2013) Pathological Ventricular Remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation.* 128: 388-400.
- Xu J., Luc J. G. Y., Phan K. (2016) Atrial fibrillation: review of current treatment strategies. *Journal of thoracic disease.* 8: E886-E900.
- Yamada K. M., Spooner B. S., Wessells N. K. (1970) AXON GROWTH: ROLES OF MICROFILAMENTS AND MICROTUBULES. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 66: 1206-1212.
- Yamakawa K., Rajendran P. S., Takamiya T., Yagishita D., So E. L., Mahajan A., Shivkumar K., Vaseghi M. (2015) Vagal nerve stimulation activates vagal afferent fibers that reduce cardiac efferent parasympathetic effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 309: H1579-1590.
- Yu L., Zhou L., Cao G., Po S. S., Huang B., Zhou X., Wang M., Yuan S., Wang Z., Wang S., Jiang H. (2017) Optogenetic Modulation of Cardiac Sympathetic Nerve Activity to Prevent Ventricular Arrhythmias. *J Am Coll Cardiol.* 70: 2778-2790.
- Yuan A., Rao M. V., Veeranna, Nixon R. A. (2012) Neurofilaments at a glance. *Journal of Cell Science.* 125: 3257-3263.
- Yuan B. X., Ardell J. L., Hopkins D. A., Losier A. M., Armour J. A. (1994) Gross and microscopic anatomy of the canine intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec.* 239: 75-87.
- Zalc B. (2006) The acquisition of myelin: a success story. *Novartis Found Symp.* 276: 15-21; discussion 21-15, 54-17, 275-281.
- 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: 566-575.
- Zhang L., Hou Y., Po S. S. (2015) Obstructive Sleep Apnoea and Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 4: 14-18.
- Zhao M., Sun L., Liu J. J., Wang H., Miao Y., Zang W. J. (2012) Vagal nerve modulation: a promising new therapeutic approach for cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 39: 701-705.
- 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. *Circ Res.* 95: 76-83.
- Ziegler U., Groscurth P. (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 19: 124-128.
- Zipes D. P., Rubart M. (2006) Neural modulation of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Heart Rhythm.* 3: 108-113.
- Zucker I. H., Patel K. P., Schultz H. D. (2012) Neurohumoral Stimulation. *Heart Fail Clin.* 8: 87-99.

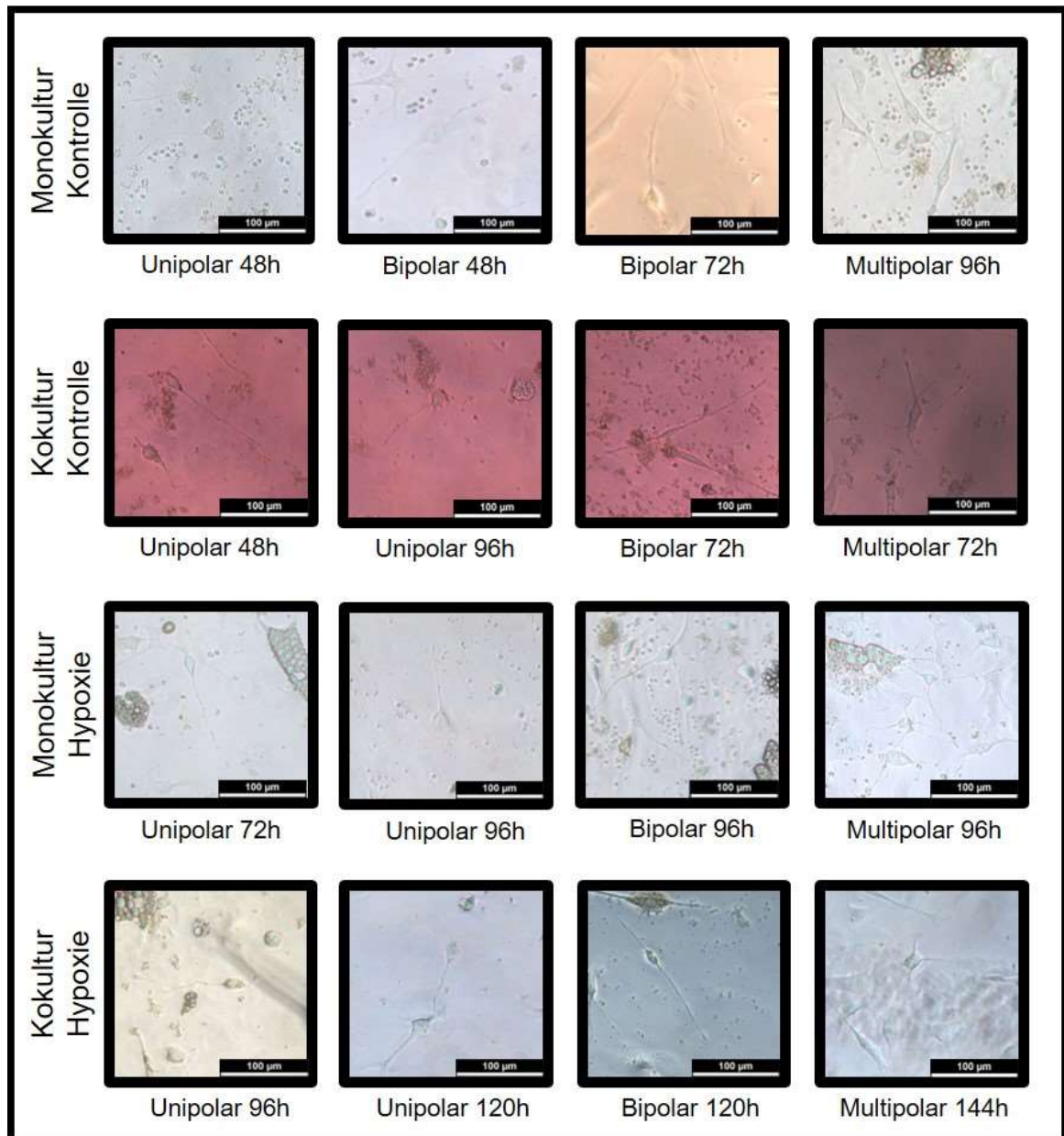
10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Neurons	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Organisation des autonomen Nervensystems	6
Abbildung 4: Neuronale Hierarchie der kardialen Innervation	15
Abbildung 5: Topographische Übersicht über die Ganglienplexus des menschlichen Herzens	17
Abbildung 6: Frisch entnommenes Mäuseherz vor Präparation des epikardialen Fettgewebes.....	35
Abbildung 7: Ablauf der Neurozytenisolation.....	37
Abbildung 8: Ablauf des <i>Preplatings</i>	39
Abbildung 9: Aufbau des Hypoxie-Modells	42
Abbildung 10: Zeitplan der Isolation der ICN.....	46
Abbildung 11: Ganglienlokalisierung im epikardialen Fettgewebe.....	48
Abbildung 12: Mehrfachanschnitt von Ganglien an den Pulmonalvenen.....	49
Abbildung 13 : Intrakardiales Ganglion zwischen linkem Vorhof und Aorta.....	50
Abbildung 14: Abgrenzung der Ganglien zum <i>Nervus vagus</i>	51
Abbildung 15: Immunhistochemische Untersuchung des epikardialen Fettgewebes zwischen Pulmonalvene und <i>Truncus pulmonalis</i>	53
Abbildung 16: Immunhistochemie verschiedener intakardialer Ganglien mit Neurofilament, beta-III-Tubulin und Tyrosinhydroxylase	55
Abbildung 17: ICN-Kultur mit Preplating.....	57
Abbildung 18: ICN-Kultur mit optimierter Isolation ohne <i>Preplating</i>	58
Abbildung 19: Neuritenlängen der verschiedenen Kulturformen im Verlauf	64
Abbildung 20: Neuritenlängen der verschiedenen Kulturformen im direkten Vergleich	68

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Veränderungen der kardialen Parameter durch das autonome Nervensystem.....	11
Tabelle 2: Zusammensetzung der Tris-gepufferten Salzlösung für histologische Färbungen	29
Tabelle 3: Zusammensetzung der für die Antigendemaskierung verwendeten Puffer	31
Tabelle 4: Antikörper und geeignete Puffer zur Antigendemaskierung	31
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der Neurozyten	33
Tabelle 6: Zusammensetzung des HEPES-Puffer bzw. des Calciumchlorid-HEPES für die Präparation des epikardialen Fettgewebes.....	36
Tabelle 7: Zusammensetzung der Lösung zur enzymatischen Zersetzung des präpartierten Fettgewebes.....	36
Tabelle 8: Zusammensetzung des Myozyten-Mediums zur Kultivierung der HL-1-Zellen.....	44
Tabelle 9: Zusammensetzung des Einfriermediums zur Kryokonservierung	45
Tabelle 10: Durchschnittliche Fortsatzlängen der ICN in Monokultur in μm (Mittelwert $\pm$ Standardfehler)	59
Tabelle 11: Durchschnittliche Neuritenlänge der ICN in Kokultur in μm (Mittelwert $\pm$ Standardfehler).....	60
Tabelle 12: Durchschnittliche Neuritenlänge der ICN in Monokultur unter Hypoxie in μm (Mittelwert $\pm$ Standardfehler).....	61
Tabelle 13: Durchschnittliche Neuritenlänge der ICN in Kokultur unter Hypoxie in μm (Mittelwert $\pm$ Standardfehler).	62

12. Anhang



Mikroskopische Aufnahmen der ICN in verschiedenen Kulturen

Dargestellt sind beispielhafte mikroskopische Aufnahmen der ICN in den verschiedenen Kulturgruppen (seitliche Beschriftung) zu verschiedenen Zeitpunkten. Zelltyp und Zeitpunkt der Aufnahme nach Isolation sind jeweils unterhalb der Einzelbilder. Teilweise sind nicht-neuronale Zellen oder Zellreste im Bild sichtbar (z. B. Kokultur Hypoxie, Unipolar 96h). Die Hintergrundfarbe unterscheidet sich durch die verwendeten Belichtungsfilter. Maßstab jeweils 100µm.

12. Anhang

<u>Chemikalie</u>	<u>Bestellnummer</u>	<u>Hersteller</u>
Album Fraktion V (=BSA)	T844	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	1023820	Merck Milipore, Billerica (MA), USA
Claycomb Medium (ohne L-Glutamin)	51800C-500ML	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
D-(+)-Glucose	G8270	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Dikaliumhydrogenphosphat	KMF.08-407.0250	KMF Optichem, Leipzig, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung, ohne Magnesium, ohne Calcium (DPBS)	D8537	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
EDTA-Dinatrium-Salz	E6635	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Eosin G	115935	Merck Milipore, Billerica (MA), USA
Ethanol vergällt (>99,8 %)	K928	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	F2442	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Fibronectin	F1141	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Fluoromount G	0100-01	SouthernBiotech, Birmingham (AL), USA
Gasgemisch (95 % N ₂ , 5 % CO ₂ ; 50 l-Flasche)	-	Linde AG, München, Deutschland
Gelatine	G1393	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Gibco® B27® (50x)	17504044	life technologies, Carlsbad (CA), USA
Gibco® Fungizone®	15290018	life technologies, Carlsbad (CA), USA
Gibco® Glutamax®	35050061	life technologies, Carlsbad (CA), USA
HEPES (>99,5 %)	H3375	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Hoechst 33342	14533	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Isofluran	06497131	Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung Fresenius 0,9% (NaCl)	00809138	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Kaliumchlorid	KMF.08-248.1000	KMF Laborchemie Handels GmbH, Deutschland
Kollagenase Typ II, CLS II	234155	Merck Milipore, Billerica (MA), USA
Laminin (aus EHS-Sarkom)	11243217001	Roche, Basel, Schweiz

12. Anhang

L-Ascorbinsäure	A5960	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	G7513	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
L-Ornithin Monohydrochlorid (>99 %)	O2375	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1058822500	Merck Milipore, Billerica (MA), USA
Mayer's Hämlaunlösung	1.09249.2500	VWR, Radnor (Pennsylvania), USA
Natriumchlorid (>99 %)	433209	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Natriumcitrat (tribasisch, Dihydrat; $\geq 98,0$ %)	C0909	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Natriumhydrogencarbonat (>99 %)	27775.293	VWR, Radnor (Pennsylvania), USA
Norepinephrin-bitratrat	A0937	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Paraffin 52-54 °C	CN49.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (100x)	SV30010	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid	P8638	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Poly-D-Lysin-Hydrobromid	P7886	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Poly-L-Lysin-Lösung (0,01%)	P4707	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Proteinase (aus <i>Aspergillus meleus</i>)	P4032	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Roti®-Histofix 4 %	P087	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	X100	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Trizma® base	T1503	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	T8154	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Trypsin-EDTA-Lösung	T3924	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Vitro-Clud	04-0001	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Xylol (Isomere, >98 %)	CN80.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure Monohydrat ($\geq 99,0\%$)	251275	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
BE400 Inkubator/ Heizschrank	Memmert GmbH und Co.KG, Schwabach, Deutschland
Bechergläser, 50ml, 250ml, 1000ml	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim, Deutschland
BLAUBRAND®-Zählkammer nach Neubauer	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
CO ₂ -Inkubator: Heraeus® BBD 6220	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
Conversion Kit With Dual Flow Meter (HMIC3) (Flussmessgerät)	Billups-Rothenberg Inc., Del Mar (CA,) USA
Economy-Heiz-ThermoMixer Typ MHR 11	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Färbekasten mit Deckel und Färbegestell	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Feuchte Kammer	Eigenproduktion
Nalgene® Freezing Container „Mr. Frosty“	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
Glasflaschen 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim, Deutschland
IKA RET basic (Magnetrührer mit Heizung)	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Kaltlichtquelle: KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz, Deutschland
Leica DFC 450c (Kameraaufsatz)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DM IL LED (Mikroskop)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica RM Biocut 2035 Mikrotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mili-Q, Wassersäuberungssystem	Merck Milipore, Billerica (MA), USA
Mini-Vac power Vakuumpumpe	Axon Lab AG, Baden-Dättwil, Deutschland
Modular Incubator Chamber (MIC-101) (Hypoxiekammer)	Billups-Rothenberg Inc., Del Mar (CA,) USA
Pipetboy comfort	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Pipetten: Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattformschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Foster City (CA), USA
Q-POD, Entnahmeeinheit	Merck Milipore, Billerica (MA), USA
Rotina 380R, Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Sartorius BP 210 D, Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Stereoskopisches Zoom-Mikroskop (SMZ645)	Nikon, Tokio, Japan
Sterilbank: BSB 6A	Gelaire flow laboratories, Sydney, Australien
Sterilbank: Clean Air type CA/RE	Clean Air Supplies, Haan, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia (NY), USA
Wasserbad GFL Typ 1002 (7l max.)	GFL, Burgwedel Deutschland

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Bestellnummer</u>	<u>Hersteller</u>
Adhäsionsobjektträger SuperFrost® / Plus	H867.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
CELLSTAR® Zellkulturflaschen, 250ml/ T75	658970	greiner bio-one, Monroe (NC), USA
CELLSTAR® Zellkulturschale, 100x20mm	P7612-360EA	greiner bio-one, Monroe (NC), USA
CELLSTAR® 6/12/24 Well-Mikrotiterplatten mit Deckel	657160 665180 662160	greiner bio-one, Monroe (NC), USA
CELLSTAR® Zentrifugenröhrchen 15 & 50ml	227261 188271	greiner bio-one, Monroe (NC), USA
Costar Stripette (1/2/5/10/25ml)	CLS4011, CLS4021, CLS4051, CLS4101, CLS4251	Corning Incorporated, Corning (NY), USA
Deckgläser (24x60mm)	H878.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten	EA70.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Entsorgungsbeutel Sekuroka®	L373.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Safe Lock Tubes/ Mikroreaktionsgefäße(0,5ml, 1,5ml, 2ml)	0030121023, 0030120086, 0030120094	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ES Kompressen	4078217	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Kanülen (27G /25G) (BD Eclipse Needle)	305770, 305760	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Mikrotomklingen Feather® Microtome Blade S22	-	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Nunc™ Kryotubes (Kryoröhrchen)	375418	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas	747720	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter (10/200/1000µl)	S1111-3000, S1111-0000, S1111-6000	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Spritzen: Braun Injekt® (10 /20ml)	4606108V, 4606205V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzen: Omnifix®-F (1ml)	9161406V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzenfilter (0,2 µm)	514-0064	VWR, Radnor (Pennsylvania), USA
Zellsieb, 100 µm Porengröße	734-0004	VWR, Radnor (Pennsylvania), USA

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
IBM SPSS Statistics	IBM, ARmonk (NY), USA
Image J	National Institutes of Health, USA, 2004
Leica Application Suite V3.7	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel/ Word	Microsoft Corporation, Redmond (WA), USA

Primäre Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>	<u>Verdünnung</u>
Beta-III-Tubulin	Mouse	Dianova	T-1315	1:50
Neurofilament H	Chicken	Merck Milipore	AB5539	1:600
Smooth Muscle Actin	Rabbit	Abcam	ab5694	1:100
Tyrosine Hydroxylase	Rabbit	Merck Milipore	AB152	1:100

Sekundäre Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>	<u>Verdünnung</u>
Goat anti-Chicken	Alexa Fluor® 488	Life technologies	A-11039	1:400
Goat anti-Mouse	Alexa Fluor® 594	Life technologies	A-11005	1:400
Goat anti-Rabbit	Alexa Fluor® 568	Life technologies	A-11011	1:400
Goat anti-Rabbit	Alexa Fluor® 488	Life technologies	A-11008	1:400

13. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Kardiologie am Universitären Herzzentrum Hamburg, dafür, dass ich diese Dissertation an seiner Klinik durchführen durfte.

Meinen größten Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christian Meyer, stellvertretender Klinikdirektor, Schwerpunkt Rhythmologie der Klinik und Poliklinik für Kardiologie am Universitären Herzzentrum Hamburg, und Herrn Dr. med. Christian Eickholt aussprechen, die mich über den gesamten Zeitraum der Arbeit hervorragend betreut und in größtmöglicher Weise unterstützt sowie dem selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten nähergebracht haben.

Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm, Direktor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf danken. Er ermöglichte mir den Beginn der vorliegenden Arbeit sowie der zugehörigen Experimente an seiner Klinik.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Labors der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie bei Fr. Dr. rer. nat. Katharina M. Scherschel aus der Klinik für Kardiologie mit Schwerpunkt Elektrophysiologie am Universitären Herzzentrum Hamburg für die freundliche Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden für die gegenseitige Motivation, die zielstrebige Arbeitsatmosphäre und das hervorragende Teamwork seit Beginn dieser Arbeit.

Ich danke meinen Eltern, meinem Bruder sowie dem Rest meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung und das zu jeder Zeit aufgebrachte Verständnis sowie den bedingungslosen Rückhalt.

14. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutztechnischen Gründen entfernt

15. Veröffentlichungen

Kongressbeiträge:

Jonas F, Eickholt C, Unland D, Bönner F, Pohl J, Lukosz M, Shin D-I, Veldkamp M W, Schrader J, Klöcker N, Rassaf T, Kelm M, Meyer C: **Morphometric Characterization of Intracardiac Neurons Modulating Atrial Cardiac Electrophysiology**, 80. Jahrestagung der DGK 2014; 23. - 26.4.2014, Mannheim

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: