

Aus der Klinik für
Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Elektrophysiologische Charakteristika und
arrhythmogenes *remodeling* im Mausmodell nach
Myokardischämie und Reperfusion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Benedikt Bartsch

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Hisaki Makimoto

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zusammenfassung

Ventrikuläre Arrhythmien (VA) als Folge einer kardialen Ischämie stellen eine der Haupttodesursachen weltweit dar und sind daher eine große Herausforderung im klinischen Alltag. Aufgrund ähnlicher kardiovaskulärer Eigenschaften ist die Maus vor dem Hintergrund der Fortschritte in der Gentechnik in den Fokus der kardiovaskulären Forschung geraten. Die Bestimmung der ventrikulären Vulnerabilität in der elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) stellt sich in Mäusen als Herausforderung dar und bisherige an Menschen etablierte programmierte elektrische Stimulationsprotokolle (PES) zeigten sich nicht sensitiv genug in der Induktion VA in Mäusen.

Kürzlich wurde ein modifiziertes Stimulationsprotokoll (Miniburst (MB)) vorgestellt, welches nun im myocardialen Ischämie-Reperfusions-Modell (IR) bei Wildtyp-Mäusen getestet werden sollte. Folgendes sollte dabei untersucht werden: Erstens, die ventrikuläre Vulnerabilität im Mausmodell 7d *post* IR, zweitens die Effektivität des neuen Stimulationsprotokolls im Vergleich zum herkömmlichen am Menschen etablierten PES.

Nach Thoraxeröffnung betrug die Ischämiezeit der IR-Gruppe (n=7) 45 Minuten, in der *Sham*-Gruppe (n=8) fand nur die Thoraxeröffnung statt. 7d postoperativ erfolgte in leichter Isofluran-Narkose eine *in vivo* elektrophysiologische Untersuchung (EPU). Vor der Operation sowie zum Zeitpunkt 1d, 2d und 7d fand eine transthorakale Echokardiographie statt. Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte planimetrisch nach Gomoris-Trichrome-Färbung *ex vivo* nach der EPU.

In der IR-Gruppe zeigte sich eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion. In der histologischen Untersuchung zeigte sich eine durchschnittliche Infarktgröße von $32 \pm 1.5\%$ (SEM) (n=7) des linken Ventrikels 7d nach IR-Operation.

In der IR-Gruppe zeigten sich mehr induzierte VA als in der *Sham*-Gruppe. Es zeigten sich mehr *premature ventricular complex* (PVC) und ventrikuläre Tachykardien (VT) (< 1 s) in der IR- als in der *Sham*-Gruppe. In der IR-Gruppe zeigte sich nach Gabe von Isoproterenol keine Erhöhung der ventrikulären Vulnerabilität und keine Herzfrequenzänderungen.

Die Inzidenz von VT war mittels MB-Protokoll höher als im PES-Protokoll. Das MB-Stimulationsprotokoll, insbesondere ab vier Extrastimuli, induzierte mehr VA als das PES-Protokoll in IR-Tieren.

Insgesamt zeigte sich anhand der Daten eine gesteigerte ventrikuläre Vulnerabilität der IR-Tiere 7d postoperativ. Das MB-Protokoll zeigte sich besser geeignet und effektiver die ventrikuläre Vulnerabilität in diesem Mausmodell zu untersuchen als die bisherigen Protokolle. Das hier angewandte Stimulationsprotokoll kann in Zukunft dazu dienen, die ventrikuläre Vulnerabilität von transgenen Mäusen nach IR-Operation zu untersuchen.

Summary (Englisch)

Ventricular arrhythmia (VA) due to cardiac ischemia is one of the major causes of death worldwide, thus treatment remains a challenge for physicians. Having grossly similar cardiac properties as humans and given the rise of genetic engineering mice have become a focus of cardiovascular research. Assessing ventricular vulnerability during electrophysiological studies (EPS) in mice remains non-unified and human based programmed electrical stimulation (PES) protocols seems to lack sensitivity for induction of VA in mice.

We transferred a recently elaborated modified stimulation protocol (Miniburst (MB)) into an unrestrained mice model of myocardial ischemia and reperfusion (IR). The aim of this study was to investigate: 1) ventricular vulnerability of mice in 7d after IR, 2) efficacy of our stimulation protocol as compared to conventional approach adopted from human PES protocol.

Open chest 45 min myocardial IR (n=7) or sham operation (n=8) was performed. At 7d after operation mildly isoflurane sedated mice underwent in vivo EPS to test ventricular vulnerability. Transthoracic echocardiography was conducted at baseline, 1d, 2d and 7d after operation. Myocardial infarction size was calculated by planimetry after gomoris-trichrome stainings *ex vivo* after EPS.

Left ventricular function was reduced after IR compared to sham operation. Histologic analysis showed myocardial infarction size making up $32 \pm 1.5\%$ (SEM) (n=7) of the myocardial tissue 7d after IR-operation. IR mice showed significantly higher arrhythmia scores of induced ventricular arrhythmias compared to sham operated mice. The inducibility of premature ventricular complex and ventricular tachycardia (< 1 s) was significantly enhanced in IR mice as compared to sham operated mice. In IR mice, heart rate response under isoprenaline was blunted and Isoprenaline did not aggravate ventricular vulnerability during EPS. Incidence of VT induction among IR mice was considerably higher with MB protocol as compared to conventional PES protocol. MB protocol, particularly coupling of at least four extrastimuli, enhanced ventricular arrhythmia inducibility as compared to conventional PES protocol in IR mice.

In conclusion, our data demonstrated that ventricular vulnerability during EPS is enhanced 7d after myocardial IR in mice. The MB protocol is more feasible and effective for the assessment of ventricular vulnerability in this mouse model as compared to the conventional stimulation protocol. This presented modified approach for programmed electrical stimulation may be useful to investigate ventricular arrhythmogenicity in transgenic mice with IR.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikulärer Knoten
BL	<i>baseline</i>
bpm	<i>beats per minute</i>
CRT	<i>cardiac resynchronization therapy</i>
CS	Clasen-Score
d	Tag
DAD	<i>delayed afterdepolarization</i>
DALY	<i>disability-adjusted life years</i>
EAD	<i>early afterdepolarization</i>
EDV	enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	elektrophysiologische Untersuchung
ESV	endsystolisches Volumen
FS	<i>fractional shortening</i>
g	Gramm
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated</i>
HF	Herzfrequenz
Hz	Hertz
HZV	Herzeitvolumen
i.p	<i>intraperitoneal</i>
I _{Ca-L}	<i>L-type calcium current</i>
ICD	<i>implantable cardioverter-defibrillator</i>

I_f <i>funny current</i>
I_{k1} <i>potassium inward rectifier current</i>
I_{Kr} <i>I_{Kr} potassium current</i>
I_{Ks} <i>I_{Ks} potassium current</i>
IR Ischämie-Reperfusion
I_{ti} <i>oscillatory inward current</i>
ITN Intubationsnarkose
LAD <i>left anterior descending artery</i>
LANUV Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LV linksventrikulär
LVEDD <i>left ventricular enddiastolic diameter</i>
LVESD <i>left ventricular endsystolic diameter</i>
M₂ muskarinischer Acetylcholinrezeptor 2
MB Miniburst
mbar Millibar
MHz Megahertz
ms Millisekunde
mV Millivolt
n <i>number</i>
N₂O Distickstoffmonoxid/Lachgas
NaCl Natrium-Chlorid
NCX Natrium-Calcium-Austauscher
nsVT nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie
O₂ Sauerstoff
ORL-1 Nozizeptinrezeptor
PBS phosphatgepufferte Salzlösung
PES programmierte elektrische Stimulation

PVC	<i>premature ventricular complex</i>
SCD	<i>sudden cardiac death</i>
SE	Stimulationseinheit
SEM	einfacher Standardfehler
SSA	<i>steady state activation</i>
SSI	<i>steady state inactivation</i>
SV	Schlagvolumen
sVT	anhaltende ventrikuläre Tachykardie
vdW	van der Werf-Score
VRP	ventrikuläre Refraktärperiode
VT	ventrikuläre Tachykardie
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZETT	..	zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Elektrophysiologie des Herzens.....	1
1.1.1	Das Herzaktionspotential.....	1
1.1.2	Physiologie des menschlichen Elektrokardiogramms.....	3
1.1.3	Grundlagen ventrikulärer Arrhythmien.....	4
1.1.4	Einflussfaktoren der ventrikulären Vulnerabilität.....	9
1.1.5	Prävention des plötzlichen Herztodes (SCD).....	11
1.2	Diagnostik bei Arrhythmien.....	12
1.3	Das Mausmodell zur Untersuchung der Arrhythmogenität.....	13
1.3.1	Besonderheiten des murinen Herzaktionspotentials.....	13
1.3.2	Besonderheiten des murinen EKG.....	13
1.3.3	Myokardinfarktmodelle der Maus.....	15
1.3.4	Elektrophysiologische Untersuchungen der Maus.....	15
1.4	Ziele der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Tierhaltung und Zucht.....	18
2.2	Versuchsplanung.....	19
2.3	Transthorakale echokardiographische Untersuchung.....	20
2.3.1	Material.....	20
2.3.2	Arbeitsplatz.....	22
2.3.3	Vorgehen.....	22
2.3.4	Analyse.....	22
2.4	Ischämie-Reperfusion-Operation.....	23
2.4.1	Material.....	23
2.4.2	Vorgehen.....	25
2.5	<i>In vivo</i> Elektrophysiologische Untersuchung.....	26
2.5.1	Material.....	26
2.5.2	Versuchsaufbau.....	28
2.5.3	Präparation der Maus.....	31
2.5.4	Ventrikuläres Stimulationsprotokoll.....	32
2.5.5	Analyse.....	34
2.6	Histologische Infarktplanimetrie.....	36
2.6.1	Material.....	36
2.6.2	Vorgehen.....	38
2.7	Statistische Analyse.....	40

3	Ergebnisse.....	41
3.1	Tierhaltung und Vitalparameter	41
3.2	Transthorakale Echokardiographie.....	41
3.3	Planimetrische Infarktgrößenbestimmung	44
3.4	Elektrophysiologische Charakterisierung.....	44
3.4.1	Oberflächen-EKG	44
3.4.2	Bestimmung der ventrikulären Reizschwelle und Refraktärperiode.....	45
3.4.3	Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mittels Isoproterenol	47
3.5	Ventrikuläre Vulnerabilität in der elektrophysiologischen Untersuchung	49
3.5.1	Untersuchungsbedingungen	49
3.5.2	Quantitative Arrhythmieanalyse	49
3.5.3	Qualitative Arrhythmieanalyse der ventrikulären Tachykardien (VT)	51
3.5.4	Vergleich der ventrikulären Stimulationsprotokolle.....	53
3.5.5	Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mittels Isoproterenol	57
3.6	Korrelation funktionell-struktureller Parameter und der Arrhythmogenität.....	59
3.6.1	Korrelation zwischen Ejektionsfraktion und ventrikulärer Arrhythmien	59
3.6.2	Korrelationsanalysen der Infarktgröße	59
4	Diskussion	61
4.1	Tierhaltung und Vitalparameter	61
4.2	Transthorakale Echokardiographie.....	61
4.3	Planimetrische Infarktgrößenbestimmung	62
4.4	Elektrophysiologische Charakterisierung.....	63
4.4.1	Oberflächen-EKG	63
4.4.2	Bestimmung der ventrikulären Reizschwelle und Refraktärperiode.....	64
4.4.3	Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mittels Isoproterenol	64
4.5	Ventrikuläre Vulnerabilität in der elektrophysiologischen Untersuchung	65
4.5.1	Gruppencharakteristika.....	65
4.5.2	Quantitative Arrhythmieanalyse	66
4.5.3	Qualitative Arrhythmieanalyse der ventrikulären Tachykardien (VT)	67
4.5.4	Vergleich der ventrikulären Stimulationsprotokolle.....	68
4.5.5	Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mittels Isoproterenol	69
4.6	Korrelation funktionell-struktureller Parameter und der Arrhythmogenität.....	70
4.6.1	Korrelation zwischen Ejektionsfraktion und ventrikulärer Arrhythmien	70
4.6.2	Korrelationsanalysen der Infarktgröße	70
4.7	Limitationen	71
5	Abbildungsverzeichnis	73
6	Tabellenverzeichnis	74

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die Erkrankungsgruppe mit der höchsten Mortalität dar. Weltweit starben im Jahr 2016 rund 17 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, davon verstarben etwa 4 Millionen am plötzlichem Herztod (SCD) (World Health Organization, 2017, Srinivasan, 2018). In Deutschland starben 350.000 Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, davon starben ca. 100.000 am SCD (Deneke et al., 2019).

Bei Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen kann die Lebenserwartung und Prognose mittels DALY (*disability-adjusted life years*) angegeben werden, welche bei Männern die größte und bei Frauen die zweitgrößte Erkrankungsgruppe darstellen (World Health Organization, 2018).

Gemäß WHO ist ein DALY einer Krankheit definiert als ein Jahr, das durch vorzeitiges Versterben durch die Krankheit oder durch dauerhaftes, symptomatisches Erkranken gekennzeichnet ist (DALY=durchschnittliche Lebenserwartung der Normalbevölkerung - durchschnittliche Lebenserwartung Erkrankter + Jahre, in denen man erkrankt ist) (World Health Organization, 2018).

In der Klinik stellt SCD nach wie vor ein relevantes Problem in Bezug auf Risikostratifizierung und Therapiemöglichkeiten dar (Priori et al., 2015). Die häufigsten zugrundeliegenden Erkrankungen des SCD sind koronare Herzerkrankungen, Kardiomyopathien und angeborene Ionopathien (Chugh et al., 2008, Priori et al., 2015). Die gemeinsame Endstrecke dieser Entitäten stellen ventrikuläre Arrhythmien (VA) dar. In Studien konnten in etwa 40% der Patienten, die am SCD verstorben waren, initial ventrikuläre Arrhythmien (Kammerflimmern, ventrikuläre Tachykardien (VT)) im EKG abgeleitet werden, gefolgt von pulsloser elektrischer Aktivität und Asystolie (Al-Khatib et al., 2018, Cobb et al., 2002). Zu den bislang etablierten Therapien gehören Antiarrhythmika, Katheterablation und ICD-Implantation (Priori et al., 2015). Für eine gezielte individuelle Therapie ist ein Verständnis für die zellulären elektrophysiologischen Veränderungen notwendig.

1.1 Elektrophysiologie des Herzens

1.1.1 Das Herzaktionspotential

Die Herzerregung entsteht im Sinusknoten im *Sulcus terminalis* auf der Dorsalseite des rechten Herzvorhofs durch HCN-Kanäle (I_f) (Aumüller G. et al., 2010, Pape H-C. et al., 2014). Anschließend breitet sich die Erregung im Vorhof aus und erreicht den AV-Knoten,

der in der Basis des Vorhofseptums vor der Einmündung des Sinus coronarius liegt (Aumüller G. et al., 2010, Pape H-C. et al., 2014). Der AV-Knoten stellt die einzige physiologische, elektrische Verbindung zwischen Vorhof und Ventrikel dar (Pape H-C. et al., 2014). Neben einer Filterfunktion von Erregungen des Vorhofs durch eine herabgesetzte Erregungsleitungsgeschwindigkeit, erfolgt im AV-Knoten die Überleitung der Erregung in den Ventrikel über das His-Bündel (Pape H-C. et al., 2014). Anschließend folgt die Ausbreitung im Ventrikel über Kammerschenkel und Purkinje-Fasern und der Übergang in das Arbeitsmyokard mittels *gap junctions* (Pape H-C. et al., 2014).

Der Herzmuskel stellt ein funktionelles Synzytium dar. Die einzelnen Myokardzellen sind über *gap junctions* verbunden, sodass Erregungsänderungen von Nachbarzellen unmittelbar übertragen werden.

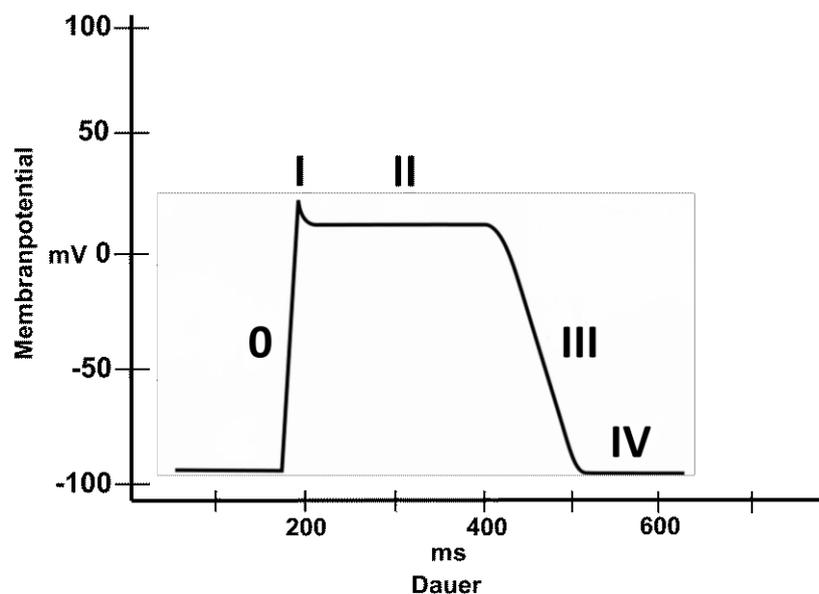


Abb. 1 Ablauf des Herzaktionspotentials

Das Ruhemembranpotential liegt bei -90 mV. Überschreitet eine Erregung den Schwellenwert kommt es zur Öffnung spannungsaktivierter Natrium-Kanäle (I) und einer Depolarisation der Zelle mit einem Overshoot des Aktionspotentials auf 30 mV. Im Folgenden (II) gleichen sich spannungsabhängige L-Typ Calcium-Kanäle und verschiedene Kalium-Kanäle (I_{Kr} , I_{Ks}) an, sodass eine Plateauphase entsteht. Nach Schluss der Calcium-Kanäle (III) überwiegt der Kalium-Ausstrom und es kommt zur Repolarisation und zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials (IV) mittels I_{K1} . Eigene Abbildung

Das Ruhepotential des ventrikulären Arbeitsmyokards liegt bei -90 mV und damit nahe am Kaliumgleichgewichtspotential, das Ruhepotential wird durch Ionenfluss über den Kalium-Einwärtsgleichrichter (I_{K1}) vermittelt und stabilisiert (Lopatin and Nichols, 2001).

Kommt es über das Erregungsleitungssystem, vermittelt durch *gap junctions*, zu einer Depolarisation der Zelle auf -65 mV, erhöht dies die Offenwahrscheinlichkeit von schnellen Natriumkanälen und es strömt Natrium in die Zelle ein (I_{Na}), was zu einem *overshoot* des Membranpotentials auf $+30$ mV führt.

Bei $+30$ mV sinkt sowohl die Offenwahrscheinlichkeit der schnellen Natrium-Kanäle, als auch die des Kalium-Einwärtsgleichrichters (I_{K1}). Ab -30 mV steigt ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit von L-Typ Calcium-Kanälen. Diese führen zu einem langsamen, langen Calcium-Einstrom, der eine Plateauphase des Membranpotentials bei 0 mV bedingt. Während der Plateauphase ist die Herzmuskelzelle absolut refraktär, sie kann nicht durch weitere Stimuli erregt werden, dadurch ist gewährleistet, dass es zu einem für die Herzfunktion wichtigen Wechsel zwischen Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels kommen kann.

Mit zunehmender Deaktivierung der L-Typ Calcium-Kanäle und steigendem Ionenfluss durch die Auswärtsgleichrichter (I_{Kr} und I_{Ks}) kommt es, durch einen Kaliumausstrom aus der Zelle, zu einer Repolarisation, welche ab -65 mV durch I_{K1} unterstützt wird, sodass sich wieder das Ruhemembranpotential einstellt (Cheng and Kodama, 2004).

1.1.2 Physiologie des menschlichen Elektrokardiogramms

Die physiologische menschliche Elektrokardiogramm (EKG) Linie besteht aus folgenden durch Potentialänderungen entstehenden Einheiten: P-Welle, als Zeichen der Erregungsausbreitung im Vorhof, QRS-Komplex, als Erregungsausbreitung im Kammermyokard und die T-Welle, als Zeichen der Erregungsrückbildung in den Kammern (Durrer et al., 1970).

Ebenfalls von klinischer Bedeutung ist das PR-Intervall, also die Zeit zwischen Beginn der P-Welle und dem Maximum (R-Zacke) des QRS-Komplexes, da dies neben der Vorhoferregung zusätzlich Aufschluss über die atrioventrikuläre Überleitung über den AV-Knoten, His-Bündel, Tawara-Schenkel und Purkinje-Fasern gibt. Ebenso wichtig zur Beurteilung des EKG ist die ST-Strecke, als Zeitpunkt zwischen dem Ende des QRS-Komplexes und dem Beginn der T-Welle. Während dieser Zeit ist die gesamte Kammer erregt. Weitere Beurteilungskriterien sind das QT- bzw. JT-Intervall zur Beurteilung der Erregungsausbreitung und Erregungsrückbildung (QT) bzw. nur der Erregungsrückbildung (JT).

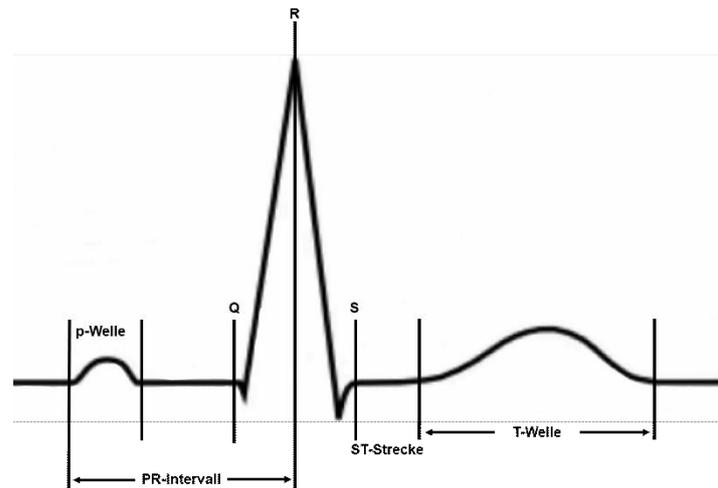


Abb. 2 EKG des Menschen

Das EKG des Menschen besteht aus Vorhofdepolarisation (P-Welle), Ventrikeldepolarisation (QRS-Komplex) und Ventrikelrepolarisation (T-Welle). Die jeweiligen Normwerte betragen für die P-Welle 200ms, für das PR-Intervall 120-200ms, für den QRS-Komplex <100ms, für die QTc <450ms bei einer Herzfrequenz von 60 Schlägen/Minute. Eigene Abbildung

1.1.3 Grundlagen ventrikulärer Arrhythmien

Kardiale Arrhythmien können verschiedenster Ursache sein, neben Kardiomyopathien, insbesondere die ischämische Kardiomyopathie, können Elektrolytverschiebungen, Stoffwechselstörungen und Medikamente Arrhythmien induzieren (Fisch, 1973, Haverkamp et al., 2000, Von Mering et al., 2002).

Bei kardialen Arrhythmien ist generell zwischen supraventrikulären und VA einerseits, sowie tachykarden und bradykarden Arrhythmien andererseits zu unterscheiden. Aufgrund der hohen Bedeutung von VT und Kammerflimmern als Auslöser des SCD wurde in dieser Untersuchung der Fokus auf VA gelegt (Deneke et al., 2019).

Nicht alle Arrhythmien werden bemerkt, so können auch gesunde Menschen (physiologische Sinusarrhythmie) gelegentlich Arrhythmien haben (Hirsch and Bishop, 1981). Ebenso können bspw. *premature ventricular complex* (PVC) oder Vorhofflimmern vom Patienten unbemerkt bleiben (Priori et al., 2015).

VA lassen sich klinisch in PVC, VT, wobei dort nicht anhaltende (nsVT) von anhaltenden VT (sVT) zu unterscheiden sind, und Kammerflimmern einteilen. Anhand der Morphologie kann man VT ebenfalls nach monomorph, pleomorph und polymorph einteilen.

Schon länger ist bekannt, dass VT eine entscheidende prognostische Bedeutung für das Überleben nach einem Myokardinfarkt haben (Lawrie et al., 1968). Hierbei ist zu beachten, dass nicht jede VA als prognostisch gleich schlecht zu bewerten ist. So haben Patienten

mit VT ein deutlich erhöhtes Risiko am SCD zu versterben als Patienten, die nur PVC aufweisen (Zipes and Wellens, 1998). Einen proarrhythmogenen prognostischen Einfluss der nsVT konnte in prospektiven Studien ebenfalls gezeigt werden (Makimoto et al., 2020).

Beim Entstehungsmechanismus von Arrhythmien sind abnorme Impulsformationen und kreisende Erregungen zu unterscheiden (Antzelevitch and Burashnikov, 2011). Die abnormen Impulsformationen werden dabei nach getriggelter Aktivität und Automatizität unterschieden (Antzelevitch and Burashnikov, 2011, Qu and Weiss, 2015). Für die Arrhythmieinduktion spielen veränderte Abläufe von Depolarisation und Repolarisation eine entscheidende Rolle (Alvarez et al., 2019, Qu and Weiss, 2015).

Unter normaler oder abnormaler Depolarisation versteht man die plötzliche Verschiebung des Membranpotentials vom negativem Ruhemembranpotential hin zu einem positiven Membranpotential (s. Abb 1) aufgrund einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der Natrium-Kanäle (I_{Na}). Die Repolarisation ist definiert als Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials nach erfolgter Depolarisation. Dies geschieht durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit bestimmter Kalium-Kanäle (s. Abb1) (Lopatin and Nichols, 2001). Störungen dieser aufeinanderfolgenden Phasen können das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien bedingen (Alvarez et al., 2019). Hierbei sind insbesondere ischämische Schädigungen, Elektrolytverschiebungen und Ionopathien als mögliche Auslöser zu nennen (Fisch, 1973, Haverkamp et al., 2000, Von Mering et al., 2002). In der Folge kann es zu Überleitungsverzögerungen in der Erregungsausbreitung kommen oder zu einer funktionell veränderten Expression von Ionenkanälen, die die De- und Repolarisationseigenschaften der Zellen beeinflussen.

1.1.3.1 Getriggerte Aktivität

Arrhythmien durch getriggerte Aktivität beschreibt die Arrhythmieinduktion durch sog. *afterdepolarization* im Verlauf der zellulären Repolarisation (Wit and Boyden, 2007). *Afterdepolarizations* lassen sich dabei in *early afterdepolarization* (EAD) und *delayed afterdepolarization* (DAD) aufteilen (s. Abb. 3), welche im Folgenden erläutert werden (Qu and Weiss, 2015).

EAD entstehen in der Phase II oder III des Myokardaktionspotentials und werden über I_{Ca-L} Ionenströme vermittelt (Weiss et al., 2010). Beim I_{Ca-L} liegen die Phasen der *steady state activation* (SSA) und *steady state inactivation* (SSI) zwischen -30 – 0 mV, dadurch kommt es bei beginnender Repolarisation zu einer quantitativen Annäherung der Ionenströme zwischen L-Typ Calciumkanälen und den verzögerten Auswärtsgleichrichtern (I_{Kr} I_{Ks}) (Weiss et al., 2010). Liegt der Calcium-Einstrom dabei über dem Kaliumausstrom, kommt es zu einer erneuten Depolarisation der Zelle, was bei ausreichender Stärke und Länge zur

Arrhythmieinduktion führen kann (Weiss et al., 2010). Grundvoraussetzung hierfür ist, dass sich die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle (I_{Na}) (s. Abb 1) in der relativen Refraktärperiode befinden und damit ihre Offenwahrscheinlichkeit bei Überschreiten der Reizschwelle wieder erhöhen können. Dies kann durch einen *Na/Ca-Exchanger* (NCX) verstärkt werden, welcher jeweils ein intrazelluläres Calcium-Ion gegen drei extrazelluläre Natrium-Ionen tauscht und so eine mögliche Depolarisation verstärken kann (Weiss et al., 2010).

DAD entstehen nach Beendigung des kardialen Aktionspotentials in Phase IV (Cranefield, 1977). Ihre Entstehung wird begünstigt durch einen erhöhten intrazellulären Calcium-Spiegel und erhöhten Herzfrequenzen (HF) (Fozzard, 1992).

Nach aktueller Studienlage ist der depolarisierende I_{ij} der DAD auslösende Ionenstrom. Dieser setzt sich aus drei verschiedenen Komponenten zusammen: einem nicht selektiven Kationenkanal, Na/Ca Austausch (NCX) und einem durch Calcium aktivierten Chlorid-Ionenkanal (Han and Ferrier, 1992, Karagueuzian and Katzung, 1982, Kass et al., 1978, Lederer and Tsien, 1976).

Es konnte ebenso gezeigt werden, dass DAD und EAD in ihrer Amplitude durch Katecholaminausschüttung verstärkt werden, sodass sie leichter Arrhythmien auslösen können (Cranefield, 1977). Dies scheint mit einer Calciumakkumulation in der Zelle zusammenzuhängen (Clusin et al., 1983).

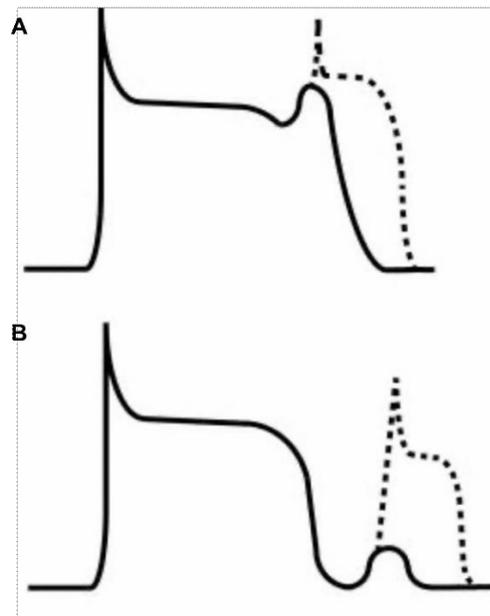


Abb. 3 Early und delayed afterdepolarization

In den Phasen II und III des Myokardaktionspotentials kann es in Folge eines gesteigerten Calciumeinstroms (I_{Ca-L}) über dem Kaliumausstrom (I_{Kr} , I_{Ks}) zu **A** early afterdepolarization oder **B** delayed afterdepolarization in Phase IV kommen. In gestrichelten Linien angedeutet sind jeweils mögliche Aktionspotentiale, falls early bzw. delayed afterdepolarization die ventrikuläre Reizschwelle überschreiten.

Adaptiert mit Genehmigung der BMJ Publishing Group Limited nach Martin et al., 2012 (Martin et al., 2012).

1.1.3.2 Automtizität

Automtizität beschreibt die Fähigkeit der Myokardzelle zur spontanen Depolarisation und Generierung eines AP in der Phase IV.

In der physiologischen Erregungsausbreitung zeigt sich Automtizität nur im Erregungsleitungssystem des Herzens, insbesondere im Sinusknoten ausgehend vom I_f (Pape H-C. et al., 2014). Sowohl das Arbeitsmyokard als auch andere Teile des Erregungsleitungssystem verfügen ebenfalls über I_f Ionenkanäle, deren Offenwahrscheinlichkeit jedoch erst bei deutlich niedrigeren Ruhemembranpotentialen ($-120\text{mV} - -170\text{mV}$) steigt, weshalb es im gesunden Gewebe auch bei langen Erregungspausen nicht zu Spontanaktivitäten kommt (Issa et al., 2019).

Durch Ischämie und Fibrosebildung kann es zu einer verminderten Expression von I_{K1} Kanälen kommen, welche in der Phase IV des Aktionspotentials das Ruhemembranpotential wiederherstellen (Enriquez et al., 2017). Dadurch stellt sich ein positiveres Ruhemembranpotential ein, das zum Auftreten abnormaler Automtizität und damit zu Arrhythmien führen kann (Bompotis et al., 2016). Damit sich aus der Automtizität

einzelner Myozyten eine VA bilden kann, müssen sich auch hier die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle (I_{Na}) in der relativen Refraktärperiode befinden, um eine erneute Auslösung eines Aktionspotentials zu generieren.

Ein weiterer bekannter Mechanismus der abnormalen Automatizität ist eine gesteigerte intrazelluläre Calcium-Konzentration bspw. als Folge externer Stimulation (*pacings*) (Enriquez et al., 2017). Das aus dem sarkoplasmatischen Retikulum stammende Calcium wird dabei mittels NCX aus der Zelle transportiert, was kurzfristig das Ruhemembranpotential erhöhen kann (Enriquez et al., 2017). Neben einer erhöhten Calcium-Konzentration durch externe elektrische Stimulation konnte auch eine erhöhte Natrium-Konzentrationen als Ursache einer erhöhten Arrhythmogenität nach langer externer Stimulation nachgewiesen werden (Enriquez et al., 2017). Dabei kommt es mittels Natrium-Kalium-Pumpe zu einem Nettoausstrom von Kationen und einer Hyperpolarisation, welche wiederum mittels Phase IV (Repolarisation) (s. Abb. 1) eine erneute Depolarisation initiieren kann (Enriquez et al., 2017, Gadsby and Cranefield, 1979).

1.1.3.3 Reentry-Erregungskreisläufe

Einen weiteren wichtigen Pathomechanismus zur Entstehung von Arrhythmien stellt ein *reentry*-Kreislauf um ein Hindernis dar wie in Abb. 4 dargestellt (Schmitt and Erlanger, 1928). Reentry entsteht, wenn sich ein AP nicht auslöscht, sondern eine Region mit bereits wieder erholter Erregbarkeit reaktiviert. Grundvoraussetzung hierfür ist einmal das Vorhandensein 1. einer kreisförmigen Erregungsleitungsbahn (bspw. zwei Äste einer Purkinje Faser) 2. eines unidirektionalen Blocks (bspw. Infarktgewebe) und 3. einer verzögerten Erregungsleitungseigenschaft. Normalerweise breitet eine Erregung sich über beide Erregungsrichtungen rechts und links gleichmäßig aus und es kommt zum Erlöschen der Erregung, wenn die beiden Äste aufeinandertreffen, da sich das Gewebe in der absoluten Refraktärperiode befindet. Kommt es innerhalb eines Astes des Erregungsleitungssystems zu einem unidirektionalen Block, kann sich die Erregung nicht mehr orthodrom, sondern nur noch antidrom d.h. in eine Richtung ausbreiten. In der Folge kann das Erlöschen der Erregung ausbleiben, da die antidrome Erregung auf Gewebe, das mittlerweile nun wieder erregbar ist (relative Refraktärperiode), trifft. Die Erregung kann sich nun über den gesamten Erregungskreis ausbreiten und zirkulieren (Martin et al., 2012). Ein Hindernis in der Erregungsfortleitung kann dabei u.a. durch Ischämie-bedingte Narben entstehen (Janse et al., 1980).

Es wurde diskutiert, ob die geringe Arrhythmieanfälligkeit bei Mäusen durch die geringe Größe und Masse der Herzen herrührt (Sabir et al., 2008). Jedoch konnte diese sog. *critical mass* Theorie bereits widerlegt werden (Connolly and Bishop, 2016). Eher scheinen in

neueren Untersuchungen unterschiedliche ventrikuläre Refraktärperioden (VRP) innerhalb des Herzgewebes durch Unterschiede der jeweiligen zellulären Elektrolytzusammensetzung einen maßgeblichen pro-arrhythmogenen Effekt auf *reentry*-Kreisläufe zu haben (Connolly and Bishop, 2016).

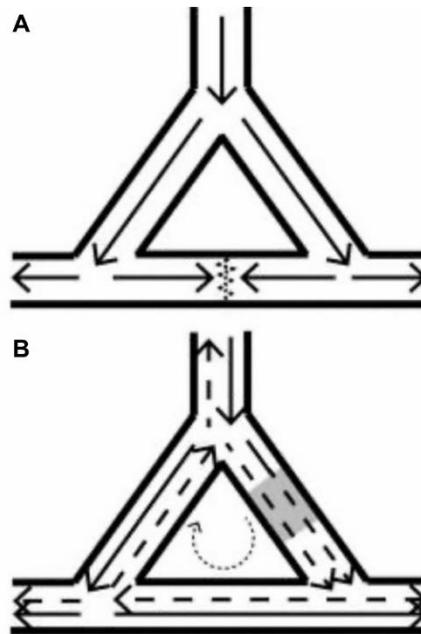


Abb. 4 Reentry-Erregungskreisläufe bei Arrhythmieinduktion

Erregungskreis im physiologischen Myokard: Die Erregung breitet sich gleichmäßig über beide Schenkel aus und erlischt schließlich, da das gesamte Myokard erregt ist und sich in der absoluten Refraktärperiode befindet. (A) Kommt es bspw. durch Ischämien zu einer verzögerten Weiterleitung in einem der beiden Schenkel, befindet sich beim Aufeinandertreffen der Erregungen das Myokard in der relativen Refraktärperiode, sodass es wieder erregbar ist und es zu kreisenden Erregungen kommen kann. (B)

Adaptiert mit Genehmigung der BMJ Publishing Group Limited nach Martin et al., 2012 (Martin et al., 2012).

1.1.4 Einflussfaktoren der ventrikulären Vulnerabilität

1.1.4.1 EKG Parameter und morphologische Auffälligkeiten zur Risikostratifizierung

Es konnte bereits im Menschen und Tier gezeigt werden, dass eine gesteigerte Herzfrequenz sowie veränderte EKG Parameter Einfluss auf die ventrikuläre Vulnerabilität haben können (Ferrari et al., 1991). So konnte ein direkter Zusammenhang zwischen einer verlängerten Erregungsbildung im Ventrikel und einer erhöhten ventrikulären Vulnerabilität sowohl in gesunden als auch ischämisch-geschädigten Herzen gezeigt werden (Bacharova, 2019, Chávez-González et al., 2017, Josephson and Anter, 2015).

Ebenso konnten eine gesteigerte Arrhythmogenität, kardiovaskuläre Mortalität sowie insgesamt erhöhte Mortalität durch eine gesteigerte QTc-Zeit gezeigt werden (Zhang et al., 2011). Sowohl verlängerte als auch verkürzte QTc-Zeiten können proarrhythmogen wirken und nicht nur Ischämien, sondern auch angeborene Ionenerkrankungen sowie bspw. Medikamente verlängerte QTc-Zeiten bedingen (Gussak et al., 2000, Zhang et al., 2011).

1.1.4.2 Autonome kardiale Funktion

Zunehmende Beachtung bei der Suche nach neuen pharmakologischen Therapieoptionen bietet der Einfluss des autonomen Nervensystems auf das Herz. Die autonome Versorgung des Herzens wird über Sympathikus und Parasympathikus vermittelt, sympathische Neurone erreichen das gesamte Herz (Atrium und Ventrikel), es zeigen sich jedoch Unterschiede in ihrer Dichte und ihres Ursprungs (Franciosi et al., 2017).

Sympathische Fasern stammen aus dem *Ganglion stellatum*, die parasympathischen aus dem *Nervus vagus* (Franciosi et al., 2017). Es zeigen sich Unterschiede in der Innervation: Einerseits sind Atrium und die Ventrikelbasis deutlich dichter versorgt als andere Herzgebiete, andererseits gibt es auch Unterschiede zwischen Parasympathikus und Sympathikus (Franciosi et al., 2017). Erster konzentriert sich auf den Vorhof, insbesondere um die Region des Sinusknotens und AV-Knotens, letzterer ist fast am gesamten Herzen zu finden (Franciosi et al., 2017).

Während der Sympathikus Chronotropie, Inotropie und Lusitropie über die Aktivierung von Alpha- und Beta-Rezeptoren steigert, wirkt der Parasympathikus diesem entgegen.

Vermittelt wird dies über den Neurotransmitter Acetylcholin an muskarinergen und präganglionären nikotinischen Rezeptoren (Podrid et al., 1990). Dabei ist vor allem der muskarinerge M₂ Rezeptor am Herzen ausgeprägt, dessen Stimulation im Vorhof direkt negativ chronotrop wirkt (Peralta et al., 1987). Am Ventrikel lässt sich lediglich durch vorherige *beta*-Aktivierung ein anti-adrenerger Effekt nachweisen (Méry et al., 1997).

Neben der Wirkung an Alpha- und Beta-Rezeptoren am Herzen schüttet der Sympathikus zusätzlich die Cotransmitter Galanin und Neuropeptide Y aus (Kummer, 1987, Shivkumar et al., 2016). Hierbei scheint Galanin die Ausschüttung von Acetylcholin zu reduzieren (Potter and Smith-White, 2005).

Einen Erklärungsansatz für das Entstehen von Arrhythmien durch autonome Einflüsse nach Ischämie bietet die Ausbildung autonomer Dysbalancen durch heterogenes Einwachsen sympathischer Fasern nach initialem Absterben von Nervenfasern durch die

Ischämie (Vracko et al., 1991). Hierbei sind besonders die Randgebiete der Läsion stärker innerviert, was auch an menschlichen Herzen gezeigt werden konnte (Cao et al., 2000).

Ebenso zeigte sich am Menschen eine Korrelation zwischen vermehrter Sympathikusaktivität im Narbengebiet des Herzens und einer erhöhten Neigung zu Tachyarrhythmien (Cao et al., 2000).

Im Tierexperiment an Hunden und Katzen nach Myokardischämie sowie in prospektiven Studien am Menschen zeigte sich, dass parasympathische Stimulation über Barosensoren an den Carotiden den SCD erniedrigt, wohingegen eine Steigerung des Sympathikotonus die Wahrscheinlichkeit für einen SCD erhöht (Ferrari et al., 1991, Schwartz et al., 1992).

In *in vitro* Tieruntersuchungen konnte ebenfalls eine Demaskierung VA nach Ischämie durch Katecholamingabe gezeigt werden (Stables and Curtis, 2009). Es werden eine erhöhte Isoproterenol-vermittelte Arrhythmogenität über eine verstärkte Calcium-Füllung des sarkoplasmatischen Retikulums und eine erhöhte Aktivität des Na-Ca-Exchanger diskutiert (Dibb et al., 2007, Sankaranarayanan et al., 2017).

In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine Sympathikusstimulation zu charakteristischen EKG Veränderungen führt und durch eine Herabsetzung der Reizschwelle zu vermehrtem Kammerflimmern führt (Yanowitz et al., 1966). Myokardiale Ischämien scheinen dieses Phänomen zu verstärken (Tomaselli and Zipes, 2004). Dies scheint mit einer verstärkten Sensitivität des kollagenen Bindegewebes, welches als Folge des Infarkts entsteht (Spinale, 2007), für sympathische Einflüsse einherzugehen (Cao et al., 2000). Die Infarkt Narbe und das sie umgebende Gewebe weist ebenfalls autonome Dysbalancen auf, nämlich heterogene Refraktärperiodenänderungen und eine veränderte Repolarisation, welche nach momentaner Kenntnislage eine Erklärung für ein erhöhtes arrhythmogenes Potential bieten (Barber et al., 1983, Franciosi et al., 2017, Shen and Zipes, 2014).

1.1.5 Prävention des plötzlichen Herztodes (SCD)

Hauptursache des SCD bei Erwachsenen sind VA (Deneke et al., 2019). Hierbei sind insbesondere VT sowie Kammerflimmern als Ursachen zu nennen (Adabag et al., 2010). Zur Sekundärprävention des SCD konnte bei Patienten mit eingeschränkter Ejektionsfraktion (>35%) eine Reduktion der Mortalität mittels *implantable cardioverter-defibrillator* (ICD) gezeigt werden (Buxton et al., 2006). Ebenso konnte mittels ICD-Implantation eine Mortalitätssenkung im primärprophylaktischen Setting bei bspw. Patienten mit therapierefraktären Ionopathien oder Herzinsuffizienz-Patienten mit hohem SCD-Risiko gezeigt werden (Olde Nordkamp et al., 2013, Priori et al., 2015).

Hingegen konnte bei bisherigen pharmakologischen Therapieoptionen aus der Gruppe der Klasse I Antiarrhythmika eine erhöhte Gesamtmortalität gezeigt werden (Bardy et al., 2005, Echt et al., 1991). Zudem waren in der Gruppe der Antiarrhythmika mehr Patienten an ventrikulären Tachykardien verstorben als in der Placebo-Gruppe (Echt et al., 1991). Betablocker konnten als einziges Antiarrhythmikum einen positiven Effekt sowohl in der Primärprävention des SCD als auch der akuten Therapie VA zeigen. Bezüglich Antiarrhythmika der Klasse III gibt es für Amiodaron Daten, die entweder keinen oder nur einen geringen protektiven Effekt in Risikogruppen zur Prävention des SCD zeigten (Piccini et al., 2009, Priori et al., 2015). Bei Patienten mit hoher VA-Last kann ebenfalls Sotalol zur Prävention von VT eingesetzt werden, jedoch nicht bei Patienten mit fortschreitender Herzinsuffizienz (Priori et al., 2015).

Die Erforschung des Pathomechanismus VA (insbesondere VT und Kammerflimmern) ist zur Entwicklung weiterer pharmakologischer Therapien zur Primärprävention daher nötig. Durch ein besseres Verständnis der Pathogenese ventrikulärer Arrhythmien könnten in Zukunft mittels EPU Hochrisikopatienten für einen SCD identifiziert werden, die herkömmlichen Kriterien (EF) entgangen wären.

1.2 Diagnostik bei Arrhythmien

Das gängigste diagnostische Verfahren zur Detektion von Arrhythmien ist das 12-Kanal-EKG. Die zwölf verschiedenen Kanäle basieren auf den Vorarbeiten von Willem Eintoven aus dem Jahre 1895 (Ableitungen I, II, III), Frank Norman Wilson aus dem Jahre 1934 (Ableitungen V1-6) und Emanuel Goldberger (aVL, aVR, aVF). Da Arrhythmien sich häufig dem konventionellen 12-Kanal-EKG entziehen, wurden bereits in den 1960er Jahren Langzeit-EKG-Geräte entwickelt, welche auch paroxysmal auftretende Rhythmusstörungen erfassen und ebenfalls eine bessere Beurteilung von Arrhythmien ermöglichen (Holter, 1961).

Mittels der Entwicklung des Belastungs-EKG können auch belastungs- bzw. ischämisch bedingte Arrhythmien demaskiert werden (Fortuin and Weiss, 1977, Shimizu et al., 2003). Dem EKG steht als invasive Methode die elektrophysiologische Untersuchung (EPU) entgegen. Diese kann bei VT der Abklärung des Pathomechanismus, falls dies durch nicht-invasive Methoden nicht möglich ist, der Evaluierung der passenden antiarrhythmischen Therapie und sogar zur Therapie bei bestimmten Arrhythmien dienen (Block et al., 1998). Ende der 1960er Jahre wurden die ersten diagnostischen EPU zur Beurteilung von Erregungsleitungsstörungen durchgeführt. In den 1980er Jahren kamen tachykarde Herzrhythmusstörungen sowohl supraventrikulär als auch ventrikulär in den Fokus der Untersuchungen. Mittels EPU ist es möglich, die Erregungsleitungsbahn, ektopie

Erregungen und die Arrhythmogenität des Herzgewebes zu untersuchen (Block et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass beim Menschen bereits drei abgegebene Extrastimuli ausreichen, um VT auszulösen (Morady et al., 1991).

Inzwischen ist die EPU ein am Menschen gängig eingesetztes Verfahren zur Therapie und invasiven Diagnostik von VA (Cronin et al., 2019, Priori et al., 2015). Insbesondere bei VA bedingt durch Narbengewebe sowie bei Patienten mit VT ohne strukturelle Herzerkrankungen können EPU zur Darstellung und Ablation von zirkulierenden Erregungskreisläufen bzw. getriggerte Aktivität genutzt werden (Priori et al., 2015). Bei angeborenen Ionopathien wie den *Long-QT* und *Short-QT* Syndromen sowie bei VT in der akuten Phase einer Myokardischämie sind EPU nicht empfohlen, da sie keinen Überlebensvorteil der Patienten zeigten (Priori et al., 2015).

1.3 Das Mausmodell zur Untersuchung der Arrhythmogenität

Durch ihre anatomische und physiologische Ähnlichkeit zum Menschen, die einfache genetische Manipulation sowie durch ethische und ökonomische Überlegungen eignen sich Mäuse als Versuchstiere zur Erforschung kardialer Arrhythmien (Kaese and Verheule, 2012, London, 2001b).

1.3.1 Besonderheiten des murinen Herzaktionspotentials

Die durchschnittliche HF liegt bei Mäusen bei 600 Schlägen pro Minute (bpm), ebenso ist die Aktionspotentialdauer kürzer als beim Menschen (Bogeholz et al., 2014, Petric et al., 2012).

Für die Repolarisation des Aktionspotentials sind bei der Maus, anders als beim Menschen (s. Abb 1), die Ionenströme I_{to} , I_{Kur} und $I_{k,slow}$ verantwortlich; ursächlich hierfür sind das Vorhandensein anderer Ionenkanäle als beim Menschen (London, 2001a). I_{Kur} führt hierbei zu einer für das Mausaktionspotential charakteristischen starken initialen Repolarisation (Li et al., 2004). Die Induktion von VT und Kammerflimmern ist in Mäusen schwieriger als beim Menschen, häufig zeigt sich eine spontane Rückkonversion in den Sinusrhythmus (London, 2001a).

1.3.2 Besonderheiten des murinen EKG

Anatomisch bestehen humane und murine Herzen aus vier Kammern, haben einen Sinusknoten als Startpunkt regelhafter Sinusschläge, einen AV-Knoten und verfügen über ein spezifisches Erregungsleitungssystem (Kaese and Verheule, 2012, London, 2001a).

Das Maus-EKG zeigt trotz prinzipieller Ähnlichkeit Unterschiede zum Menschen auf (Boukens et al., 2014). Zwar sind P-Welle und PQ-Intervall dem Menschen ähnlich, jedoch

gibt es Unterschiede bei der weiteren Erregungsausbreitung und Rückbildung (Sabir et al., 2008).

Der QRS-Komplex der Maus beginnt initial bereits mit einer R-Zacke, dies liegt daran, dass zwischen oberem Septummyokard und dem His-Bündel durch mangelnde fibrotische Isolierung eine direkte elektrische Verbindung besteht und eine direkte Erregungsübertragung ermöglicht wird (van Rijen et al., 2001). Daraus folgend ist es schwierig, Schenkelblöcke im Mäuse EKG über die QRS-Dauer zu detektieren (Boukens et al., 2014).

Der QRS-Komplex der Maus spiegelt nicht nur die Erregungsausbreitung des Ventrikels, sondern auch eine beginnende Erregungsrückbildung wider, bedingt durch die steile initiale Repolarisation im Aktionspotential der murinen Myokardzelle (Li et al., 2004, London, 2001a). Dem entspricht morphologisch im EKG ein positiver J-Punkt sowie eine nicht isoelektrische ST-Strecke und eine abgeschwächte Amplitude der T-Welle (Sabir et al., 2008, Speerschneider and Thomsen, 2013). Zur besseren Vergleichbarkeit wird daher diskutiert, das Ende der T-Welle als Rückkehr zur isoelektrischen Linie zu deuten (Schrickel et al., 2002). Ebenfalls diskutiert wird, ob es durch die frühe Repolarisation zu einem Abschwächen, in manchen Ableitungen sogar einer Aufhebung des QRS-Komplexes, kommen kann (Boukens et al., 2012).

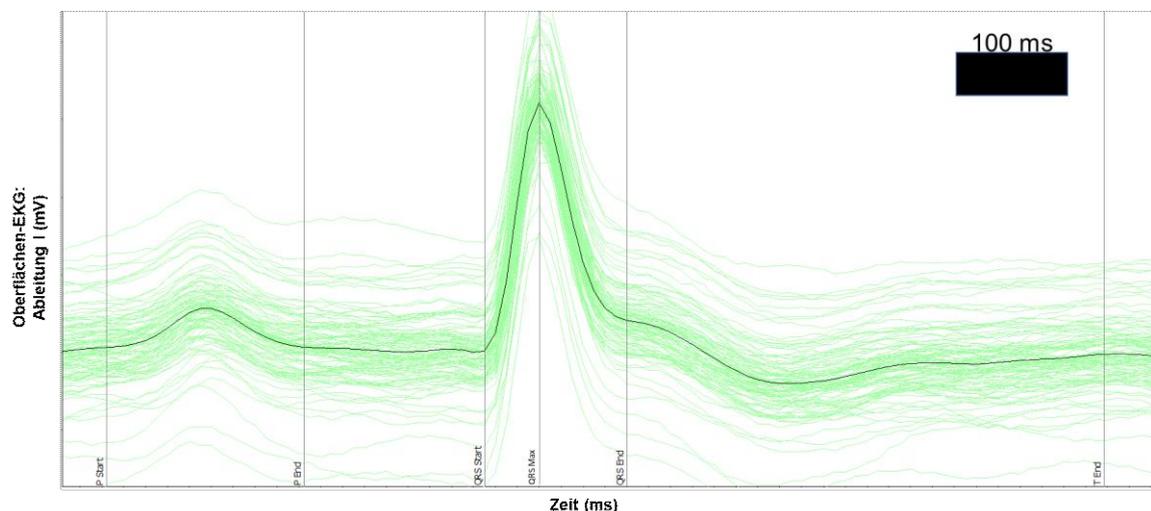


Abb. 5 Murines Beispiel-EKG

Dargestellt sind 50 Einzel-EKG-Komplexe (hellgrün) sowie eine aus den einzelnen Komplexen gemittelte EKG-Linie (schwarz). Eine Gemeinsamkeit ist das Auftreten von ST-Hebungen und T-Wellen-Veränderungen sowie im Verlauf ein Verlust der R-Amplitude und Ausbildung einer Q-Zacke. Kardiale Ischämien bewirken im murinen EKG breitere QRS-Komplexe, aufgrund breiterer Q-Wellen und einer längeren QTc-Zeit (Merentie et al., 2015). Es sind erhöhte J-Punkte sowie JT-Intervalle beschrieben und eine Abnahme der R-Amplitude im Verlauf (Merentie et al., 2015).

1.3.3 Myokardinfarktmodelle der Maus

Zur Erforschung der Pathophysiologie VA nach Myokardinfarkt und anschließender Reperfusion wurden im Tierversuch verschiedene Ischämie bzw. Ischämie-Reperusionsmodelle entwickelt. Diese unterscheiden sich dabei im Operationszugang (*open chest* und *closed chest*) sowie der Ischämiedauer und Reperusionsdauer. Im Gegensatz erfolgt im chronischen Ischämiemodell lediglich eine Ischämie ohne Reperfusion (Gehrmann et al., 2001). Um den arrhythmogenen Einfluss von Ischämie- bzw. Reperusionschaden auf das ventrikuläre Myokard zu untersuchen, wurde ein Ansatz gewählt, der der aktuellen Behandlung von Patienten mit akuter Myokardischämie ähnelt (Ibanez et al., 2017).

Das erste beschriebene *open chest* IR-Modell an Mäusen wurde von Michael et al beschrieben und mit verschiedener Ischämiedauer erprobt (Michael et al., 1995). Dieses Modell wurde erstmals von Merx et al. am hiesigen Standort etabliert (Merx et al., 2013). Auf diesem IR-Modell beruhen auch die hier durchgeführten IR-Operationen sowie die von anderen Arbeitsgruppen an unserem Standort (Kleindienst et al., 2016, Niermann et al., 2016, Petz et al., 2019, Schonberger et al., 2014). Auch außerhalb unseres Standorts wird das *open chest* IR-Modell in dieser Form angewendet (Song et al., 2016, Wang et al., 2018). Hierbei hat sich in Vorversuchen, eine Ischämiezeit von 45 Minuten als optimal hinsichtlich stabiler Infarktzone erwiesen.

Der Verlauf einer myokardialen Ischämieverletzung kann in Anlehnung an das dreiphasige *cardiac repair*-Modell beschrieben werden (Bonaventura et al., 2016, Lindsey et al., 2018). Die erste Phase ist die akute, inflammatorische Phase (3-72h), charakterisiert durch eine erhöhte Cytokin-Ausschüttung, gefolgt von der subakuten, proliferativen Phase (72h-7d), charakterisiert durch Fibroblasteneinwanderung und damit beginnende Fibrosierung des Infarktareals (Lindsey et al., 2018). Die dritte Phase ist die *maturation*-Phase, in der sich die Infarktzone vollständig konsolidiert (7d-21d) (Lindsey et al., 2018). Als langfristige Folgen einer myokardialen Ischämie im EKG konnten an Mäusen bereits eine verlängerte QRS-Dauer und ein verlängertes QT-Intervall gezeigt werden (Korte et al., 2002, Merentie et al., 2015).

1.3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen der Maus

Die EPU ist ein standardisiertes Verfahren beim Menschen mit etablierten Versuchsprotokollen (Josephson et al., 1978). Nach Einbringen mehrerer Herzkatheter können dabei die intrakardiale elektrische Erregungsausbreitung, mögliche autonome Areale detektiert und die arrhythmogene Vulnerabilität getestet werden (Muresan et al., 2019). Neben der sensorischen Funktion besteht auch die Möglichkeit zu stimulieren.

Tachyarrhythmien können per Katheterablation im Rahmen der EPU beseitigt werden (Muresan et al., 2019).

Elektrophysiologische Untersuchungen an Mäusen wurden sowohl am hier verwendeten C57Bl6/J-Stamm, als auch an verschiedenen anderen Stämmen mit vom Menschen stammenden Stimulationsprotokollen etabliert (Berul et al., 1996, Berul et al., 1997, Donoghue et al., 2003).

Ebenso sind bereits verschiedene kardiologische Krankheitsbilder im Tier- bzw. Mausmodell zur Arrhythmiebeschreibung etabliert worden. Einerseits sind hier angeborene Ionenkanalstörungen zu nennen (Song et al., 2007, Mohamed et al., 2007, Morita et al., 2007). Hierbei konnten einzelne PVC als auch nach Coffein-Stimulation polymorphe VT induziert werden (Mohamed et al., 2007). Andererseits gibt es auch etablierte Modelle für Herzinsuffizienzen und Kardiomyopathien an transgenen Mäusen (Donoghue et al., 2003, Berul et al., 1997). Hierbei waren vermehrt PVC induzierbar (Donoghue et al., 2003).

Die *in vivo* elektrophysiologische Untersuchung der Maus wurde von Charles Berul im Jahr 1996 etabliert (Berul et al., 1996). Darauf aufbauend wurden zunehmend EPU zum besseren Verständnis der Pathophysiologie menschlicher Ionenkanalerkrankungen und Kardiomyopathien sowie zur Testung pharmakologischer Substanzen an (transgenen-) Mäusen durchgeführt (Clasen, 2012, Patel et al., 2003, Yamauchi et al., 2002). Eine Literaturrecherche zur PES hatte ein uneinheitliches Vorgehen zwischen den Arbeitsgruppen ergeben, sodass eine Vielzahl verschiedener Protokolle mit unterschiedlicher Anzahl der Extrastimuli (S2-S5) existiert (Clasen, 2018).

Die Stimulationsprogramme der EPU für Mäuse sind an Protokolle aus der pädiatrischen Kardiologie angelehnt (Berul et al., 1996). Sie bestehen aus programmierten ventrikulären Stimulationen mit zwei bis drei Extrastimuli und *Burst*-Stimulationen mit Stimulationsintervallen von 150 bis 10ms (Doppel und Tripel-Extrastimulationen) bzw. 50-30ms (*Burst*-Stimulationen) (Berul, 2003, Berul et al., 1996). Ziel eines Stimulationsprotokolls ist die Induktion von Arrhythmien zur Beurteilung der Arrhythmogenität.

Aufgrund der erschwerten Arrhythmieinduktion *in vivo* bei Mäusen ist bislang eine Beurteilung und ein Vergleich der Arrhythmogenität mit herkömmlichen Protokollen schwer. Trotz verschiedenster Stimulationsprotokolle sind in Mäusen insbesondere höhergradige ventrikuläre Arrhythmien wie VT oder Kammerflimmern nur schwer induzierbar (Clasen, 2018, London, 2001a). Ein angepasstes Stimulationsprotokoll auf Grundlage der Arbeitsgruppe um Charles Berul, das anhand anderer Arbeiten (s.u.) modifiziert wurde, könnte hierbei bessere Resultate liefern, ohne unspezifische Arrhythmien zu erzeugen

(Berul et al., 1996, Bevilacqua et al., 2000, Schrickel et al., 2007). Hierzu konnte in der Arbeitsgruppe an unserem Standort gezeigt werden, dass dieses modifizierte Stimulationsprotokoll möglicherweise bei Mäusen besser geeignet ist, um die ventrikuläre Vulnerabilität zu testen (Clasen, 2018). Andererseits besteht eine Limitation bei der Aggressivität aufgrund der Gefahr, unspezifische Arrhythmien zu erzeugen (Maguire et al., 2003). So konnte gezeigt werden, dass mittels hochfrequenter Burststimulation zwar in chronischen Ischämie-Tieren und anderen Hochrisikogruppen insgesamt mehr VT induzierbar waren, jedoch dies sich auch in unbehandelten Jungtieren zeigte, sodass sich kein prognostischer Hinweis auf eine erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität ergab (Maguire et al., 2003, Gehrman et al., 2001).

In Ischämie-Modellen konnte in der akuten Ischämiephase (s. 1.3.3) mittels herkömmlicher Stimulationsprotokolle Hinweise auf eine erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität durch eine höhere Induzierbarkeit von VT nach Ischämie gezeigt werden (Gehrman et al., 2001). Eine quantitative und qualitative Arrhythmiecharakterisierung eines IR-Modells 7d postoperativ mittels EPU ist in der Literatur bislang noch nicht beschrieben.

1.4 Ziele der Arbeit

Der aktuelle Forschungsstand zeigt, dass es sowohl für die Beschreibung und Auslösung von ventrikulären Arrhythmien im Mausmodell Klärungsbedarf gibt. Zudem sollte das verwendete IR-Modell elektrophysiologisch beschrieben und untersucht werden, inwiefern sich die EPU zu Induktion ventrikulärer Arrhythmien im Modell eignet.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Ziele formuliert:

- 1.Charakterisierung der ventrikulären Vulnerabilität im IR-Mausmodell nach sieben Tagen.
- 2.Evaluation des MB-Stimulationsprotokolls im Vergleich zu den herkömmlichen Stimulationsprotokollen im IR-Modell im Vergleich zu Sham operierten Kontrollen.
- 3.Untersuchung von elektrophysiologischen, funktionellen und strukturellen Parametern in Bezug auf die Arrhythmogenität.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung und Zucht

Alle Tierversuche sowie die Euthanasie der Versuchstiere erfolgte gemäß etablierter internationaler Standards und mit vorheriger Genehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) des Landes Nordrhein-Westfalen (Projektnummer G460/13, Aktenzeichen: 84-02.04.2013.A460) (Council, 2010).

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J (n = 18; 14–16 Wochen; 27,84 g \pm 0,4 g). Die Mäuse wurden von der Firma Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen und über die zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf (Leiter Prof. Dr. vet.-med. Sager) bereitgestellt. Die Experimente erfolgten im Forschungslabor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie. Die Größe der Käfige betrug 350-530cm³, die Höhe 14cm. Die Käfige wurden mit Lignocel ¾-S ausgestattet (J. Rettmaier & Söhne GmbH & Co KG). Die Mäuse wurden bei einer Temperatur von 22 °C \pm 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 % \pm 5 % mit 22-fachem Luftwechsel pro Stunde gehalten.

Das Beleuchtungsniveau betrug konstant 320 Lux im Zeitraum von 6 bis 18 Uhr MEZ. Den Mäusen standen 15mm autoklaviertes Futter („ssniff“ Spezialdiäten GmbH) und kontrolliertes Leitungswasser aus Trinkflaschen *ad libitum* zur Verfügung. Der Aufzeichnungspflicht jedes Tierversuchs wurde nachgekommen. Jede Maus war mit einer nummerierten Begleitkarte versehen, welche Auskunft über Herkunft, Nummer des Versuchsvorhabens und Verwendung gab.

Versuchsabläufe, Belastungstabelle und Ergebnisse wurden in schriftlicher und digitaler Form festgehalten. Es wurden Geschlecht, Alter, Körpergewicht, Trinkmenge, Verhalten, Versuchsdauer, durchschnittliche Isoflurandosierung, Herzfrequenz (HF), Atemfrequenz und Gewicht dokumentiert. Zur Vermeidung von Schmerzen während der Versuche erfolgte eine engmaschige Reflextestung.

Euthanasie und Herzentnahme am Versuchsende wurden unter tiefer Narkose mittels *i.p.* Gabe von Ketamin (100mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10mg/kg Körpergewicht) *i.p.* durchgeführt.

2.2 Versuchsplanung

Für die elektrophysiologische Charakterisierung des Ischämie-Reperfusion (IR)-Mausmodells *in vivo* wurde folgendes tierexperimentelle Vorgehen gewählt.

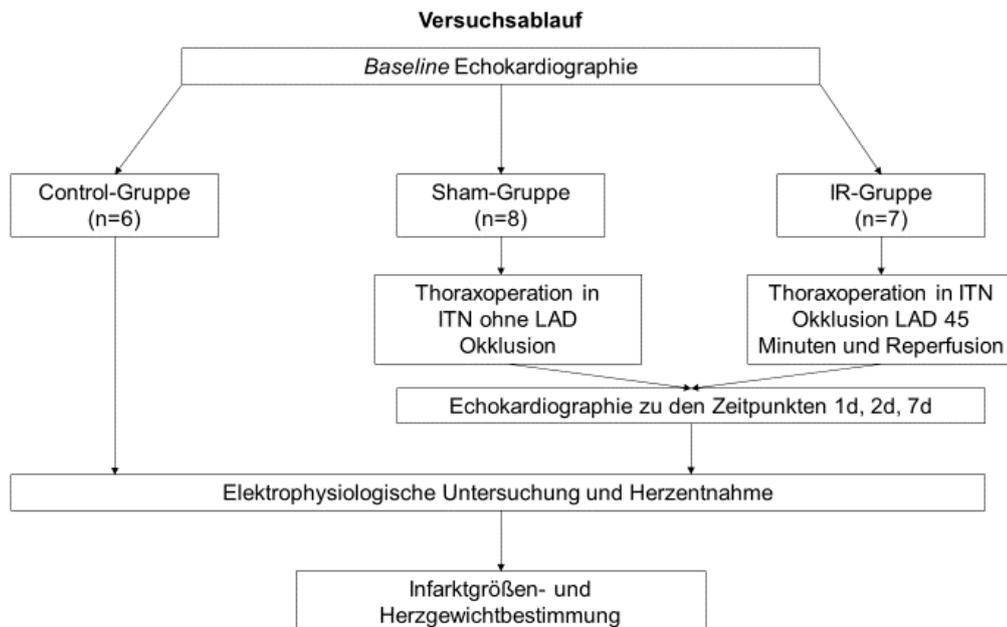


Abb. 6 Versuchsablauf der Arrhythmieanalyse

Nach initialer Echokardiographie wurden die Versuchstiere den drei Gruppen Control (nicht operiert), Sham (operiert ohne Ischämie) oder IR zugeordnet. In der Control-Gruppe fand nach 7d die EPU ohne weitere Interventionen statt. In der IR-Gruppe fand eine Thoraxoperation mit 45 Minuten Okklusion der LAD statt, in der Sham-Gruppe erfolgte nur eine Thoraxoperation. Anschließend erfolgte in beiden Gruppen eine EPU. Nach IR-Operation fanden zu drei Zeitpunkten Echountersuchungen statt (1d, 2d, 7d). In jeder Gruppe erfolgte nach EPU die Herzentnahme zur Infarktgrößen- und Herzgewichtsbestimmung.

IR=Ischämie/Reperfusion, ITN=Intubationsnarkose, LAD=left anterior descending artery, EPU=elektrophysiologische Untersuchung.

In der IR-Gruppe erfolgte eine Herzoperation am offenen Thorax und ein 45-minütiger Verschluss der LAD (*left anterior descending artery*) der Maus mit anschließender Reperfusion (IR). Bei Sham-Mäusen erfolgte lediglich die Thoraxoperation ohne Verschluss der LAD.

Die Control-Gruppe wurde untersucht, um erstens Erfahrung mit den Experimenten zu sammeln und um zweitens den Einfluss der Operation auf die Arrhythmieentstehung abschätzen zu können.

Zur Modellkontrolle und Beurteilung der systolischen LV-Funktion erfolgten präoperativ und 1d, 2d und 7d nach IR-Operation echokardiographische Untersuchungen. Die elektrophysiologische Untersuchung (EPU) erfolgte 7d postoperativ (subakute Phase). Der Zeitpunkt wurde dabei in Anlehnung an das dreiphasige *cardiac repair*-Modell nach Bonaventura et al. so gewählt, dass die akute inflammatorische Phase sicher abgeschlossen war (Bonaventura et al., 2016). Bei der EPU handelte es sich um einen Finalversuch, nach dem das Herz entnommen und gewogen wurde.

Zur Darstellung der Infarktnarbe erfolgte anschließend eine Gomoris-Trichrome-Färbung. Bei *Control*-Tieren ohne Infarkt erfolgte lediglich eine echokardiographische Untersuchung. Die Poweranalyse ergab n=12 je Gruppe (Effektgröße nach Cohen 0.8), wobei nach bisherigen Erfahrungen mit der Methodik zunächst n=8 angestrebt wurden.

2.3 Transthorakale echokardiographische Untersuchung

2.3.1 Material

2.3.1.1 Geräte

▪Echokardiographie	Vevo® 2100 Imaging System, Visual Sonics, Toronto, Kanada
▪Schallkopf	Transthorakal, Doppler, 18-32 MHz, Vevo 2100, Visual Sonics, Toronto, Kanada
▪3D Monitor	Vevo® 2100 Imaging System, Visual Sonics, Toronto, Kanada
▪Operationstisch	Visual Sonics B 05 34, Visual Sonics, Toronto, Kanada
▪Schallgelwärmer	Therma Sonic®-Gelwärmer, Parker-Hannifin Corp. Cleveland, USA
▪Rasierer	Moser® Typ 1556, Wahl GmbH, Unterkirnach
▪Waage	Sartorius portable, Sartorius AG, Göttingen

2.3.1.2 Computer und Software

▪Acer Aspire V13	Windows 10
▪VEVO LAB 3.1	FUJIFILM VisualSonics, Inc
▪Statistik-Programm	GraphPad Software, Inc., GraphPad Prism 6.01
▪Textverarbeitung	Microsoft Office 2017, Microsoft Office 2016
▪Literaturverwaltung	Endnote 8.2, Clarivate Analytics

2.3.1.3 Instrumente und Verbrauchsmaterialien

▪Schallgel	Aqua Sonic 100, Parker-Hannifin, Cleveland, USA
▪Enthaarungscreme	Veet™ Silk&Fresh, Reckitt Benckiser, Slough, UK
▪Transpore™	Transparentes Tape, 3M, Neuss, Deutschland
▪Weiche Tücher	Tapira, GVS Großverbrauchsspezialisten eG, Heidenheim
▪Raue Tücher	Clou Prestige tissues, WEPA Professional GmbH, Arnsberg, Deutschland
▪Stift für Markierungen	Edding 3000®, Edding AG, Ahrensburg
▪Kodan®	Tinktur forte, farblos, Schülke, Norderstedt, Deutschland
▪Oberflächendesinfektionsmittel	Bacillol® AF, Hartmann, Heidenheim

2.3.1.4 Pharmaka

▪Isofluran

Isofluran ist ein volatiles Anästhetikum aus der Reihe der halogenierten Kohlenwasserstoffe. Es wirkt hypnotisch, muskelrelaxierend und gering analgetisch (Aktories K. et al., 2013).

Dadurch, dass es unter anästhetischen Bedingungen nicht brennbar ist und kaum vor sauerstoffbedingtem Zerfall geschützt werden muss, hat es die idealen Eigenschaften eines Narkosegases (Lancet, 1985). Durch einen Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten von 1,4 ist es gut steuerbar, besonders im Vergleich zu intravenösen Anästhetika wird dies durch eine geringe Metabolisierungsrate von unter 0,2% noch verstärkt (Aktories K. et al., 2013).

Die Nebenwirkungen umfassen Hyperkapnie, Azidose, Atemdepression, ebenso kann es nach sehr langer Anwendung zu Tachykardie und Hyperthermie kommen (Cesarovic et al., 2010). Eine solche Dauer wurde jedoch in keinem der durchgeführten Experimente beobachtet

Beim Menschen wird ebenfalls diskutiert, ob es bei langer Anwendung bei Patienten mit Koronarsklerose ischämische Zustände begünstigt (*coronary steal*), ebenfalls wird eine hepatotoxische Wirkung der Isofluran-Metabolite vermutet (Aktories K. et al., 2013).

Jedoch ist zu beachten, dass mittels Öffnung ATP-abhängiger mitochondrialer Kaliumkanäle auch kardioprotektive Effekte mittels Bradykardie beschrieben wurden (Aktories K. et al., 2013, Williamson et al., 2018).

Die Zielkonzentration per inhalationem war 1,6% Isofluran. Zum Ausschluss einer Überdosierung fand eine andauernde Überwachung der Atmung, HF sowie der Raum- und Körpertemperatur statt.

2.3.2 Arbeitsplatz

Die Versuche fanden im kardiologischen Forschungslabor der Sicherheitsstufe 1 statt. Die Mäuse befanden sich während der Untersuchung in einem lichtkontrollierten, ruhigen Raum, dessen Raumtemperatur überwacht und schriftlich festgehalten wurde. Die Versuche fanden zu ruhigen Laborzeiten am Nachmittag statt.

2.3.3 Vorgehen

Die Untersuchung wurde unter 1,6% Isofluran vermittelter Inhalationsnarkose durchgeführt (Induktionsphase 2,5 Vol.% in 70% N₂O / 30% O₂). Während der Experimente fand eine konstante Überwachung der Herz- und Atemfrequenz und der Temperatur statt. Die transthorakale Echokardiographie ist für das IR-Mausmodell ein etabliertes und verlässliches Verfahren zur Bestimmung der ventrikulären Funktion (Merx et al., 2013). Initial wurden die Mäuse gewogen und in einer Narkosekammer mit 3,5-4% Isofluran sediert, um eine rasche Hypnose zu erreichen. Die Extremitäten der Mäuse wurden an den Kontakt-Elektroden des gewärmten Operationstisches (Visual Sonics B 05 34) fixiert. Die Aufrechterhaltung der Isofluransedierung erfolgte bei 1,6 Vol% über eine Atemmaske. Die Atemfrequenz sollte zwischen 80-120/min betragen.

Unter kontrollierter Ableitung eines Elektrokardiogramms (EKG) und der Atemfrequenz erfolgte eine Enthaarung im ventralen Thoraxbereich der Maus mittels Rasierer (Moser Type 1556) und Enthaarungscreme (Silk&Fresh, Veet). Anschließend folgte die transthorakale Echokardiographie mittels speziell für Mäuseherzen geeignetem Schallkopf (18-32 MHz, Vevo 2100, Visual Sonics) und Schallgel (AquaSonic 100). Dargestellt wurden die parasternal Langachse und die parasternal Kurzachse .

Operationstisch und Schallkopf sind dabei an einer Halterung (Visual Sonic Systems 2100) fixiert, welche mittels Drehrädern eine Höhenverstellung sowie horizontale Höhenausrichtungen erlaubt, um auf diese Weise Manipulationen an der Maus nicht nötig zu machen.

Nach Beendigung der Untersuchung wurden die Mäuse bis zu ihrem Wiedererwachen beobachtet.

2.3.4 Analyse

Die Analyse fand mittels VEVO Lab 3.1 in den Räumlichkeiten des kardiologischen Forschungslabors statt.

Zur Auswertung des Echokardiogramms gehörte die Beurteilung und Bestimmung der HF, des Herzzeitvolumens (HZV), des Schlagvolumens (SV) sowie des enddiastolischen- und endsystolischen Volumens (EDV bzw. ESV) im *B-* und *M-Mode*. Die Bestimmung des

enddiastolischen- und endsystolischen Volumens sowie die Kalkulation des Schlagvolumens und Herzzeitvolumens erfolgten anhand etablierter Methoden (Zhang et al., 2007). Die Volumenberechnung erfolgte auf Grundlage eines zylindrisch-hemiellipsoiden Modells mit der Formel: $\text{Volumen} = 8 \times \text{Fläche}^2 / 3 \pi / \text{Länge}$ (Zhang et al., 2007). Darauf basierend erfolgte die Berechnung der Ejektionsfraktion wie folgt: $(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV} \times 100$. Die Berechnung des *cardiac output* (CO) erfolgte anhand folgender Formel: $\text{CO} = \text{HF} \times \text{SV}$. Die Bestimmung des *fractional shortening* (FS) erfolgte in der *parasternalen Langachse* mit der Formel: $\text{FS} (\%) = (\text{LVEDD} - \text{LVESD}) / \text{LVEDD} \times 100$.

2.4 Ischämie-Reperfusion-Operation

2.4.1 Material

2.4.1.1 Geräte

- | | |
|------------------------------|--|
| ▪Animal BioAmp® | FE238, ADInstruments, Spechbach, Deutschland |
| ▪Beheizbarer Operationstisch | Small Operating Table 816-503001-1, BioScience, Sheerness, UK |
| ▪BioAmp Cable® | ADInstruments, Spechbach, Deutschland |
| ▪T-Type Pod ML 312 | Temperatursonde ADInstruments, SPEchbach, Deutschland |
| ▪Mikroskop | Leica MZ9.5 Stereomicroscope, Leica Micro systems GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| ▪Lichtquelle | KL1500 LCD, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland |
| ▪Zerstäuber | für Isofluran mit <i>Flow-meter</i> , Sigma Delta Vaporizer, Penlon Limited, Abingdon (UK) |

2.4.1.2 Computer und Software

- | | |
|---------------------|---|
| ▪DELL™ Optiplex 755 | Windows Vista |
| ▪LabChart® | ADInstruments, Version 8.1 |
| ▪MC_Stimulus II | Multi Channel Systems MCS GmbH, Version 3 |

2.4.1.3 Instrumente und Verbrauchsmaterialien

- | | |
|----------------------|--|
| ▪Präparationsbesteck | Anatomische Pinzette
Pinzetten krumm spitz fein |
|----------------------|--|

	Mikroschere
	Gefäßhalter Pinzette manuell vorgebogen
	Nahtklemme
▪ Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg
▪ Seidenfaden mit Nadel	fein geflochten, 5/0 Seraflex®, Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila
▪ Nadel	27G BD Eclipse™ <i>needle</i> , Becton, Dickinson and Company, Eysins (CH)
▪ Spritzen	Omnifix®-F Tuberkulin, B.Braun Melsungen AG, Melsungen
▪ Transpore™	Transparentes Tape, 3M, Neuss, Deutschland
▪ Weiche Tücher	Tapira, GVS Großverbrauchsspezialisten eG, Heidenheim
▪ Kompressen	ES-Kompressen 10x10cm, Hartmann, Heidenheim
▪ Tupfer	Pur-Zellin, Hartmann

2.4.1.4 Pharmaka

▪ Isofluran (pharmakologische Eigenschaften s. 2.3.1.4)

Nach Einleitung der Inhalationsnarkose mittels Isofluran in einer Narkosekammer (3,5-4,0 Vol%) wurde die Maus mit dem Plastikteil einer Verweilkanüle intubiert. Über die Kanüle wurde die Maus mit bis zu 2% Isofluran bei einer Atemfrequenz von 140 Atemzüge/Minute und einem Druck von 10-12 mbar beatmet. Zum Ausschluss möglicher Nebenwirkungen fand auch hier eine andauernde Überwachung der Atmung, HF sowie der Raum- und Körpertemperatur statt.

▪ Buprenorphin (Temgesic®)

Buprenorphin ist ein gemischtes Agonist-Antagonist-Opiatderivat, synthetisiert aus Thebain. Dabei wirkt es am μ -Opiatrezeptor partiell agonistisch, am δ -Opiatrezeptor antagonistisch, sowie partiell agonistisch am Nozizeptinrezeptor (ORL-1) (Aktories K. et al., 2013).

Im Tierversuch konnte, wohlmöglich auf partiell agonistischer Wirkung am Nozizeptinrezeptor (ORL-1) beruhend, eine Abnahme der Analgesie bei sehr hohen Dosen beobachtet werden (Aktories K. et al., 2013, Cowan et al., 1977). Am Menschen konnte gezeigt werden, dass Buprenorphin im Bereich analgetischer Dosierungen (0,1-0,6 mg) ein Sättigungsverhalten in Bezug auf seine atemdepressive Wirkung zeigt (Dahan et al., 2006).

Buprenorphin zeigt einen hohen first pass Effekt in der Leber (CYP3A4) und sollte daher parenteral verabreicht werden, seine Wirkdauer beträgt 6-8h beim Menschen (Aktories K. et al., 2013, Brewster et al., 1981).

2.4.2 Vorgehen

Es wurde das im Forschungslabor etablierte Operationsprotokoll der IR-Operation der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Marc Merx verwendet (Merx et al., 2013). Hierbei wurden kleine Veränderungen vorgenommen (s. unten).

Die Operation für die IR-Gruppe fand wie unten beschrieben statt, bei der *Sham*-Gruppe wurde die Operation mit Ausnahme des Umstechens und der Okklusion der Arterie ebenso wie folgend eingehalten:

Die Untersuchungen wurden unter Isofluran vermittelter Inhalationsnarkose durchgeführt (Induktionsphase 2,5 Vol.% in 70% N₂O / 30% O₂, Aufrechterhaltung untersuchungsabhängig). Während der Experimente fand eine konstante Überwachung der Herz- sowie der Atemfrequenz, der neurologischen Reflexe und der Temperatur (T-type Pod ML 312; Rectal Sonde RET-3, ADInstruments) statt. Nach initialer Inhalationsnarkose (s.o.) wurde die Maus mittels Aufhängung an den Schneidezähnen in einem Intubationsstativ fixiert und unter Beleuchtung einer Kaltlichtquelle mittels Verweilkanüle intubiert. Über die Intubation wurde die Isofluran-Narkose aufrechterhalten und zusätzliche Temgesic (0.05/kg, s.c) appliziert. Die Narkosetiefe wurde durch Beurteilung des Verlusts von Stell-, Lid- und Pfotenreflex (festes Kneifen) sowie des Muskeltonus, der Reaktion auf Schmerzreize und der Frequenz und Tiefe der Atmung beurteilt.

Anschließend wurde die Maus auf dem Operationstisch fixiert, es folgte die Aufzeichnung der Temperatur und Ableitung des EKG (Animal BioAmp®) mittels rektaler Sonde, die die Temperatur überwachte. Durch den beheizbaren Operationstisch (BioScience) und Infrarot-Warmlichtquellen (KL1500 LCD, Leica Microsystems) wurde sichergestellt, dass die Körpertemperatur 37°C nicht unterschritt.

Nach Desinfektion der Haut erfolgte ein 1,5cm großer Hautschnitt über dem Brustbein und die Rippen wurden durch Splitterpinzetten freipräpariert. Zwischen 9. und 10. Rippe erfolgte mittels Mikroschere das Präparieren eines Zugangs in den Thorax, welcher durch Operationszangen weiter eröffnet wurde.

Nach Entfernung des Herzbeutels wurde die linke Herzkranzarterie lokalisiert und mit einem 7-0 Prolenefaden (Seraflex®) umschlungen. Die Fädenenden wurden jeweils durch einen PE 10 Schlauchring geführt, an den Fädenenden wurden freischwebende 1g Gewichte befestigt, sodass der Faden das umschlungene Gefäß okkludierte. Die Okklusion der Arterie wurde über das EKG mittels ST-Streckenhebung überprüft und dokumentiert. Bei

Sham operierten Mäusen erfolgte lediglich eine Unterstechung der linken Herzkranzarterie ohne Okklusion.

Während der Ischämiedauer (45 Minuten) wurde der eröffnete Thorax mittels NaCl (Fresenius SE & Co. KGaA) angefeuchtet und es folgte eine strenge Temperaturkontrolle ($>37^{\circ}\text{C}$).

Zur Reperfusion wurde nach Ablauf der Ischämiezeit die Okklusion der Arterie aufgehoben und der Faden sowie die Operationshaken entfernt. Bevor die Rippen mit 4-0 Seidenfaden (Seraflex®) verschlossen wurden, wurde der Beatmungsdruck der Lungen auf 20mbar erhöht und das korrekte Entfalten beider Lungenflügel visuell kontrolliert. Muskel und Hautnaht erfolgten mittels 5-0 Seidenfaden (Seraflex®).

Nach Beendigung der Isoflurannarkose und Wiedereinsetzen der Atemreflexe wurde der Maus über eine Atemmaske für zehn Minuten ein Gemisch aus Sauerstoff und Raumluft verabreicht, anschließend wurde sie unter Rotlicht in einem sauberen Käfig gehalten.

Zur Analgesie erfolgte alle 6-8h die Gabe von Temgesic (0,05mg/kg, s.c.) unter engmaschiger Nachbeobachtung.

2.5 *In vivo* Elektrophysiologische Untersuchung

2.5.1 Material

2.5.1.1 Geräte

- | | |
|---------------------------------|---|
| ▪Animal BioAmp® | FE238, ADInstruments, Spechbach, Deutschland |
| ▪Beheizbarer Operationstisch | Small Operating Table 816-503001-1, BioScience, Sheerness, UK |
| ▪BioAmp Cable® | ADInstruments, Spechbach, Deutschland |
| ▪T-Type Pod ML 312 | Temperatursonde ADInstruments, Spechbach, Deutschland |
| ▪Connector Cable™ CIB'ER MOUSE™ | NuMED Inc., Hopkinton,USA, PIN 8, 200 cm Länge |
| ▪Elektrodenkabel Maus | |
| ▪Elektrodenkatheter | Oktapolar, 2.0 french, 0.5 mm Elektrodenabstand und -länge |
| ▪Elektrodennadel | MLA 1203 Needle Electrodes (5) 29 gauge (12mm), ADInstruments, Spechbach, Deutschland |
| ▪Power Lab 8/35 ® | ADInstruments, Spechbach, Deutschland |

▪STG 4002	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland
▪Mikroskop	Leica MZ9.5 Stereomicroscope, Leica Micro systems GmbH, Wetzlar, Deutschland
▪Lichtquelle	KL1500 LCD, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
▪Zerstäuber	für Isofluran mit <i>Flow-meter</i> , Sigma Delta Vaporizer, Penlon Limited, Abingdon (UK)
▪Peristaltische Pumpe	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH

2.5.1.2 Computer und Software

▪Acer Aspire V13	Windows 10
▪DELL™ Optiplex 755	Windows Vista
▪LabChart®	ADInstruments, Version 8.1
▪MC_Stimulus II	Multi Channel Systems MCS GmbH, Version 3
▪Statistik-Programm	GraphPad Software, Inc., GraphPad Prism 6.01.
▪Literaturverwaltung	Endnote 8.2, Clarivate Analytics
▪Textverarbeitung	Microsoft Office 2017, Microsoft Office 2016

2.5.1.3 Instrumente und Verbrauchsmaterialien

▪Präparationsbesteck	Anatomische Pinzette Pinzetten krumm, spitz, fein Mikroschere Gefäßhalter Pinzette manuell vorgebogen Nahtklemme
▪Aqua destilliert	Reinigung des Katheters
▪Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg
▪Dulbecco's phosphate puffered saline	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
▪Seidenfaden	fein geflochten, 5/0 Seraflex®, Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila
▪Nadel	27G BD Eclipse™ needle, Becton, Dickinson and Company, Eysins (CH)
▪Spritzen	Omnifix®-F Tuberkulin, B.Braun Melsungen AG, Melsungen
▪Transpore™	Transparentes Tape, 3M, Neuss, Deutschland

- Weiche Tücher Tapira, GVS Großverbrauchsspezialisten eG, Heidenheim
- Raue Tücher Clou Prestige tissues, WEPA Professional GmbH, Arnsberg, Deutschland
- Kompressen ES-Kompressen 10x10cm, Hartmann, Heidenheim
- Tupfer Pur-Zellin, Hartmann

2.5.1.4 Pharmaka

▪ Isofluran (s. 2.3.1.4)

Nachdem initial 3% Isofluran über eine Atemmaske zur schnellen Narkoseeinleitung gegeben wurden, betrug die Zieldosierung für die restliche EPU 1,6% im Durchschnitt. Zum Ausschluss möglicher Nebenwirkungen fand u.a. auch hier eine kontinuierliche Überwachung der Atmung, HF sowie der Raum- und Körpertemperatur statt.

▪ Isoproterenol

Beim Noradrenalin-derivat Isoproterenol handelt es sich um ein direktes Sympathomimetikum. Durch seinen Aufbau mit drei Hydroxygruppen und der Bindung der Isopropyl-Gruppe am Stickstoff ist es direkt wirksam und spezifisch für β_1 - und β_2 -Rezeptoren (Aktories K. et al., 2013). Mittels β_1 -Aktivierung führt es zu positiver Chronotropie, Dromotropie und Lusitropie. In *ex vivo* Tierversuchen ist eine auf einer steileren Phase II Repolarisation und einer Verkürzung der Plateauphase bei ausreichender Dosis, beruhende, arrhythmogene Wirkung des Isoproterenols beschrieben (Giotti et al., 1973, Priori and Corr, 1990).

Zur Auslösung und Klassifizierung von Katecholamin-sensitiven Arrhythmien wurden $1\mu\text{g/g}$ Körpergewicht i.p. verabreicht (Bevilacqua et al., 2000). Die Applikationskontrolle erfolgte durch Beobachtung eines Herzfrequenzanstiegs von mindestens 20% oder einer Verringerung der Zykluslänge auf unter 100ms. Bei Ausbleiben des Anstiegs erfolgte eine weitere Gabe Isoproterenol (Brunner et al., 2001). Die Beeinflussung der EKG Parameter inklusive Herzfrequenzkinetik durch Isoproterenol wurde bestimmt.

2.5.2 Versuchsaufbau

Oberflächen-EKG:

Das EKG an den Extremitäten ermöglicht die Beurteilung der elektrischen Erregungsbildung, -ausbreitung und -rückbildung des Herzens.

Ein Oberflächen-EKG wurde während der Echokardiographie, der IR-Operation und der EPU aufgezeichnet. Dabei lag das Augenmerk während der Echokardiographie auf der HF.

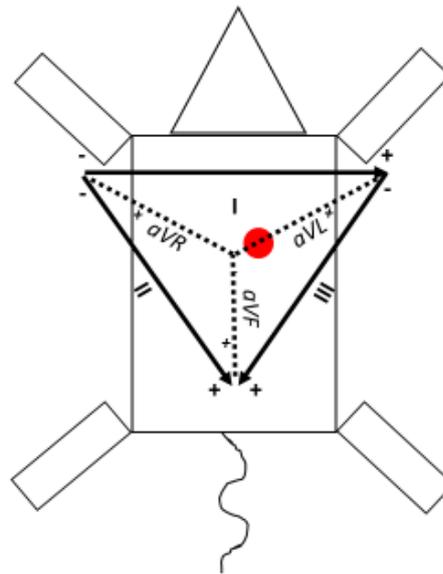


Abb. 7 Oberflächen-EKG-Ableitung

Die Skizze verdeutlicht die Ableitung eines 6-Kanal-Oberflächen-EKG bei der Maus. Dabei werden vier Elektroden subcutan an den Extremitäten angebracht (ADInstruments). Somit werden die bipolaren Extremitätenableitungen I, II, III nach Einthoven und die unipolaren Extremitätenableitungen aVR, aVL und aVF nach Goldberger abgeleitet.

Die dafür benötigten Elektroden (ADInstruments) wurden nach Analgosedierung der Versuchstiere mittels Nadeln *subcutan* im Bereich der Extremitäten angebracht. Die Nadeln wurden am rechten Arm, am linken Arm, am linken Bein und am rechten Bein (die Nullelektrode) angebracht. Hierdurch waren die Ableitungen I und II ableitbar. Mittels Software (Labchart) wurden anhand der zwei Ableitungen die restlichen der insgesamt sechs Ableitungen berechnet. Für die echokardiographische Untersuchungen erfolgten die EKG-Ableitungen mittels Kontaktplatinen an den Extremitäten.

Die Elektroden waren mit dem Signalverstärker verbunden (OctalBioAmp®, ADInstruments). Das Eingangssignal wurde im Powerlab (PowerLab, ADInstruments) integriert und am Computer mit der Software LabChart 8 (ADInstruments) visualisiert.

Die Oberflächen Elektrogramme wurden vor der EPU aufgezeichnet und im Nachgang mit Hilfe des *ECG analysis tool* (ADInstruments) ausgewertet. Hierzu wurde ein artefaktfreier, einminütiger Zeitpunkt zu Beginn der EPU mindestens fünf Minuten nach Narkoseeinleitung gewählt (s. Abb. 5). 25 EKG-Ableitungen wurden gemittelt analysiert. Bewertet wurden PR-Intervall, P-Dauer, QRS-Dauer, QT-Intervall, QT_c, JT-Intervall, RR-Dauer und HF (s. Abb. 5). Das Ende der T-Welle wurde hierbei als Rückkehr zur isoelektrischen Linie definiert

(Schrickel et al., 2002). Die QT_c wurde nach Mitchell berechnet: $QT_c = QT_0 / (RR_0 / 100)^{1/2}$ (Mitchell et al., 1998).

Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Sowohl die Elektroden des Oberflächen-EKG als auch die intrakardialen Elektroden waren mit insgesamt sieben Inputs mit dem OctalBioAmp® verbunden. Zwei Inputs mit jeweils + und - Pol wurden für die Generierung des Oberflächen-EKG genutzt (Ableitungen I, II, III, aVR, aVL, aVF), drei weitere für die Ableitung der intrakardialen Signale.

Das PowerLab erhielt Signale aus dem OctalBioAmp® (EKG-Signale), T-Type Pod (Temperatur), Stimulusgenerator STG 4002 (Multi Channel Systems GmbH) (Stimulus-Signal). Die Aufzeichnung erfolgte an einem Computer, der über einen USB-Anschluss mit dem PowerLab (PowerLab, ADInstruments) verbunden war und so die übertragenen Daten mittels LabChart 8 (ADInstruments) in Echtzeit darstellen konnte.

Die *Sampling Rate* des Oberflächen-EKG und der intrakardialen Ableitungen betrug dabei 1k/s, die der intrakardialen Ableitungen 5-400 Hz und der Filter wurde auf 1-50 Hz gestellt (Berul, 2003). In Zusammenschau des Oberflächen-EKG und der intrakardialen Ableitungen konnten Arrhythmien sicher detektiert und bewertet werden.

Beim intrakardialen Katheter handelte es sich um einen Oktapolarkatheter (CIB'ER MOUSE™ Electrophysiology Catheter, NuMED Inc.), welcher speziell für EPU an Mäusen entwickelt wurde. Am Katheter befestigt waren acht Platin-Ringelektroden in einem Abstand und einer Breite von je 0,5mm, er hatte einen Durchmesser von 2,0 french. Durch die direkte Anordnung der Ringelektroden untereinander ergab sich bei korrekter Positionierung folgende Lage im Herzen:

- 1-4 rechts-ventrikuläre Lage
- 5-6 atrio-ventrikuläre Ebene
- 7-8 atriale Lage

Der Katheter hatte einerseits eine Schrittmacherfunktion (pacing), sodass er durch Verbindung des jeweiligen Ringelektrodenpaares mit dem Stimulusgenerator STG 4002 (Multi Channel Systems GmbH) gesteuert am Ort des jeweiligen Elektrodenpaares elektrische Reize setzen konnte. Andererseits besaß er auch eine Wahrnehmungsfunktion (sensing), über die mittels bipolarer Ableitung Arrhythmien detektiert werden konnten, was zur Beurteilung von Art, Ursprungsort und Erregungsausbreitung wichtig war.

2.5.3 Präparation der Maus

Die EPU wurde unter 1,6% Isofluran vermittelter Inhalationsnarkose durchgeführt (Induktionsphase 2,5 Vol.% in 70% N₂O / 30% O₂). Die Einleitung erfolgte in einer Narkosekammer. Während der Experimente fand eine konstante Überwachung der Herz- und Atemfrequenz, der neurologischen Reflexe und der Temperatur (T-type Pod ML 312; Rectal Sonde RET-3, ADInstruments) statt. Die Maus wurde nach Isofluran-Narkose auf dem 35-37°C warmen Operationstisch (Small Operating Table, BioScience) fixiert. Es folgte die rektale Einführung der Temperatursonde zur Kontrolle der Temperatur zwischen 35°-37°C, da hier mit dem geringsten Einfluss der Temperatur auf die HF zu rechnen ist. Anschließend folgte das Befestigen der Elektroden des Oberflächen-EKG (Clasen, 2018). Die Hypnose und Analgosedierung der Maus wurde mittels Inhalationsnarkose durch Isofluran aufrechterhalten.

Es folgte ein ovalförmiger Hautschnitt mit einer Länge von drei Millimetern in einem Dreieck zwischen Körpermedianlinie, Clavicula und rechtem Schulterrand der Maus.

Mittels zweier, stumpfer abgerundeter Pinzetten folgte ein atraumatisches Spreizen der Wunde und die Freilegung der *Vena jugularis interna* unter Sicht durch ein binokuläres Mikroskop (Leica MZ9.5 Stereomicroscope). Anschließend wurde das Gefäß mittels Seidenfäden (5/0 Seraflex®) einmal distal und zweimal proximal umschlungen. Kranial wurde eine Ligation der *Vena jugularis interna* angelegt.

Anschließend wurde mit einer feinen Präparierschere die *Vena jugularis interna* der Maus einseitig angeschnitten. Das entstandene Loch wurde mit einer spitzen Pinzette festgehalten und der Oktapolar-katheter (CIB'ER MOUSE™) durch jenes Loch eingeführt. Dies geschah ebenfalls unter Sicht mittels binokulären Mikroskops.

Danach wurde der Katheter vorsichtig in Richtung des rechten Ventrikels vorgeschoben. Aufgrund der möglichen Gefahr einer Gefäß- oder Organruptur sollte das Vorschieben des Katheters nur sehr vorsichtig und widerstandslos erfolgen. Mittels *sensing*-Funktion des Katheters konnte die korrekte Positionierung des Katheters im rechten Ventrikel bestätigt werden. Bei korrekter Lage waren in den Ableitungen 1-2 des Katheters charakteristische, breite Kammerkomplexe mit einer hohen Amplitude (5-10mV) messbar.

Nach korrekter Positionierung des Katheters erfolgte dessen Fixation im rechten Ventrikel durch Verschluss der vorab gelegten, proximal umschlungenen Seidenfäden.

Zur Initiation des Stimulationsprotokolls wurden nun die zu den Elektrodenringen 1-2 gehörigen Pins vom OctalBioAmp® mit dem Stimulationsgenerator verbunden. Der elektrische Stimulus wurde als rechteckiger Impuls mit einer Dauer von 1ms und doppelter Reizschwellenintensität programmiert.

Nach Beendigung der EPU wurden Oberflächen-EKG und intrakardiale Ableitungen mittels der Software LabChart® (ADInstruments, Version 8.1) ausgewertet.

Während der gesamten Prozedur wurden engmaschig Temperatur, HF, Atemfrequenz und Reflexe überprüft, um die Inhalationsnarkose zu steuern und um ein Erwachen oder Leiden der Versuchstiere zu vermeiden (Kohn et al., 2007).

2.5.4 Ventrikuläres Stimulationsprotokoll

Das ventrikuläre Stimulationsprogramm bestand aus Bestimmung der ventrikulären Reizschwelle, der ventrikulären Refraktärperiode (VRP) und der Testung der ventrikulären Vulnerabilität.

Reizschwelle:

Die Reizschwelle wurde definiert als geringste Reizstärke, die noch zu einer effektiven ventrikulären Stimulation führte. Zu Beginn erfolgte die Bestimmung der Reizschwelle. Hierzu wurden 30 Stimulationen in einem festgelegten Abstand (Sinuszykluslänge – 20ms) mit einer Stärke von initial 500mV abgegeben. Die Reizschwelle wurde auf 50mV genau bestimmt.

Alle folgenden Schritte wurden nun mit der doppelten Reizschwelle durchgeführt und anschließend wurde nach jedem Protokollschritt eine 10s Pause eingehalten.

Ventrikuläre Refraktärperiode (VRP)

Die VRP wurde definiert als geringste Zykluslänge zwischen zwei Stimulationen, die noch zu einer ventrikulären Stimulation führte. Die Bestimmung der VRP erfolgte standardisiert mittels programmierter elektrischer Stimulation, bestehend aus acht S1 Stimulationen mit fester Basiszykluslänge und einem S2 Extrastimulus (Clasen, 2012). Der S2-Stimulus wurde beginnend von 60ms um jeweils 2ms auf 20ms als Ankopplungszeit sukzessive verkürzt. Um eine Herzfrequenzunabhängigkeit der VRP von der Ankopplungszeit der S1 Stimulationen zu erreichen, wurde die Testung der VRP bei drei Basiszykluslängen 100, 90 und 80ms bestimmt.

Testung der ventrikulären Vulnerabilität

Die Testung der Vulnerabilität erfolgte durch drei verschiedene Stimulationsverfahren: die konventionelle programmierte elektrische Stimulation (PES), *Burst*-Stimulation und den in der Arbeitsgruppe entwickelten Miniburst (MB) (Berul et al., 1996, Clasen, 2018).

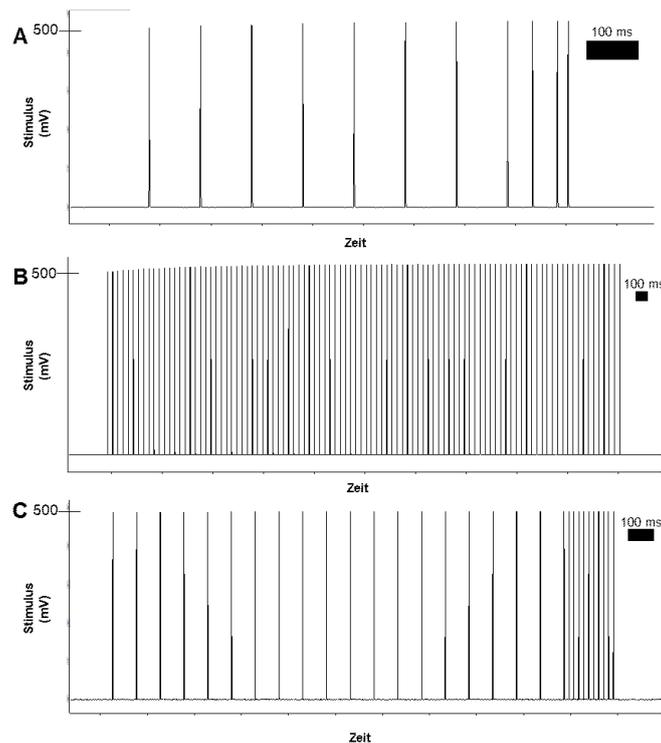


Abb. 8 Bestandteile des Stimulationsprotokolls

Gezeigt sind exemplarisch die drei verschiedenen Stimulationsprotokolle: PES (**A**), Burst (**B**), MB (**C**). Die Stimulation erfolgte in doppelter Reizschwellenintensität. Das PES-Stimulationsprotokoll bestand aus $8 \times S1 + 1 \times S2 - 4$ Stimulationen, das Burst-Protokoll bestand aus 20-100 S1 Stimulationen pro Sekunde und das MB-Protokoll aus $20 \times S1 + 1 \times S2 - 11$ Stimulationen.

PES=programmierte elektrische Stimulation, MB=Miniburst.

Die PES bestand aus acht S1 Stimulationen mit drei verschiedenen Zykluslängen 100, 90, 80 ms mit Ankopplung eines S2 Extrastimulus (s. VRP). Dabei wurde die Ankopplungszeit des S2 Stimulus von 60ms in dekrementalen Schritten um 2ms bis auf 20ms reduziert. Für die Extrastimulation bis S3 wurde der S2 Stimulus auf 20ms über der VRP programmiert. Es folgte der S3 Stimulus mit einer Ankopplungszeit von 60ms, der in dekrementalen Schritten um 2ms bis auf 20ms reduziert wurde. Für die Extrastimulation bis S4 wurden S2+S3 Stimulus auf 20ms über der VRP programmiert. Es folgte der S4 Stimulus mit einer Ankopplungszeit von 60ms, der in dekrementalen Schritten um 2ms bis auf 20ms reduziert wurde.

Das Stimulationsprogramm der programmierten Extrastimulation umfasste insgesamt 120 Stimulationseinheiten (SE):

40 SE für PES-S3 + PES-S4 mit S1 Ankopplungszeit= 100ms

40 SE für PES-S3 + PES-S4 mit S1 Ankopplungszeit= 90ms

40 SE für PES-S3 + PES-S4 mit S1 Ankopplungszeit= 80ms

Das *Burst*-Stimulationsprogramm bestand aus einem 5-Sekunden-*Burst*. Die Zeitangabe bezog sich dabei auf die gesamte Stimulationsdauer pro Stimulationseinheit (5s). Dabei reduzierte sich pro Stimulationseinheit das Stimulationsintervall von 50ms auf 10ms, sodass sich in einem 5-Sekunden-*Burst* initial 100 Stimulationen befanden, am Ende jedoch 500 Stimulationen waren. Das Dekrement zwischen den Stimulationsstufen betrug jeweils 10ms. Die *Burst*-Stimulationen bestanden also insgesamt aus 10 Stimulationseinheiten (10x 5-Sekunden-*Burst*).

Das MB-Stimulationsprogramm wurde innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt.

Es bestand aus 20 S1 Stimulationen mit einer festen Zykluslänge von 100ms. Darauf folgten drei und bis zu zehn Extrastimulationen mit jeweils fester Ankopplungszeit von 60ms. Die Ankopplung der Extrastimuli erfolgte in dekrementalen Schritten von 2ms pro Stimulationseinheit im Ankopplungsintervall 60-20 ms (S4-S11). Erreichte der dabei vorangehende Stimulationsabschnitt (z.B. 20x S1 + 1x S2 + 1x S3 + 1x S4, wobei S2-S4 jeweils mit derselben Ankopplungszeit) nach 20 dekrementalen Stimulationseinheiten 20ms als Ankopplungszeit, folgte anschließend der nächste Stimulationsabschnitt (in diesem Fall S5, 20x S1 + 1x S2 + 1x S3 + 1x S4 + 1xS5, wobei S2-S4 jeweils mit derselben Ankopplungszeit). Das MB-Stimulationsprotokoll besteht also aus 8 x 22 Stimulationseinheiten (insgesamt 176 Stimulationseinheiten). Es wurde nach jedem Protokollschritt eine 10s Pause eingehalten. Zwischen den einzelnen Stimulationseinheiten betrug die Pause mindestens 2s, um eine mögliche intrazelluläre Calcium-Akkumulation zu verhindern (Koller et al., 1995, Schrickel et al., 2007). Dies diente dazu, möglichen arrhythmogenen Effekten eines erhöhten Calciumspiegels vorzubeugen (Conti, 2006).

Die Stimulationsprotokolle wurden jeweils nach Isoproterenol-Gabe in verkürzter Form wiederholt. Damit sollte sichergestellt sein, dass die einzelnen Stimulationsschritte im wirksamen Zeitfenster von Isoproterenol stattfanden.

2.5.5 Analyse

Die Analyse der Daten erfolgte durch die Software Labchart 8 (ADInstruments) an einem Computer (Windows 10).

Die Bestimmung der ventrikulären Reizschwelle (s. 2.5.4) erfolgte während der Untersuchung, um die folgenden Stimulationsprotokolle (PES, *Burst*, MB) zu programmieren.

Die Charakterisierung der Arrhythmien erfolgte auf Grundlage der Lambeth-Kriterien: Ein ventrikulärer Komplex ohne vorangehenden Stimulus wurde als ventrikuläre Extrasystole, zwei Komplexe als *couplet*, drei Komplexe als *triplet* und mehr als drei Komplexe als VT

definiert, wobei die VT nach ihrer Dauer in kleiner oder größer eine Sekunde andauernd unterteilt wurde (s. Abb. 9) (Walker et al., 1988).

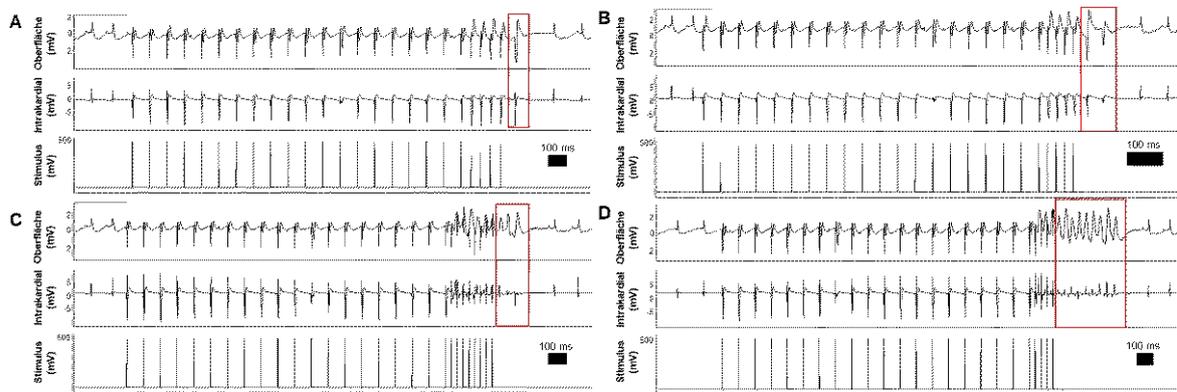


Abb. 9 Arrhythmieeinteilung nach Lambeth-Kriterien

Gezeigt sind die nach Lambeth-Kriterien unterschiedlichen Arrhythmien: PVC (A), couplet (B), triplet (C), VT (D). Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden dargestellt. Für jede Arrhythmie sind das Oberflächen-EKG (Oberfläche), das Intrakardiale-EKG (Intrakardial) sowie die Stimulation (Stimulus) dargestellt. Die jeweils induzierte VA ist mit einem roten Kasten markiert. Die Bestimmung der Arrhythmien erfolgte anhand des Oberflächen-EKGs und der intrakardialen Ableitungen.

PVC=premature ventricular complex, VT=ventrikuläre Tachykardie, VA=ventrikuläre Arrhythmie.

Als Kriterien für ein Kammerflimmern zur Abgrenzung der VT wurden eine nicht messbare Frequenz und eine sich von Schlag zu Schlag ändernde Morphologie herangezogen (Berul, 2003). Kammerflimmern konnte zu keiner Zeit im Rahmen dieses Projekts dokumentiert werden.

Zur Beurteilung der Arrhythmogenität wurden den verschiedenen Arrhythmieformen Punkte im Rahmen eines Scores zugewiesen. Hierzu wurde einmal der bereits etablierte Score nach van der Werf in für die Maus-EPU passender, abgewandelter Form (s. Tabelle 1) sowie der, in der Arbeitsgruppe entwickelte Arrhythmiescore nach Clasen verwendet, da diese zwischen höhergradigen Arrhythmien stärker differenziert (s. Tabelle 1) (Clasen, 2018, van der Werf et al., 2011).

Punkte pro Arrhythmie	Van der Werf	Clasen
PVC	1	1
Couplet	3	3
Triplet	4	4
VT <1s	4	5
VT >1s	4	6

Tabelle 1 Score-Bewertung ventrikulärer Arrhythmien

Die Beurteilung der nach Lambeth-Kriterien bestimmten induzierten VA erfolgte anhand des Van der Werf-Scores und des Clasen-Scores.

PVC=premature ventricular complex, VT=ventrikuläre Tachykardie, VA=ventrikuläre Arrhythmien, s= Sekunde.

In Voruntersuchungen zeigte sich, dass einzelne ventrikuläre Extrasystolen oder *premature ventricular complex* (PVC) die häufigste induzierbare Arrhythmieentität darstellen (Clasen, 2018, van der Werf et al., 2011). Daher wurden Arrhythmie-Scores verwendet, die anders als andere etablierte Scores (Faggioni) auch einfache Extrasystolen abbilden, diese aber im Vergleich zu höhergradigen Arrhythmien deutlich geringer bewerten (Faggioni et al., 2013).

Neben der quantitativen Arrhythmieauswertung erfolgte auch eine qualitativer Arrhythmievergleich. Es wurde die prozentuale VT-Induzierbarkeit der jeweiligen Gruppen bestimmt, sowie die VT-Dauer (kumulativ und durchschnittlich), VT-Zykluslänge und VT-Ankopplungszeit. Die VT-Ankopplungszeit wurde definiert als Intervall (in ms) zwischen dem VT auslösenden Stimulus und dem ihm vorausgegangenem Stimulus.

2.6 Histologische Infarktplanimetrie

2.6.1 Material

2.6.1.1 Geräte

- Einbettungssystem HistoCore Arcadia H+C, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, Wetzlar, DE-35578
- Mikrotom Jung Leica 2035 Biocut Rotary Microtome, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, Wetzlar, DE-35578

- Entwässerungsautomat Thermo Scientific™ STP 120 Gewebeeinbettautomat, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA (USA)
- Histologieprobenbad Leica HI1210 Water bath for paraffin sections, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, Wetzlar, DE-35578

2.6.1.2 Computer und Software

- Acer Aspire V13 Windows 10
- DELL™ Optiplex 755 Windows Vista
- Histologieauswertungsprogramm DISKUS® Mikroskopische Diskussion 4.80.8342, Technisches Büro Hilgers, Hauptstrasse 82 DE-53639 Königswinter
- Statistikprogramm GraphPad Software, Inc., GraphPad Prism 6.01.
- Textverarbeitung Microsoft Office 2017, Microsoft Office 2016

2.6.1.3 Instrumente und Verbrauchsmaterialien

- Anilinblau Sigma-Aldrich Corp. St. Louis (USA)
- Bouin´s solution Sigma-Aldrich Corp. St. Louis (USA)
- Chromotrope 2R Sigma-Aldrich Corp. St. Louis (USA)
- Essigsäure Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, DE-76185 Karlsruhe
- Formalaldehyd 10% Merck KGaA, Frankfurter Straße 250 Darmstadt, DE-64293
- Invitro Clud R. Langenbrinck GmbH – Labortechnik Medizintechnik, Im Hausgrün 13, DE-79312 Emmendingen
- Isopropanol VWR International LLC, Radnor (USA)
- Mikrotom-Klingen FEATHER® S22 Microtome Blades, pfm medical UK Ltd, Suite 3, Armcon Business Park, London Road South, Poynton, UK
- PBS Pufferlösung Sigma-Aldrich Corp. St. Louis (USA)
- Paraffin Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, DE-76185 Karlsruhe
- Phosphorwolframsäure Merck KGaA, Frankfurter Straße 250

	Darmstadt, DE-64293
▪Präparationsbesteck	Feinspitzige Pinzette, Mikroschere
▪Weiche Tücher	Tapira, GVS Großverbrauchsspezialisten eG, Heidenheim
▪Weigerts A+B	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis (USA)
▪Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, DE-76185 Karlsruhe

2.6.2 Vorgehen

Nach Entnahme wurden die Herzen über 1d in Formalaldehyd 10% fixiert und dann in PBS Pufferlösung überführt. Dann wurden sie über Nacht automatisiert entwässert und anschließend mittels Einbettungssystem in Paraffin, mit dem Herzapex nach unten zeigend eingebettet. Nach Aushärtung des Paraffins wurden sie anschließend mit einem Mikrotom in 5µm dünne Schnittpräparate geschnitten. Die Schnitfführung wurde dabei horizontal beginnend am Herzapex bis nach kranial zur Herzklappenebene in insgesamt zehn verschiedenen Schnittebenen mit einer Schnittdicke von 5µm durchgeführt. Zwischen den Ebenen wurden 250µm verworfen.

Zur Darstellung der fibrotischen Infarkt Narbe erfolgte eine Gomoris-Trichrome-Färbung in leicht abgewandelter Art und Weise (s.u.) (Gomori, 1950).

Die Gomoris-Färbung eignet sich insbesondere für Muskelpräparate, wobei sich fibrotische Areale (Infarkt) und vitales Herzgewebe differenzieren lassen. Die farbliche Differenzierung zwischen vitalem Muskelgewebe und Fibrose wird durch Hinzunahme der *Bouin's Solution* verstärkt. Durch Zugabe von Hämatoxylin ließen sich die Zellkernbestandteile darstellen. Zur Entparaffinierung bzw. dem Auswaschen der Färbemittel erfolgte zu Beginn und am Ende der Färbung die Behandlung der Präparate mit Xylol und einer absteigenden bzw. aufsteigenden (s.u.) Alkoholreihe. Anschließend wurde das gefärbte Präparat durch *invitro clud* fixiert und haltbarer gemacht.

Gomoris-Trichrome-Färbungsprotokoll:

Ansetzen der Farblösung Gomoris:

- 0,6g Chromotrope 2R
- 0,3g Anilinblau (Methylenblau)
- 1,0ml Eisessig (Essigsäure)
- 0,8g Phosphorwolframsäure
- 100ml destilliertes Wasser

Protokoll:

- 2x 15 Minuten in Xylol
- Absteigende Alkoholreihe: 2x 5 Minuten 100% Isopropanol
1x 5 Minuten 96% Isopropanol
1x 5 Minuten 70% Isopropanol
1x 5 Minuten destilliertes Wasser
- 15 Minuten bei 58°C in *Bouin's Solution*
- 5 Minuten spülen unter fließendem entmineralisiertem Wasser
- 5 Minuten in Weigerts Eisen Hämatoxylin A+B (1:1)
- 5 Minuten spülen unter fließendem entmineralisiertem Wasser
- 25 Minuten in Gomoris Farblösung (s.o.)
- 2x 2 Minuten in 0,5% Essigsäure spülen
- aufsteigende Alkoholreihe: 1x 2 Minuten 70% Isopropanol
1x 2 Minuten 96% Isopropanol
2x 2 Minuten 100% Isopropanol
- 2x 5 Minuten in Xylol
- Eindeckeln in *Invitro clud*

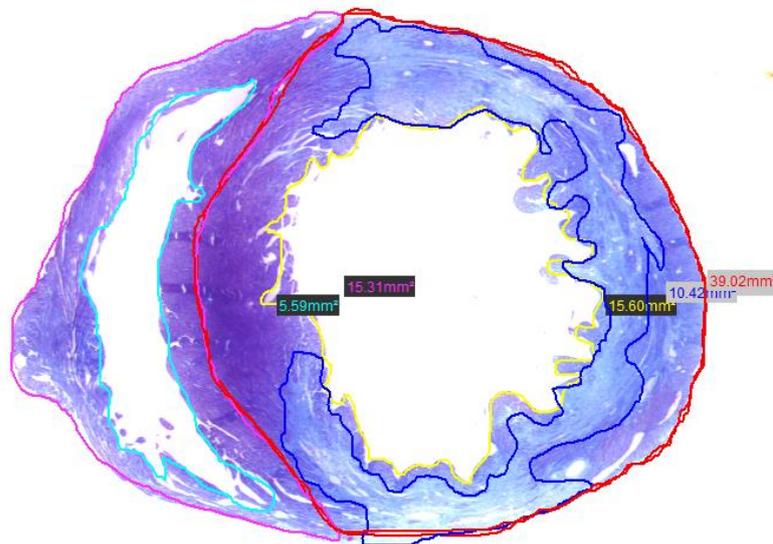


Abb. 10 Infarktgrößenbestimmung nach Gomoris-Trichrome-Färbung

Gezeigt ist ein axialer Querschnitt eines Herzens der IR-Gruppe. Markiert sind der linke Ventrikel (rot), fibrotischer Umbau des linken Ventrikels (blau), das Lumen des linken Ventrikels (gelb), der rechte Ventrikel (violett) und das Lumen des rechten Ventrikels (türkis). Nach computerbasierter Bestimmung der oben genannten Einzelgrößen erfolgte die prozentuale Infarktgrößenbestimmung mit folgender Formel: $\text{blau} / (\text{rot} - \text{gelb})$.

Die gefärbten Schnitte wurden fotografiert und die Infarktgrößen mittels eines Computerprogramms (DISKUS®) anhand folgender Formel ausgewertet:

Infarktgröße gemittelt aus jeder der zehn Schnittebenen (%):

Fibroseareal (blau) x 100 / (Fläche linker Ventrikel (rot) – Lumen linker Ventrikel (gelb))

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPadPrism® (La Jolla, USA) und IBM SPSS Statistics 25 (Armonk, USA). Unterschiede zwischen den drei Vergleichsgruppen wurden mittels ungepaarter, gepaarter t-Tests, einseitiger bzw. zweiseitiger ANOVA und linearer Regression berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte mit einfachem Standardfehler (SEM) angegeben. Die Tieranzahl betrug für die *Control*-Gruppe n=6, *Sham*-Gruppe n=8, IR-Gruppe n=7. Sowohl Tierzahl als auch statistisches Verfahren sind an der jeweiligen Stelle gekennzeichnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0.05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Tierhaltung und Vitalparameter

Insgesamt wurden die Experimente an 16 Mäusen durchgeführt (8 Sham, 8 Ischämie-Reperfusion (IR)), wovon 15 Mäuse die komplette Versuchsreihe durchliefen. Eine Maus verstarb unmittelbar nach der IR-Operation aufgrund von starkem Blutverlust.

Verhalten und Gewicht wurden vor der IR-Operation und täglich nach der Operation bestimmt. Postoperativ traten keine Verhaltensauffälligkeiten zwischen den Versuchsgruppen auf. Die durchschnittliche Temperatur betrug in der Sham-Gruppe $36,53\text{ °C} \pm 0,36\text{ °C}$ und $36,29\text{ °C} \pm 0,17\text{ °C}$ in der IR-Gruppe.

Die Wundheilung gestaltete sich bei allen Versuchstieren unauffällig. Es bestanden keine Temperaturunterschiede zwischen den Gruppen.

Das durchschnittliche Gewicht in der *Control*-Gruppe betrug $28,5\text{ g} \pm 2,3\text{ g}$, in der Sham-Gruppe $28,0\text{ g} \pm 2,2\text{ g}$ und in der IR-Gruppe $27,2\text{ g} \pm 1,2\text{ g}$, es bestanden keine Unterschiede zwischen IR-Gruppe und den beiden anderen Gruppen (*Control*: $p=0.47$, Sham: $p=0.72$, *one-way* ANOVA). Das durchschnittliche Herzgewicht betrug in der Sham-Gruppe $164,3\text{ g} \pm 11,34$ und $157,3 \pm 6,22$ in der IR-Gruppe. Es bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0.58$ ungepaarter t-Test).

3.2 Transthorakale Echokardiographie

In der transthorakalen Echokardiographie zeigten sich *baseline* keine Unterschiede bei der Herzfrequenz (HF) ($p > 0.999$) und der systolischen LV-Funktion ($p > 0.999$) zwischen den Gruppen (s. Abb. 11-12). Zum Zeitpunkt 1d (HF: $p < 0.001$, EF: $p < 0.001$, *two-way* ANOVA) zeigten sich in der IR-Gruppe eine höhere HF und eine niedrigere Ejektionsfraktion (EF) als in der Sham-Gruppe. Nach 2d und 7d war die EF in der IR-Gruppe weiterhin vermindert (2d: HF: $p=0.23$, EF: $p < 0.001$, *two-way* ANOVA 7d: $p < 0.001$, *two-way* ANOVA), wohingegen im Vergleich der HF kein Unterschied mehr bestand ($p > 0.83$, *two-way* ANOVA, s. Abb. 1112).

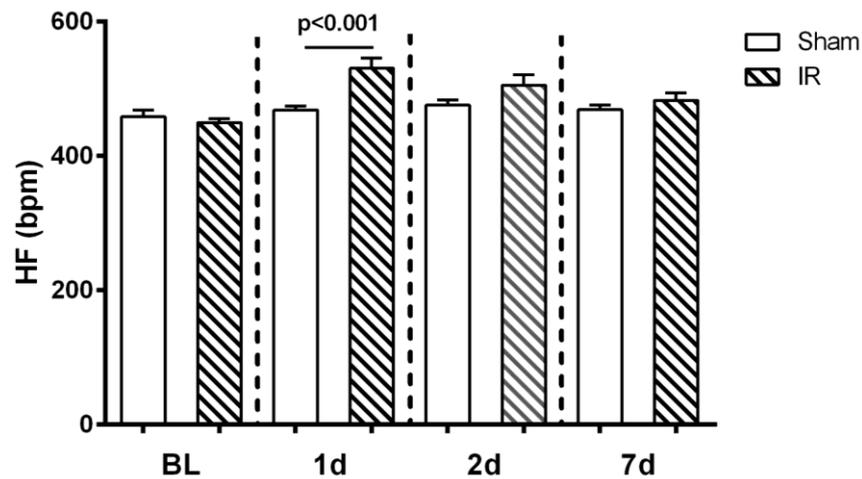


Abb. 11 Herzfrequenzen prä- und postoperativ in der Echokardiographie

Im Vergleich der Herzfrequenzen prä- und postoperativ zeigten sich nach 1d postoperativ höhere Herzfrequenzen in der IR-Gruppe. 2d und 7d postoperativ bestanden diese Unterschiede nicht mehr (2d: $p=0.23$; 7d: $p>0.999$, one-way ANOVA). Der Spiegelstrich zeigt den Vergleich zwischen den Subgruppen (Sham zu IR; jeweils two-way ANOVA). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Sham $n=8$, IR $n=7$. HF=Herzfrequenz, BL=baseline, IR=Ischämie/Reperfusion, bpm=beats per minute.

Herzleistung, Schlagvolumen, enddiastolisches- und endsystolisches Volumen zeigten in der *baseline*-Untersuchung (s. Tabelle 2) keine Unterschiede ($p>0.999$, gepaarte two-way ANOVA). 1d postoperativ zeigte sich in der IR-Gruppe eine verminderte Herzleistung ($p=0.004$), ein vermindertes Schlagvolumen ($p<0.001$), ein erhöhtes enddiastolisches- ($p<0.001$) und endsystolisches Volumen ($p<0.001$, jeweils two-way ANOVA). Die Unterschiede in Herzleistung, enddiastolischem- und endsystolischem Volumen bestanden auch zu den Zeitpunkten 2d und 7d fort (p -Werte s. Tabelle 2). Zum Zeitpunkt 7d zeigten sich keine Unterschiede zwischen Sham- und IR-Gruppe beim Vergleich des Schlagvolumens ($p>0.999$).

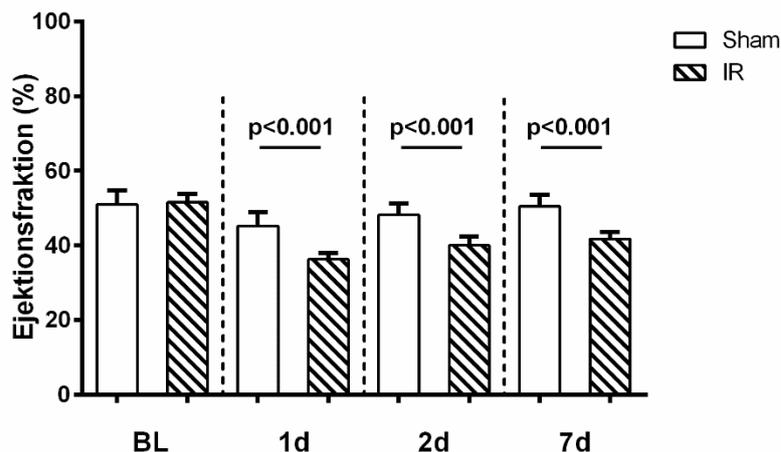


Abb. 12 Linksventrikuläre systolische Funktion in der Echokardiographie

Gezeigt ist die LV-Ejektionsfraktion (%) vor und nach IR-Operation in der Echokardiographie. Zwischen der Ejektionsfraktion der Sham- und IR-Gruppe bestand zur baseline-Untersuchung kein Unterschied ($p > 0.999$). Zum Zeitpunkt 1d, 2d, 7d nach Operation zeigte sich eine niedrigere Ejektionsfraktion in der IR- als in der Sham-Gruppe. Die Spiegelstriche zeigen den Vergleich zwischen den Gruppen (Sham zu IR; jeweils ungepaarte two-way ANOVA). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Sham $n=8$, IR $n=7$. BL=baseline, IR=Ischämie/Reperfusion.

	BL			1d			2d			7d		
	Sham (n=8)	IR (n=7)	p-Wert									
Ejektionsfraktion (%)	51,0 ± 1,2	51,6 ± 0,8	> 0,999	45,1 ± 1,3	36,3 ± 0,6	< 0,001	48,2 ± 1,1	40,0 ± 0,9	< 0,001	50,5 ± 1,0	41,7 ± 0,7	< 0,001
Fractional Shortening (%)	12,4 ± 1,2	12,3 ± 0,8	> 0,999	11,2 ± 0,8	7,5 ± 0,5	0,009	11,8 ± 0,6	8,1 ± 0,4	0,001	11,7 ± 0,6	8,2 ± 0,4	0,02
Herzzeitvolumen in $\mu\text{l}/\text{min}$	15,0 ± 0,8	14,5 ± 0,5	> 0,999	14,2 ± 0,4	11,0 ± 0,2	0,004	15,3 ± 0,6	11,6 ± 0,4	0,001	15,6 ± 0,5	11,5 ± 0,4	< 0,001
Schlagvolumen in μl	31,5 ± 1,4	31,0 ± 1,2	> 0,999	30,5 ± 1,8	20,7 ± 2,5	< 0,001	31,4 ± 2,1	22,5 ± 1,1	< 0,001	31,8 ± 1,8	23,9 ± 1,6	0,01
Endsystolisches Volumen in μl	32,0 ± 0,8	32,3 ± 0,8	> 0,999	38,4 ± 0,9	58,3 ± 1,4	< 0,001	35,9 ± 1,1	53,8 ± 1,1	< 0,001	33,4 ± 0,6	51,8 ± 0,8	< 0,001
Enddiastolisches Volumen in μl	63,4 ± 1,9	63,3 ± 1,9	> 0,999	68,2 ± 1,7	79,9 ± 2,1	0,01	67,3 ± 1,7	77,1 ± 1,8	< 0,001	66,1 ± 1,6	76,0 ± 1,8	0,001

Tabelle 2 Echokardiographische Parameter prä- und postoperativ

Im Vergleich der Parameter zur Bestimmung der systolischen LV-Funktion zeigten sich zu Beginn keine Unterschiede zwischen den Gruppen. 7d postoperativ zeigten sich eine geringere Ejektionsfraktion, ein geringeres Fractional Shortening, Schlagvolumen und Herzzeitvolumen und ein höheres endsystolisches Volumen und enddiastolisches Volumen in der IR-Gruppe. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt (jeweils two-way ANOVA). Sham $n=8$, IR $n=7$. IR=Ischämie/Reperfusion, BL=baseline,

3.3 Planimetrische Infarktgrößenbestimmung

Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte an insgesamt sieben Herzen der IR-Gruppe. Innerhalb der *Sham*-Gruppe zeigten sich in Kontrollherzen keine Infarktgebiete nach Gomoris-Färbung (s. Abb. 13). Planimetrisch konnte ein fibrotisches Infarktareal von 32 % ($\pm 1,5\%$) des linken Ventrikels bestimmt werden ($n=7$). Die Infarkte waren in jedem untersuchten Tier transmural entlang des linken Ventrikels. In der Sham-Gruppe zeigte sich zur Gegenkontrolle kein infarziertes Myokardgewebe.

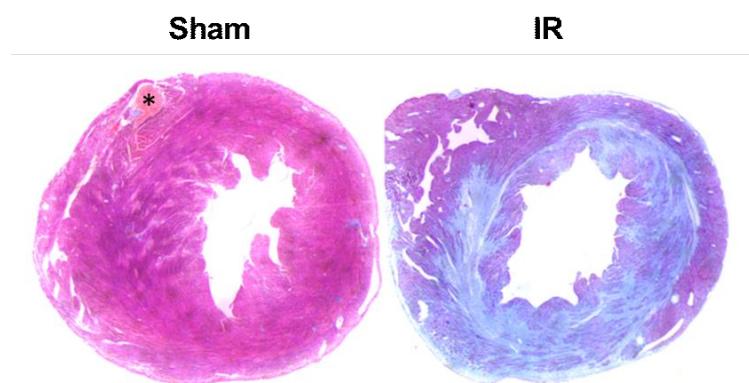


Abb. 13 Histologische Darstellung der postischämischen Fibrose

Beide Aufnahmen zeigen einen ventrikulären Horizontalschnitt nach Gomoris-Färbung. Links ist die Kontrollgruppe und rechts die IR-Gruppe dargestellt. Im Horizontalschnitt lässt sich der muskelstarke linke Ventrikel und der ihm (jeweils links) halbmondförmig anliegende rechte Ventrikel erkennen. Im Sham-Bild zeigt sich im rechten Ventrikel ein Blutkoagel (*). Die Differenzierung zwischen Fibrose und vitalem Gewebe erfolgt anhand der Farbe: Rot=intaktes Myocardium, blau=fibrös verändertes Myocardium. IR=Ischämie/Reperfusion.

3.4 Elektrophysiologische Charakterisierung

3.4.1 Oberflächen-EKG

Am siebten postoperativen Tag zeigten sich in der IR-Gruppe eine längere QRS-Dauer ($p<0.001$, ungepaarter t-Test), ein längeres QT-Intervall ($p<0.001$, ungepaarter t-Test) und QTc ($p=0.006$, ungepaarter t-Test) als in der Sham-Gruppe (s. Tabelle 3). Am Tag sieben postoperativ zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich der HF, des PR- und JT-Intervalls zwischen Sham- und IR-Gruppe (HF: $p=0.71$, PR-Intervall: $p=0.37$, JT-Intervall: $p=0.28$, jeweils ungepaarter t-Test).

<i>baseline</i>	Sham (n=8)	IR (n=7)	p-Wert
Herzfrequenz (bpm)	527,0 ± 55,4	534,5 ± 36,3	0.71
PR-Intervall (ms)	38,5 ± 2,3	36,7 ± 3,0	0.37
QRS-Dauer (ms)	11,1 ± 1,5	16,5 ± 3,0	<0.001
QT-Intervall (ms)	53,6 ± 6,8	65,6 ± 3,9	<0.001
QTc (ms)	48,1 ± 7,0	60,4 ± 2,3	0.006
JT-Intervall (ms)	47,4 ± 4,8	50,9 ± 7,2	0.28

Tabelle 3 Elektrophysiologische Charakteristika im Oberflächen-EKG

Im Oberflächen-EKG bestand in der IR-Gruppe ein verlängertes QTc und QT-Intervall und eine verlängerte QRS-Dauer im Vergleich zur Sham-Gruppe (jeweils ungepaarter t-Test). Die übrigen Parameter waren ohne Unterschied zwischen den Gruppen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Sham n=8, IR n=7. IR=Ischämie/Reperfusion, EPU=elektrophysiologische Untersuchung, bpm=beats per minute.

Eine Korrelationsanalyse zwischen QRS-Dauer bzw. QT-Intervall und induzierbarer VA zeigte keine Korrelation (QRS: $r=0.1$; $p=0.47$; $Y = -6,321 \cdot X + 234,0$, QT: $r=0.1$; $p=0.47$; $Y = 12,21 \cdot X - 593,3$; lineare Korrelationsanalyse)

3.4.2 Bestimmung der ventrikulären Reizschwelle und Refraktärperiode

Ventrikuläre Reizschwelle:

Die in der EPU bestimmten ventrikulären Reizschwellen lagen für die Sham-Gruppe bei $318,8 \text{ mV} \pm 194,5 \text{ mV}$ und die IR-Gruppe bei $414,3 \text{ mV} \pm 110,7 \text{ mV}$. Es bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0.48$, ungepaarter t-Test).

Ventrikuläre Refraktärperiode (VRP):

Es zeigten sich keine Unterschiede der bestimmten VRP in Abhängigkeit von den Basiszykluslängen 100ms, 90ms und 80ms innerhalb der Sham- bzw. IR-Gruppe (jeweils $p>0.999$, one-way ANOVA). Zwischen Sham- und IR-Gruppe bestand kein Unterschied ($p>0.999$, one-way ANOVA, s. Abb. 14).

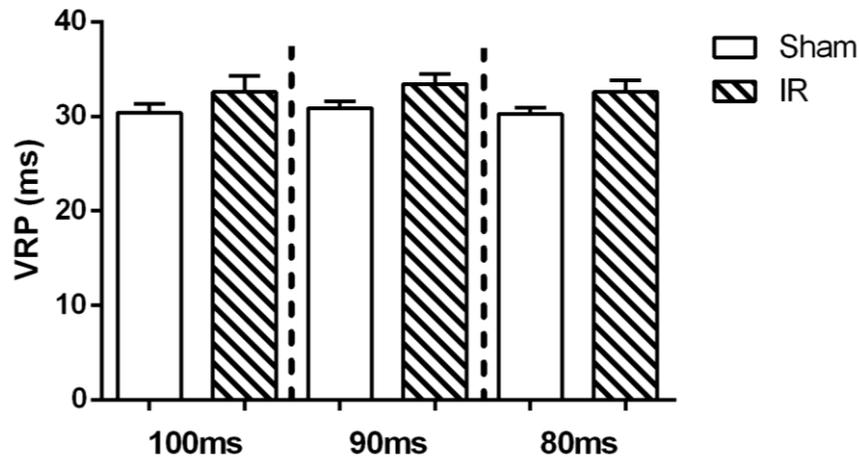


Abb. 14 Vergleich der ventrikulären Refraktärperioden

Die VRP wurde mittels programmierter Ventrikelstimulation mit einem Extrastimulus bei den drei Basiszykluslängen 100, 90 und 80ms getestet. Es zeigte sich keine Frequenzabhängigkeit der VRP ($p > 0.999$, one-way ANOVA). Zwischen Sham- und IR-Gruppe bestand kein Unterschied ($p > 0.999$, one-way ANOVA). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Sham $n=8$, IR $n=7$. VRP=ventrikuläre Refraktärperiode, IR=Ischämie/Reperfusion.

Bei der Untersuchung der induzierbaren VA (Score-Punkte) und der VRP 7d postoperativ zeigte sich in der IR-Gruppe keine lineare Korrelation ($r = -0,19$, $p = 0.68$, Korrelationsanalyse, s. Abb. 15).

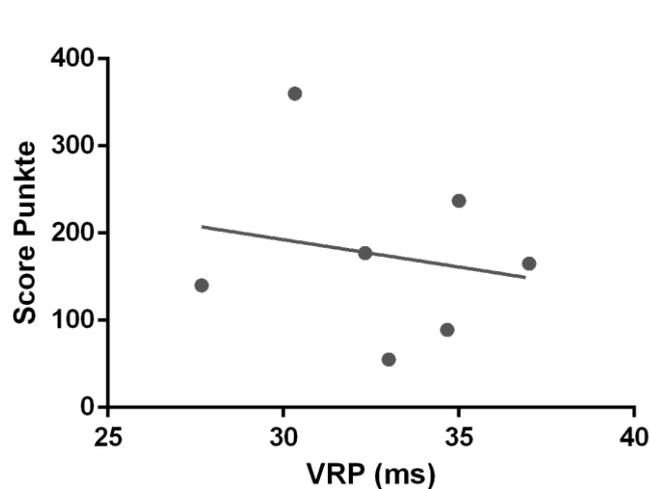


Abb. 15 Vergleich ventrikulärer Arrhythmien und der ventrikulären Refraktärperiode

Im Vergleich der induzierten ventrikulären Arrhythmien bewertet nach dem Arrhythmiescore nach Clasen et al. und der VRP 7d postoperativ zeigte sich keine Korrelation ($r = -0,19$, $p = 0.68$, $Y = -6,270 \cdot X + 380,7$, Korrelationsanalyse). IR=Ischämie/Reperfusion, VRP=ventrikuläre Refraktärperiode, EPU= elektrophysiologische Untersuchung.

3.4.3 Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mittels Isoproterenol

Unter Isoproterenol kam es zu einem Herzfrequenzanstieg sowohl innerhalb der Sham- als auch der IR-Gruppe. Neun Sekunden nach Isoproterenolgabe zeigte sich in allen Versuchstieren (n=15) ein Herzfrequenzanstieg. Weder vor ($p=0.45$, ungepaarter t-Test) noch nach ($p=0.53$, ungepaarter t-Test) Isoproterenolgabe bestand ein Unterschied in der HF zwischen den Gruppen. Der niedrigste und höchste Wert wurde in der Sham-Gruppe gemessen und betrug $554 \text{ bpm} \pm 17 \text{ bpm}$ (Zeitpunkt 1s) bzw. $604 \text{ bpm} \pm 17 \text{ bpm}$ (Zeitpunkt 25s, s. Abb. 16).

Die stärkste absolute Herzfrequenzsteigerung fand zwischen 5-20 Sekunden nach Isoproterenolgabe statt. In der Sham-Gruppe zeigte sich in diesem Zeitraum ein durchschnittlich stärkerer Anstieg pro Sekunde als in der IR-Gruppe ($6,21 \text{ bpm} \pm 1,48 \text{ bpm}$ vs. $0,64 \text{ bpm} \pm 1,27 \text{ bpm}$ n=7, $p=0.03$, ungepaarter t-Test).

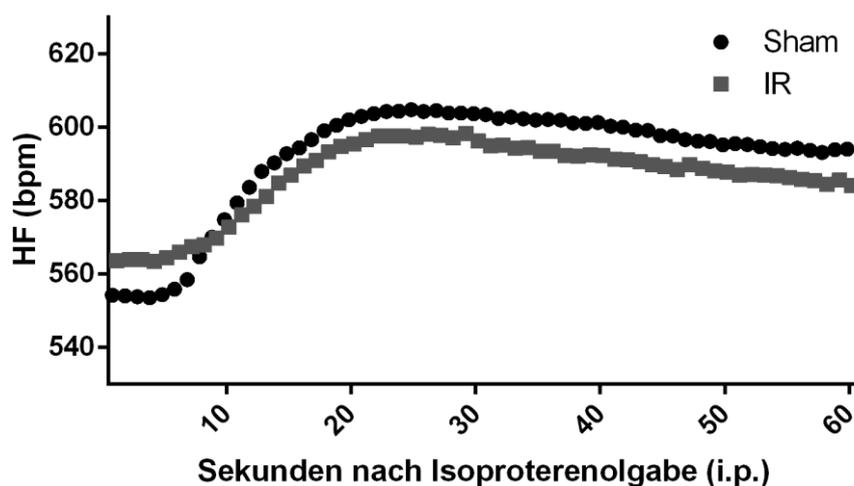


Abb. 16 Herzfrequenz nach Isoproterenolgabe

Im Vergleich der Herzfrequenzen nach Isoproterenolgabe war der niedrigste und höchste gemessene Wert jeweils in der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt 1s und 25s und betrug $554 \text{ bpm} \pm 17 \text{ bpm}$ bzw. $604 \text{ bpm} \pm 17 \text{ bpm}$. Weder vor noch nach Isoproterenolgabe bestand ein HF Unterschied zwischen IR- und Sham-Gruppe ($p=0.45$ bzw. $p=0.53$, jeweils ungepaarter t-Test). Der Anstieg in der Sham-Gruppe war steiler. Sham n=8, IR n=7. IR=Ischämie/Reperfusion, HF=Herzfrequenz, i.p.=intraperitoneal.

Es zeigten sich nach Isoproterenolgabe wie schon zuvor (s. Tabelle 2) ein verlängertes QT- ($p<0.001$) und QTc ($p=0.0066$) und eine verlängerte QRS-Dauer ($p<0.001$, jeweils one-way ANOVA, s. Tabelle 4). Nach Isoproterenolgabe kam es innerhalb der Sham- und innerhalb der IR-Gruppe zu einem tendenziell kürzeren QT- (Sham: $p=0.001$, IR: $p=0.06$) und JT- Intervall (Sham + IR: $p<0.001$, jeweils one-way ANOVA) als in der *baseline*-Untersuchung

ohne Isoproterenol. In der IR-Gruppe zeigte sich nach Isoproterenolgabe eine längere QRS-Dauer ($p < 0.001$, *one-way ANOVA*) als in der *baseline*-Untersuchung (s. Tabelle 4).

	Sham (n=8) BL	Sham (n=8) ISO	p-Werte	IR (n=7) BL	IR (n=7) ISO	p-Werte
HF (bpm)	527,0 ± 55,4	586,7 ± 6,6	0.02	534,5 ± 36,3	589,2 ± 11,7	0.02
PR- Intervall (ms)	38,5 ± 2,3	33,7 ± 4,4	0.12	36,7 ± 3,0	33,6 ± 4,9	0.83
QRS- Dauer (ms)	11,1 ± 1,5	12,9 ± 2,4	0.85	16,5 ± 3,0	22,5 ± 2,4	< 0.001
QT- Intervall (ms)	53,6 ± 6,8	39,5 ± 5,5	0.001	65,6 ± 3,9	55,4 ± 5,5	0.06
QTc (ms)	48,1 ± 7,0	41,3 ± 4,5	0.4	60,4 ± 2,3	55,5 ± 6,1	0.91
JT- Intervall (ms)	47,4 ± 4,8	25,4 ± 7,3	< 0.001	50,9 ± 7,2	34,2 ± 6,9	< 0.001

Tabelle 4 Elektrophysiologische Charakteristika nach Isoproterenolgabe

Es gab in der IR-Gruppe nach Isoproterenolgabe ein längeres QTc und QT-Intervall und eine längere QRS-Dauer als in der Sham-Gruppe (jeweils, *one-way ANOVA*). In Sham- und IR-Tieren kam es nach Isoproterenol zu einem kürzeren QT- und JT-Intervall. In der IR-Gruppe zeigte sich nach Isoproterenolgabe eine verlängerte QRS-Dauer. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Sham $n=8$, IR $n=7$. IR=Ischämie/Reperfusion, EPU=elektrophysiologische Untersuchung, HF= Herzfrequenz i.p.=intraperitoneal.

Nach Isoproterenolgabe lag die VRP in der Sham-Gruppe bei $32,5 \text{ ms} \pm 1,11 \text{ ms}$ ($n=8$) und in der IR-Gruppe bei $33 \text{ ms} \pm 1,03 \text{ ms}$ ($n=6$). Die bestimmte VRP nach Isoproterenolgabe zeigte keinen Unterschied innerhalb der Sham- bzw. IR-Gruppe im Vergleich zur *baseline*-Untersuchung (Sham: $p=0.38$, IR: $p>0.999$, *one-way ANOVA*,). Zwischen Sham- und IR-Gruppe bestand nach Isoproterenolgabe kein Unterschied ($p=0.987$, *one-way ANOVA*).

Nach Isoprenalingabe ließen sich mit keinem der Stimulationsprotokolle in Sham oder IR-Tieren mehr Punkte pro Stimulationseinheit erzeugen als zuvor (Sham: PES $0,05 \pm 0,06$, Burst $0,12 \pm 0,16$, MB-S11 $0,03 \pm 0,02$; p-Werte: PES $p>0.999$, Burst $p>0.999$, MB-S11 $p>0.999$, IR: PES $0,11 \pm 0,09$, Burst $0,70 \pm 0,83$, MB-S11 $0,53 \pm 0,48$; p-Werte: PES $p>0.999$, Burst $p>0.999$, MB-S11 $p>0.999$ alles jeweils *two-way ANOVA*). Nach Isoprenalingabe zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Stimulationsprotokollen in der IR-Gruppe (PES:Burst $p=0.56$, PES:MB-S11 $p>0.999$, Burst:MB-S11 $p>0.999$).

3.5 Ventrikuläre Vulnerabilität in der elektrophysiologischen Untersuchung

3.5.1 Untersuchungsbedingungen

Während der EPU erfolgten zur Sicherstellung identischer Rahmenbedingungen eine Temperaturkontrolle, die Erfassung der EPU-Dauer insgesamt (min) sowie die Dauer des Stimulationsprotokolls (min) (s. Tabelle 5). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Sham- und IR-Gruppe in Bezug auf Körpergewicht ($p=0.41$), Herzgewicht ($p=0.58$), Dauer der EPU ($p=0.95$), Dauer des Stimulationsprotokolls ($p=0.40$) und Körpertemperatur ($p=0.33$, jeweils ungepaarter t-Test).

	Sham (n=8)	IR (n=7)	p-Wert
Dauer EPU insgesamt (min)	101,8 ± 14,44	101,1 ± 21,84	0.95
Dauer EPU Stimulation (min)	74,67 ± 13,02	67,57 ± 15,77	0.40
Temperatur (°C)	36,53 ± 0,36	36,29 ± 0,17	0.52

Tabelle 5 Periinterventionelle Parameter der elektrophysiologischen Untersuchung

In Bezug auf EPU Dauer und Temperatur bestanden keine Unterschiede zwischen IR- und Sham-Gruppe. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Jeweils ungepaarter t-Test. Sham n=8, IR n=7. IR=Ischämie/Reperfusion, EPU=elektrophysiologische Untersuchung.

3.5.2 Quantitative Arrhythmieanalyse

In jedem untersuchten Tier (6/6 Control, 8/8 Sham, 7/7 IR) ließ sich mindestens eine VA induzieren. Auch in der IR-Gruppe bestätigte sich, dass vor allem PVC induzierbar waren ($33,29 \pm 11,4$), aber auch die Zahl kurzer VT ($VT < 1s$) war mit $16,29 \pm 5,7$ erhöht. In der IR-Gruppe bestanden mehr PVC ($p < 0.001$, one-way ANOVA) und $VT < 1s$ als in der Sham-Gruppe ($p=0.04$, one-way ANOVA).

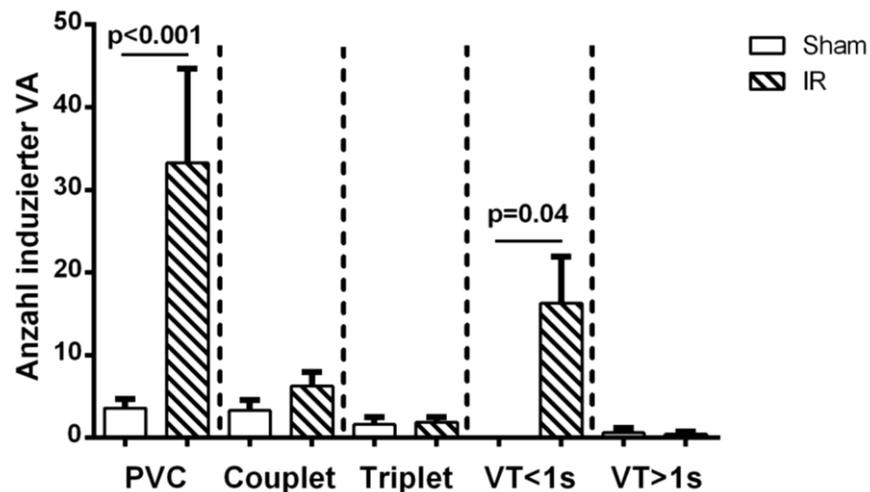


Abb. 17 Anzahl induzierbarer ventrikulärer Arrhythmien in der EPU

Die IR-Gruppe wies mehr PVC und induzierte VT<1s ($p<0.001$ bzw. $p=0.04$, one-way ANOVA) auf als die Sham-Gruppe. Innerhalb der IR-Gruppe zeigten sich tendenziell mehr PVC als VT<1s ($p=0.055$, one-way ANOVA). Sham $n=8$, IR $n=7$. Die Spiegelstriche zeigen den Vergleich zwischen den Gruppen (Sham zu IR). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. EPU=elektrophysiologische Untersuchung, IR=Ischämie/Reperfusion, PVC=premature ventricular complex, VT=ventrikuläre Tachykardie.

Im Vergleich innerhalb der IR-Gruppe zeigten sich keine quantitativen Unterschiede zwischen PVC und Couplet, Triplet, VT<1s oder VT>1s (PVC:Couplet $p=0.26$, PVC:Triplet $p=0.17$, PVC:VT<1s $p=0.72$, PVC:VT>1s $p=0.13$, one-way ANOVA).

Nach Gewichtung der induzierten VA (Lambeth-Kriterien) anhand des van der Werf- und Clasen-Scores zeigten sich in der IR- höhere Score-Punkte als in der Sham-Gruppe (jeweils $p<0.001$, one-way ANOVA). In sechs der sieben untersuchten IR-Mäuse ließen sich Score-Punkte von mindestens 72 (van der Werf) bzw. 89 (Clasen) berechnen. Nur eine Maus zeigte in beiden Scores weniger als 30 Punkte.

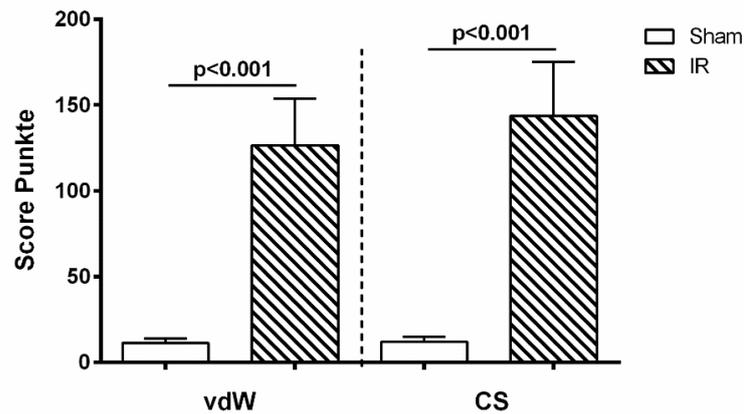


Abb. 18 Induzierte ventrikuläre Arrhythmien nach Score-Punkten

Nach den Lambeth-Kriterien ließen sich in der IR-Gruppe vergleichen mit der Sham-Gruppe nach beiden Scores die meisten Arrhythmien induzieren ($p < 0.001$, one-way ANOVA). Sechs der sieben untersuchten IR-Tiere wiesen dabei mindestens 89 (Clasen) bzw. 72 Punkte (van der Werf) auf. Die Spiegelstriche zeigen den Vergleich zwischen den Subgruppen (Sham zu IR). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Sham $n=8$, IR $n=7$. IR= Ischämie/Reperfusion, CS=Clasen-Score, vdW=van der Werf-Score.

3.5.3 Qualitative Arrhythmieanalyse der ventrikulären Tachykardien (VT)

Aufgrund der beim Menschen prognostischen Bedeutung VT erfolgte eine genauere Betrachtung der induzierten VT. Es wurde die prozentuale VT-Induzierbarkeit innerhalb der Sham- bzw. IR-Gruppe, die VT-Ankopplungszeit, die VT-Dauer und die VT-Zykluslänge charakterisiert.

In der IR-Gruppe ließ sich in sechs von sieben Tieren mindestens eine VT auslösen, in der Sham-Gruppe ließen sich lediglich bei zwei von acht Tieren VT auslösen ($p=0.04$, ungepaarter t-Test) (Abb.9).

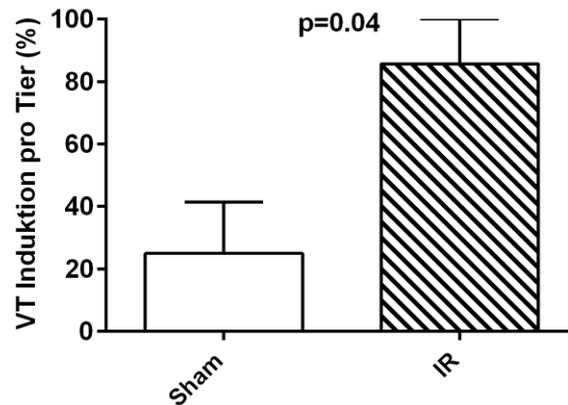


Abb. 19 Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien

In der IR-Gruppe ließen sich VT in mehr Tieren auslösen als in der Sham-Gruppe ($p=0.04$, ungepaarter t -Test). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Sham $n=8$, IR $n=7$. IR=Ischämie/Reperfusion, VT=ventrikuläre Tachykardie.

In Sham-Mäusen ließen sich insgesamt 17 VT auslösen, in IR-Mäusen 70 VT. Alle induzierten VT waren selbstlimitierend. Bereits bei längerer Ankopplungszeit konnte in der IR-Gruppe eine VT induziert werden. Die Ankopplungszeit zur Induzierbarkeit einer VT lag in der IR-Gruppe bei $36,0 \text{ ms} \pm 0,74 \text{ ms}$ und damit höher als in der Sham-Gruppe ($30,47 \text{ ms} \pm 1,5 \text{ ms}$, $p=0.002$, ungepaarter t -Test). Es bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen bei der Dauer der VT (Abb.10 B) (Sham: $455,1 \text{ ms} \pm 21,2 \text{ ms}$ $n=17$, IR: $455,6 \text{ ms} \pm 34,9 \text{ ms}$ $n=70$, $p=0.5$ ungepaarter t -Test). Im Vergleich der VT-Zykluslängen bestand ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen (Sham: $40,54 \text{ ms} \pm 0,42 \text{ ms}$ $n=17$, IR: $43,25 \text{ ms} \pm 0,98 \text{ ms}$ $n=70$, $p=0.12$ ungepaarter t -Test).

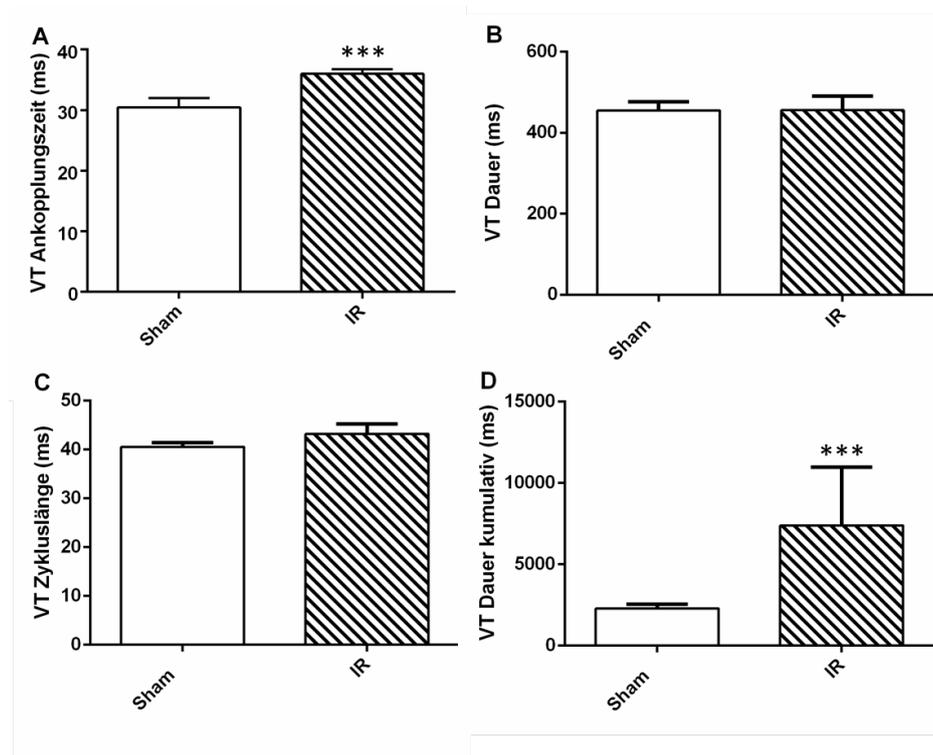


Abb. 20 Qualitativer Vergleich der induzierten ventrikulären Tachykardien

Die Ankopplungszeit der IR-Tiere lag unterhalb der Sham-Tiere ($p=0.002$). (A) Zwischen Sham- und IR-Gruppe bestand dabei kein Unterschied in der durchschnittlichen VT-Dauer ($p=0.5$). (B) Im Vergleich der VT-Zykluslängen bestand zwischen Sham- und IR-Gruppe kein Unterschied ($p=0.12$). (C) Kumulativ zeigten sich eine längere VT-Dauer in der IR-Gruppe ($p=0.007$) (jeweils ungepaarter *t*-Test). (D) Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. *** = $p<0.001$. Sham $n=8$, IR $n=7$. VT=ventrikuläre Tachykardie, IR=Ischämie/Reperfusion, PES=programmierte elektrische Stimulation.

3.5.4 Vergleich der ventrikulären Stimulationsprotokolle

Die untersuchten Mäuse des C57Bl/6J-Stammes zeigten im konventionellen Stimulationsprotokoll der PES keine Unterschiede zwischen S2, S3 und S4 ($p>0.999$, *one-way ANOVA*). Weder im PES- noch im *Burst*-Protokoll zeigten sich frequenzabhängige Unterschiede (jeweils $p>0.999$, *one-way ANOVA*).

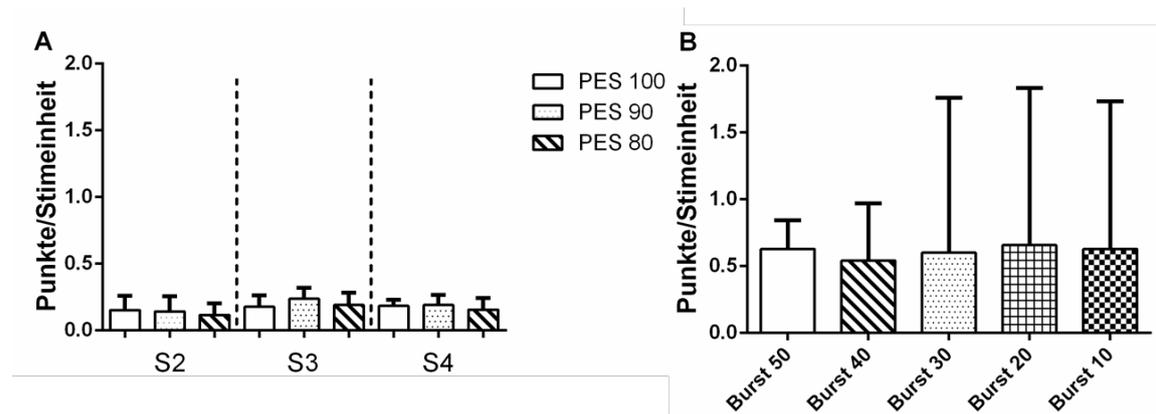


Abb. 21 Ventrikuläre Arrhythmieinduktion mittels herkömmlicher Stimulationsprotokolle

Es zeigten sich in IR-Tieren im PES-Programm keine Unterschiede zwischen der Anzahl angekoppelter Extrastimuli innerhalb der IR-Gruppe ($p > 0.999$, one-way ANOVA). (A)

Im Burst-Programm zeigte sich in IR-Tieren keine Frequenzabhängigkeit der induzierbaren VA innerhalb der IR-Gruppe ($p > 0.999$, one-way ANOVA). (B) Die VA wurden nach Clasen et al. bewertet. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. $n = 7$. IR=Ischämie/Reperfusion, PES=programmierte elektrische Stimulation, VA=ventrikuläre Arrhythmie Stimeinheit=Stimulationseinheit.

Es folgte ein quantitativer und qualitativer Vergleich der Stimulationsprotokolle (PES, Burst, Miniburst (MB)), einerseits innerhalb der IR-Gruppe zwischen den Stimulationsprotokollen, andererseits zwischen Sham- und IR-Gruppen innerhalb desselben Stimulationsprotokolls. Im MB-Protokoll (S8-11) zeigten sich in IR-Tieren mehr Arrhythmien als in dem PES S3+S4 Protokoll ($p = 0.01$, one-way ANOVA). Innerhalb der IR-Tiere ergaben sich im Vergleich von PES- und Burst-Protokoll keine Unterschiede ($p = 0.57$, one-way ANOVA). Das gesamte MB-Protokoll (S4-7, S8-11) induzierte als einziges Protokoll in der IR- mehr VA als in der Sham-Gruppe (one-way ANOVA, $p < 0.001$). Zwischen Sham- und IR-Gruppe bestanden im Burst-Stimulationsprotokoll keine Unterschiede ($p = 0.12$, one-way ANOVA) (s. Abb.22). Innerhalb der IR-Gruppe zeigten sich beim Vergleich zwischen MB S4-7 und MB-S8-11 keine Unterschiede ($p = 0.75$).

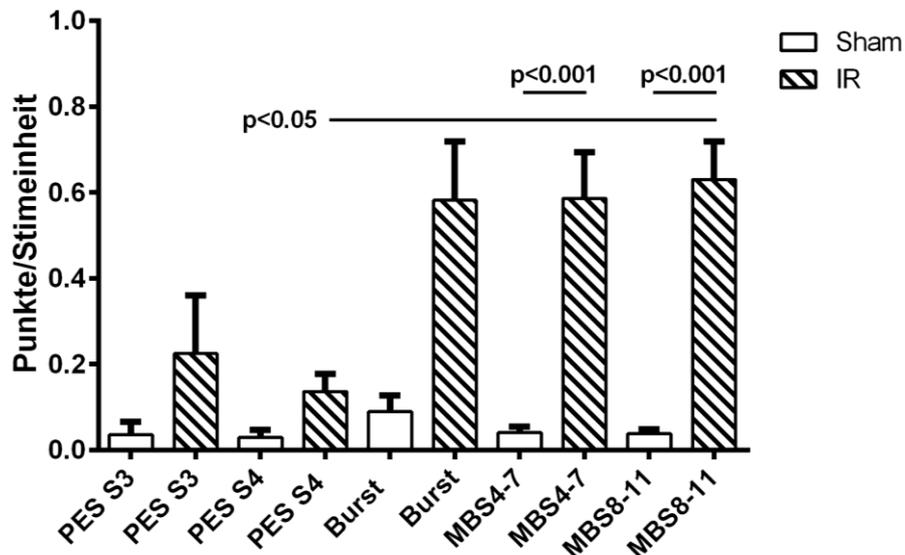


Abb. 22 Arrhythmieinduktion im Vergleich der verschiedenen Stimulationsprotokolle

Der MB induzierte als einziges Stimulationsprogramm mehr Arrhythmien in IR- als in Sham-Tieren ($p < 0.001$). Innerhalb der IR-Tiere zeigten sich mehr Arrhythmien mit dem MB S8-11- als mit dem PES S3+S4-Protokoll ($p = 0.01$, one-way ANOVA). Die Spiegelstriche zeigen den Vergleich zwischen den Subgruppen (Sham zu IR). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. IR $n = 7$. IR=Ischämie/Reperfusion, MB=Miniburst, PES=programmierte elektrische Stimulation, Stimeinheit=Stimulationseinheit.

Aufgrund des ähnlichen Aufbaus des PES- und MB-Stimulationsprotokolls erfolgte im Folgenden ein Vergleich der MB-Einzelschritte mit dem PES-Protokoll sowie des MB-Protokolls untereinander.

Ab MB-S5 aufsteigend (mit Ausnahme MB-S10) zeigten sich mehr induzierbare VA als mit dem herkömmlichen PES-Protokoll (p-Werte PES S3 im Vergleich zu: MB-S4 $p = 0.31$, MB-S5 $p = 0.15$, MB-S6 $p = 0.04$, MB-S7 $p = 0.04$, MB-S8 $p = 0.03$, MB-S9 $p = 0.04$, MB-S10 $p = 0.14$, MB-S11 $p = 0.01$; PES S4 im Vergleich zu: MB-S4 $p = 0.21$, MB-S5 $p = 0.06$, MB-S6 $p = 0.03$, MB-S7 $p = 0.03$, MB-S8 $p = 0.01$, MB-S9 $p = 0.04$, MB-S10 $p = 0.09$, MB-S11 $p = 0.02$). Zwischen den einzelnen MB-Schritten bestanden keine Unterschiede (s. Abb.23).

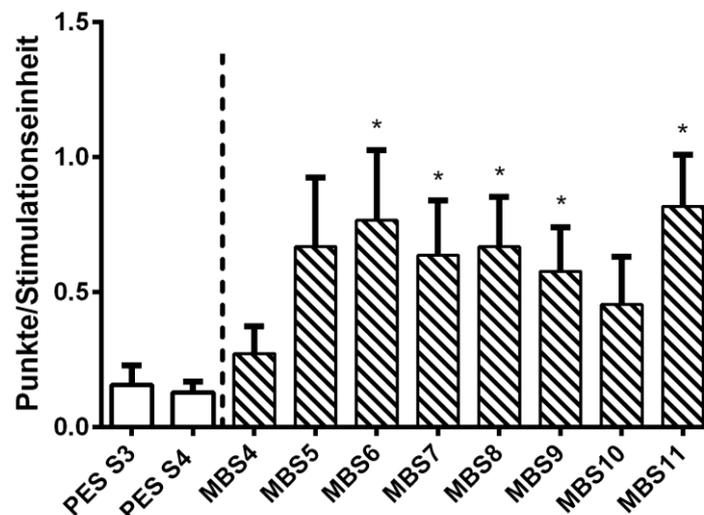


Abb. 23 Arrhythmieinduktion mittels Miniburst und PES-Protokoll

Im MB-Stimulationsprotokoll zeigten sich ab MBS5 mehr induzierbare Arrhythmien bewertet mit dem Arrhythmiescore nach Clasen et al. als im PES-Protokoll (PES S3: MB-S4 $p=0.31$, MB-S5 $p=0.15$, MB-S6 $p=0.04$, MB-S7 $p=0.04$, MB-S8 $p=0.03$, MB-S9 $p=0.04$, MB-S10 $p=0.14$, MB-S11 $p=0.01$; PES S4: MB-S4 $p=0.21$, MB-S5 $p=0.06$, MB-S6 $p=0.03$, MB-S7 $p=0.03$, MB-S8 $p=0.01$, MB-S9 $p=0.04$, MB-S10 $p=0.09$, MB-S11 $p=0.02$, one-way ANOVA). Innerhalb der einzelnen MB-Teilschritte bestand kein Unterschied zu MB-S4. * $p<0.05$. IR $n=7$. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. PES=programmierte elektrische Stimulation, MB=Miniburst, IR=Ischämie/Reperfusion.

Im Folgenden wurde die Induzierbarkeit VT der Stimulationsprotokolle PES, *Burst* und MB zwischen *Sham*- und IR-Gruppe verglichen.

Die relative Induzierbarkeit von VT war im MB-Protokoll in der IR-Gruppe tendenziell höher als in der *Sham*-Gruppe ($p=0.09$, one-way ANOVA). Mit MB-Protokoll ließen sich in der IR-Gruppe in mehr Tieren VT auslösen als mit PES-Protokoll ($p=0.02$, one-way ANOVA). Im *Burst*-Protokoll bestanden zwischen *Sham*- und IR-Gruppe keine Unterschiede in der prozentualen VT-Induktion ($p>0.999$, one-way ANOVA). Zwischen *Burst*- und PES-S4-Protokoll gab es keine Unterschiede in der IR-Gruppe in der prozentualen VT-Induzierbarkeit ($p=0.36$, one-way ANOVA). Im Vergleich innerhalb des *Burst*-Stimulationsprotokolls gab es ebenfalls keine Unterschiede zwischen *Sham*- und IR-Gruppe ($p=0.83$, one-way ANOVA) (Abb.24).

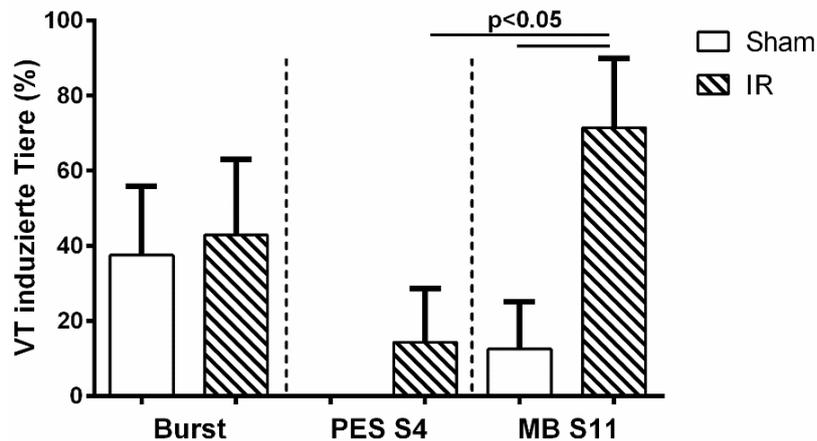


Abb. 24 Induktion ventrikulärer Tachykardien mittels Stimulationsprotokolls

Die VT-Induzierbarkeit zeigte sich vergleichsweise am besten mit dem MB Protokoll im Vergleich zwischen Sham- und IR-Gruppe ($p=0.09$). Innerhalb der IR-Gruppe zeigten sich mit MB-Protokoll in mehr Tieren VT als mit PES-Protokoll ($p=0.02$, jeweils *one-way ANOVA*). Die Spiegelstriche zeigen den Vergleich zwischen den Subgruppen (Sham zu IR). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. Sham $n=8$, IR $n=7$. VT=ventrikuläre Tachykardie, PES=programmierte elektrische Stimulation, MB=Miniburst, IR=Ischämie/Reperfusion.

3.5.5 Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mittels Isoproterenol

In allen untersuchten Tieren ließ sich vor und nach Isoproterenolgabe mindestens eine VA induzieren (6/6 Control, 8/8 Sham und 7/7 IR). Nach Isoproterenolgabe bestanden weder in der Sham- noch in der IR-Gruppe quantitativ mehr Arrhythmien pro Stimulationseinheit als vorher (Sham: $p>0.999$, IR: $p=0.92$, jeweils *one-way ANOVA*).

Weder in der Sham- (0 %) noch in der IR-Gruppe ($42,86\% \pm 20,2$) fanden sich Unterschiede in der Induzierbarkeit von VT vor und nach Isoproterenolgabe (Sham: $p=0.59$, IR: $p=0.2$, jeweils *one-way ANOVA*) (s. Abb. 26).

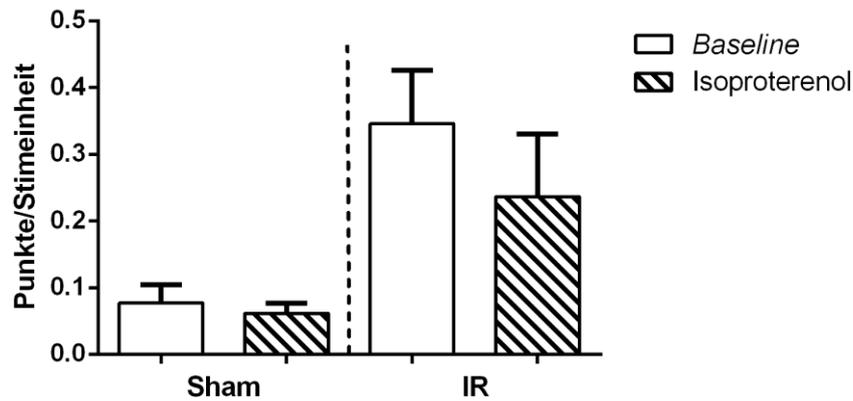


Abb. 25 Arrhythmieinduktion vor und nach Isoproterenolgabe

Gezeigt sind die induzierten Clasen-Score-Punkte pro Stimulationseinheit vor und nach Isoproterenolgabe jeweils in der Sham- und IR-Gruppe. In keiner der Vergleichsgruppen bestand nach Isoproterenol ein Unterschied zu den Werten zuvor (Sham $p > 0.999$, IR $p = 0.92$). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. CS=Clasen-Score, IR=Ischämie/Reperfusion, ISO=Isoproterenol i.p.=intraperitoneal.

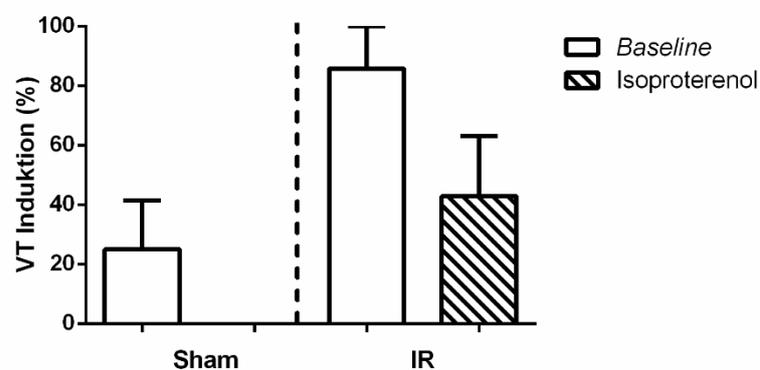


Abb. 26 Prozentuale Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien nach Isoproterenolgabe

Nach Isoproterenolgabe ließ sich in keiner Sham-Maus (0/8) und in drei IR-Mäusen eine VT induzieren (3/7). Dabei bestand weder in der Sham- noch in der IR-Gruppe ein Unterschied durch die Isoproterenolgabe (Sham: $p = 0.59$, one-way ANOVA, IR: $p = 0.2$, one-way ANOVA). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. IR=Ischämie/Reperfusion, VT=ventrikuläre Tachykardie, i.p.=intraperitoneal.

3.6 Korrelation funktionell-struktureller Parameter und der Arrhythmogenität

3.6.1 Korrelation zwischen Ejektionsfraktion und ventrikulärer Arrhythmien

Es folgte eine Korrelationsanalyse zwischen induzierten VA (nach Clasen-Score) 7d postoperativ und der ermittelten EF (%) ebenfalls nach 7d. Weder in der Sham- ($r=0,25$, $p=0.59$, Korrelationsanalyse) noch in der IR-Gruppe ($r=-0,06$, $p=0.89$, Korrelationsanalyse) zeigte sich eine Korrelation zwischen Score-Punkten und EF (%) (s. Abb. 27).

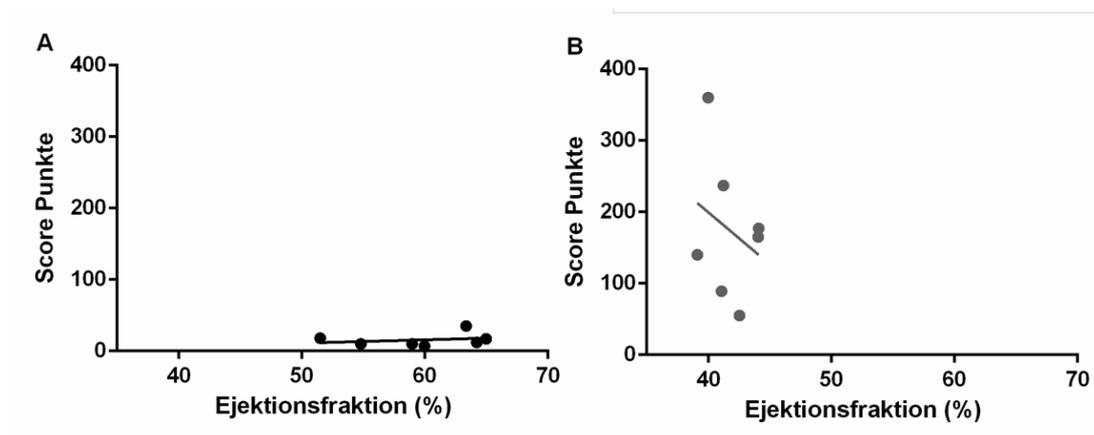


Abb. 27 Vergleich induzierbarer Score-Punkte und der kardialen Ejektionsfraktion

Es bestand weder in der Sham- (A) noch in der IR-Gruppe (B) eine Korrelation zwischen induzierten Score-Punkten und der Ejektionsfraktion (%) (Sham (A): $r=0,25$, $p=0.59$ $Y = 0,4663 \cdot X - 12,26$, Korrelationsanalyse; IR (B): $r = -0,07$, $p=0.55$, $Y = -14,57 \cdot X + 782,5$, Korrelationsanalyse). Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt. IR=Ischämie/Reperfusion.

3.6.2 Korrelationsanalysen der Infarktgröße

Es zeigte sich beim Vergleich der EF (%) 7d postoperativ und der Infarktgröße (%) eine negative Korrelation innerhalb der IR-Gruppe ($r=-0,75$, $p=0.01$, Korrelationsanalyse) zwischen EF und Infarktgröße.

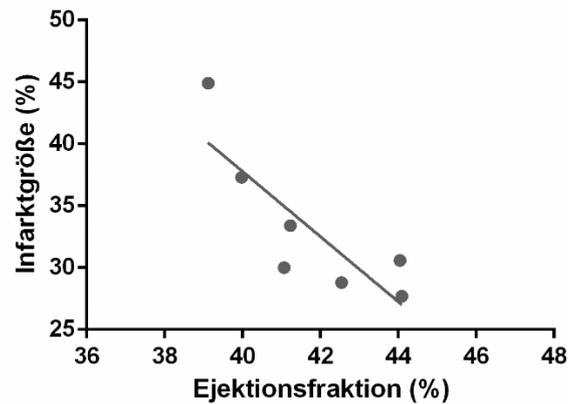


Abb. 28 Vergleich der linksventrikulären Ejektionsfraktion und der Infarktgröße

Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Ejektionsfraktion (%) und Infarktgröße (%) ($r=-0,7$, $p=0,02$, $Y = -2,632 \cdot X + 143,0$ Korrelationsanalyse). LV=linksventrikulär, IR=Ischämie/Reperfusion, VRP=ventrikuläre Refraktärperiode.

Die bestimmten Infarktgrößen lagen in der IR-Gruppe im Durchschnitt bei 32 % ($\pm 1,5\%$) ($n=7$) (s. 3.3).

Zwischen induzierbaren VA (Score-Punkte) und der Infarktgröße (%) bestand innerhalb der IR-Gruppe eine positive Korrelation ($r=0,8$, $p=0,05$, Korrelationsanalyse).

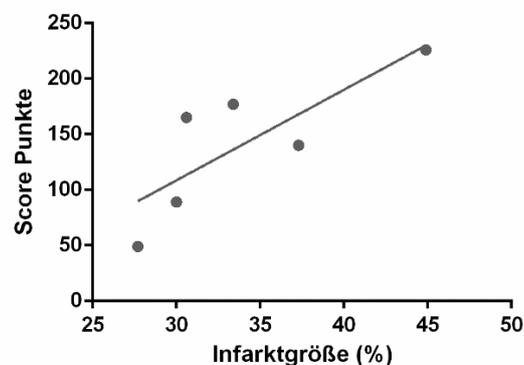


Abb. 29 Vergleich induzierbarer Score-Punkte und der Infarktgröße

Es erfolgte ein Vergleich zwischen Score Punkten (Clasen-Score) und der Infarktgröße (%). Es zeigte sich eine tendenziell positive Korrelation zwischen Score-Punkten (Clasen et al) und Infarktgröße (%) ($n=6$) ($r=0,8$, $p=0,05$, $Y = 8,148 \cdot X - 135,9$, Korrelationsanalyse). IR=Ischämie/Reperfusion.

4 Diskussion

4.1 Tierhaltung und Vitalparameter

Die gemessenen Vitalparameter der untersuchten Mäuse waren vergleichbar mit den vorpublizierten Daten der Arbeitsgruppe. Temperatur und Gewicht waren im Einklang mit anderen Veröffentlichungen zu diesem Mäusestamm (Merx et al., 2013, Tamaoki, 2001). Die Ischämie-Reperfusion-Operation (IR) hatte keinen Einfluss auf das Verhalten/Bewegung, die Trinkmenge und das Gewicht der Mäuse.

4.2 Transthorakale Echokardiographie

In den untersuchten IR-Tieren zeigten sich erhöhte HF zu den Zeitpunkten 1d, 2d postoperativ in der Echokardiographie. Die erhöhten HF können dabei als bereits bekannter Mechanismus einer pathophysiologischen Anpassung an die verminderte EF interpretiert werden (Custodis et al., 2010). Auf der anderen Seite ist der mit der steigenden HF verbundene erhöhte kardiale Sauerstoffverbrauch als pro-arrhythmogener Faktor in Betracht zu ziehen (Heusch and Kleinbongard, 2016). Zu beachten gilt ebenfalls eine durch das verwendete Narkotikum (*Isofluran*) mögliche Frequenzsteigerung (Clasen, 2012, Lazarenko et al., 2010).

Die bestimmten Ejektionsfraktionen (EF) vor IR-Operation sind für den Mäusesubtyp (C57BL/6J) ebenfalls im Normbereich (>55%) und mit anderen Publikationen vergleichbar (Merx et al., 2013, Yang et al., 1999). Sowohl die Vergleichbarkeit zu anderen Arbeitsgruppen als auch die Ähnlichkeit der gemessenen HF und EF zeigen die kardiale Unversehrtheit und Ähnlichkeit der untersuchten Mäuse. Im Vergleich zur *Control*-Gruppe zeigten sich vor der Untersuchung keine Unterschiede.

Zu den Zeitpunkten 1d, 2d und 7d zeigten sich niedrigere EF in der IR-Gruppe im Vergleich sowohl zu den *baseline*-Ergebnissen als auch zu beiden Vergleichsgruppen. Die EF innerhalb der IR-Gruppe nach Intervention passten zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen an unserem Standort und internationaler Gruppen, wobei in den Vergleichsgruppen die Ischämiezeiten unterschiedlich lang waren und es insgesamt breite Schwankungen der gemessenen EF gab (30%-50%) (Merx et al., 2013, Niermann et al., 2016, Schonberger et al., 2014, Wang et al., 2018). Der Beobachtungszeitraum in diesen Arbeitsgruppen betrug jedoch nur 1d, sodass der Vergleich nur für diesen Zeitraum gilt. In einem chronischen Ischämiemodell an unserem Standort (Petz et al.) zeigten sich zu Beginn größere Ejektionsfraktionen (40%), wobei die beobachteten Ischämien kleiner

waren. In der Folge kam es auch zu einer Erhöhung der Ejektionsfraktion, jedoch erst zum Zeitpunkt 7d postoperativ (Petz et al., 2019).

Im Vergleich des enddiastolischen und endsystolischen Volumens bestehen einerseits zwischen den Arbeitsgruppen große Schwankungen, andererseits weisen insbesondere Schonberg et al. innerhalb ihrer Untersuchungen starke Schwankungen auf (EDV: 84.74 ± 42.79 ESV: 84.06 ± 51.67 (Niermann et al., 2016, Schonberger et al., 2014). Bezüglich Niermann et al. sind endsystolisches und enddiastolisches Volumen vergleichbar.

Die in der IR-Gruppe mit der Zeit wieder steigenden EF-Werte sowie die niedrigeren Infarktgrößen 7d postoperativ im Vergleich zu den Werten *post* 1d anderer Gruppen geben Anlass, in Zukunft ein mögliches *cardiac remodeling* näher zu untersuchen, das im Rahmen einer besseren Myokardheilung diskutiert wird (Meijers et al., 2015).

4.3 Planimetrische Infarktgrößenbestimmung

Zur histologischen Bestätigung der Myokardnarbe durch die IR-Operation erfolgte *ex vivo* die planimetrische Bestimmung der Infarktgröße einerseits als weitere Qualitätskontrolle der IR-Operation, andererseits auch zum besseren Arrhythmievergleich mit Arbeitsgruppen, die ein abgewandeltes IR-Modell verwenden und zur Morphologie-Beschreibung des fibrosierten Gewebes.

Die in dieser Untersuchung gemessenen Infarktgrößen nach Gomoris-Färbung sind niedriger im Vergleich zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche ein ähnliches IR-Modell mit derselben Ischämiezeit benutzten (Kleindienst et al., 2016, Song et al., 2016, Wang et al., 2018). Jedoch fand die histologische Auswertung bei diesen Arbeitsgruppen zum Zeitpunkt 1d postoperativ statt und nicht nach 7d, außerdem wurden andere Färbemethoden zur histologischen Infarktdarstellung (*Evan's blue*) genutzt (Kleindienst et al., 2016, Wang et al., 2018). Petz et al., 2019 konnten bei gleicher Färbemethode deutlich geringere Infarktgrößen nachweisen, jedoch erfolgte die histologische Analyse hier drei Wochen nach IR-Operation (Petz et al., 2019). Hierzu passend zeigte sich auch in der echokardiographischen Untersuchung (s. 3.2.) eine spontane Verbesserung der EF und HF (Petz et al., 2019).

4.4 Elektrophysiologische Charakterisierung

4.4.1 Oberflächen-EKG

Trotz morphologischer Ähnlichkeit zwischen dem EKG des Menschen und der Maus, zeigen sich insbesondere auf Ebene der ventrikulären De- und Repolarisation morphologische Unterschiede (Boukens et al., 2014, Sabir et al., 2008). Insbesondere die Bemessung der T-Welle ist bei der Maus anders definiert als bei Menschen (Schrickel et al., 2002).

Die gemessenen elektrophysiologischen Parameter (PR-Dauer, QRS-Dauer, QT-Intervall, QTc, Tabelle 2) der *Sham*-Gruppe waren dabei vergleichbar mit publizierten Daten anderer Vergleichskohorten (Speerschneider and Thomsen, 2013, Clasen, 2018, Clasen, 2012). Zwischen der *Sham*-Gruppe und der *Control*-Gruppe (Mäuse ohne Operation) bestanden keine Unterschiede in Bezug auf die elektrophysiologischen Parameter im Oberflächen-EKG.

In Arbeitsgruppen, welche EKG Veränderungen nach IR-Operation untersuchten, zeigten sich ebenfalls eine verlängerte QRS-Dauer sowie ein verlängertes QT- und JT-Intervall im Vergleich zur *Sham*-Gruppe (Chen et al., 2017, Gardiwal et al., 2009, Korte et al., 2002, Ueda et al., 2006). Die relativen Anstiege der QRS-Dauer (+48%) und des QT-Intervalls (+22%) in dieser Untersuchung in der IR- im Vergleich zur *Sham*-Gruppe waren dabei fast identisch mit den Anstiegen von Korte et al., 2002 und sind kongruent zu vorbeschriebenen pathophysiologischen EKG-Veränderungen nach Ischämie (Korte et al., 2002, Merentie et al., 2015).

In der Literatur beschreiben Gehrman et al., Chen et al., Gardiwal et al., Korte et al., Ueda et al. ischämiebedingte EKG Veränderungen, wobei Unterschiede des Modells (*no reflow*) und Beobachtungsdauer variieren. Somit handelt es sich bei dem vorliegenden Myokardinfarkt-Modell um eine Variante mit der Besonderheit einer Ischämiezeit von 45 Minuten und Reperfusion mit einer Arrhythmie- und EKG-Analyse 7d postoperativ im Vergleich zu anderen Modellen.

Eine vorbeschriebene Korrelation zwischen zunehmender QRS-Dauer bzw. QT-Intervall und einer gesteigerten Arrhythmie im jeweiligen Versuchstier konnte nicht gezeigt werden (Bacharova, 2019, Chávez-González et al., 2017, Josephson and Anter, 2015). In Zukunft wäre eine erneute Betrachtung mit höherer n-Zahl möglicherweise aufschlussreich.

4.4.2 Bestimmung der ventrikulären Reizschwelle und Refraktärperiode

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Veränderungen der ventrikulären Refraktärperiode (VRP) im Zusammenhang mit Änderungen des ventrikulären Aktionspotentials nach Ischämien einen maßgeblichen Einfluss auf die Arrhythmogenität haben (Tse and Yan, 2017). Hierbei werden insbesondere Verkürzungen der VRP, besonders im Zusammenhang mit einem Absinken der ventrikulären Erregungsleitgeschwindigkeit beschrieben, was als mögliche Voraussetzung für einen Reentrymechanismus und damit der Entstehung von ventrikulären Tachyarrhythmien gesehen wird (Connolly and Bishop, 2016, Tse and Yan, 2017).

Aufgrund großer bestehender Differenzen bei den in der Literatur angegebenen VRP desselben Mausstamms, ist neben unterschiedlichen Methoden (Alter der Versuchstiere, Geschlecht, Sedierung) in der *in vivo* elektrophysiologischen Untersuchung auch von untersucherabhängigen Unterschieden zwischen Arbeitsgruppen auszugehen. So zeigten die hier gemessenen VRP in *Control*-Tieren Ähnlichkeiten zu manchen Arbeitsgruppen (Betsuyaku et al., 2004, Clasen, 2018, Gardiwal et al., 2009), waren jedoch niedriger als in anderen Gruppen (Maguire et al., 2003).

Ein frequenzabhängiger Unterschied der VRP zeigte sich weder in dieser Untersuchung, noch wurde er in anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Maguire et al., 2003, Clasen, 2012). Im Vergleich zwischen den Subgruppen bestanden keine Unterschiede zwischen IR- im Vergleich zur *Sham*- und *Control*-Gruppe, dies ist vereinbar mit den Literaturergebnissen (Betsuyaku et al., 2004, Korte et al., 2002, Yu et al., 2016). In anderen Ischämie-Modellen (Cryo-Ischämien) sind die VRP nach Ischämie verkürzt (Andrie et al., 2019).

Es könnte in Zukunft interessant sein, zum einen den Vergleich der VRP zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach IR-Operation und zum anderen inwieweit VRP-Gradienten an verschiedenen Stellen des Herzens innerhalb eines Tieres sich unter Ischämie verändern und mittels lokalem Reentrymechanismus pro-arrhythmogenen auswirken, zu untersuchen (Connolly and Bishop, 2016).

Bei der Untersuchung der induzierbaren VA (Score-Punkte) 7d postoperativ und der VRP zeigte sich in der IR-Gruppe keine Korrelation, was an der geringen n-Zahl liegen könnte.

4.4.3 Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mittels Isoproterenol

In elektrophysiologischen Experimenten an Mäusen mit dem konventionellen PES-Protokoll wurde bereits erfolgreich eine beta1-adrenerge Stimulation mittels Isoproterenolgabe etabliert, welche in gesunden Versuchstieren (entsprechend der *Control*-Gruppe) ventrikuläre Extrasystolen bis kurzanhaltende VT auslöste (Clasen, 2018, Clasen, 2012).

Die HF vor Beginn der Isoproterenolgabe lag im physiologischen Bereich (550-620 Schläge/Minute) für Mäuse (Bogeholz et al., 2014, Petric et al., 2012). Während zwischen *Sham*- und IR-Gruppe nach Isoproterenolgabe bei Betrachtung der HF keine Unterschiede bestanden, zeigte sich bei Betrachtung der Herzfrequenzänderung nach Isoproterenolgabe eine stärkere Herzfrequenzänderung in der *Sham*-Gruppe. Das schwächere Ansprechen der IR-Gruppe auf die beta-adrenerge Stimulation könnte vor dem Hintergrund einer durch die IR-Operation ausgelösten, autonomen Dysbalance diskutiert werden, welche sich in einer höheren durchschnittlichen HF der IR-Gruppe vor Isoproterenolgabe zeigte (Tomaselli and Zipes, 2004).

Zwischen *Control*- und *Sham*- oder IR-Gruppe bestanden vor und nach Isoproterenolgabe keine Unterschiede in der VRP. Die nach Isoproterenolgabe bestimmten VRP sind ähnlich zu anderen publizierten Daten (VRP= 30ms) für *Control*-Tiere. Hier bestanden ebenfalls keine Unterschiede vor und nach Isoproterenol (Hothi et al., 2008).

In der EKG-Auswertung zeigten sich nach Isoproterenolgabe ein verbreiteter QRS-Komplex und ein verkürztes QT/JT-Intervall. In anderen Arbeitsgruppen waren diese Veränderungen der ventrikulären Erregungsausbreitung durch Isoproterenol nicht nachweisbar, wobei in den Vergleichsgruppen die Ischämien medikamentös erzeugt wurden und nicht durch Ligatur (Yamamoto et al., 2002).

4.5 Ventrikuläre Vulnerabilität in der elektrophysiologischen Untersuchung

4.5.1 Gruppencharakteristika

Während der EPU wurde die Körpertemperatur der Mäuse mittels rektaler Temperatursonde kontrolliert gesteuert, was als mögliche Einflussgröße auf die Arrhythmogenität erachtet wurde (Dietrichs et al., 2019). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen allen Versuchsgruppen (*Control*, *Sham*, IR), sodass vorbeschriebene temperaturbedingte Einflüsse auf die HF und Arrhythmogenität auszuschließen sind (Clasen, 2018, Mugelli et al., 1986).

Das gemessene durchschnittliche Körpergewicht der Tiere war zwischen den Gruppen gleich und ähnelte dem aus anderen Publikationen, sowohl von unserem Standort, als auch anderer Gruppen (Baumgardt et al., 2016, Clasen, 2018, Kleindienst et al., 2016). Ein möglicher Einfluss des Körpergewichts auf LV-Funktion, Infarktgröße und damit auf eine eventuelle Arrhythmie neigung ist daher nicht anzunehmen.

Das reine Herzgewicht zeigte keine Korrelation mit einer Arrhythmie, was den letzten Erkenntnissen gegen die critical mass Theorie entspricht (Sabir et al., 2008).

Um eine mögliche Überdosierung und mögliche arrhythmogene Wirkungen des Narkosemittels (Isofluran) zu minimieren, sollte die Dauer des Stimulationsprotokolls nicht länger als 100 Minuten betragen und zwischen den Gruppen gleich sein (Clasen, 2018, Hearse and Sutherland, 2000). Dies wurde in allen Versuchsgruppen erreicht.

4.5.2 Quantitative Arrhythmieanalyse

Es erfolgte eine Charakterisierung der subakuten Phase, um den Einfluss der beginnenden Fibrosierung auf die Arrhythmogenität zu charakterisieren.

In der IR-Gruppe zeigten sich in beiden verwendeten Scores (Clasen et al., van der Werf et al.) deutlich mehr Arrhythmiepunkte als in der *Sham*-Gruppe. Zwischen der *Sham*- und der *Control*-Gruppe bestand dabei kein Unterschied. Während 24h nach Reperfusion eine erhöhte Arrhythmogenität bereits beschrieben ist, konnte die gesteigerte Arrhythmogenität in der IR-Gruppe nun auch 7d postoperativ nachgewiesen werden (Guo et al., 2012, Sanchez et al., 2011). Die Arrhythmien zum Zeitpunkt 7d postoperativ nach *cardiac repair* Modell (s.unten) sind nicht mehr auf eine akute Inflammationsreaktion zurückzuführen, sondern auf fibrotische Veränderungen. Damit deutet eine gesteigerte Arrhythmie zu diesem Zeitpunkt auf eine erhöhte prognostische ventrikuläre Vulnerabilität hin (Lindsey et al., 2018, Makimoto et al., 2020).

Die meisten induzierten Arrhythmien in der IR-Gruppe waren dabei PVC, gefolgt von kurzstreckigen VT ($VT < 1s$). Eine erhöhte Anzahl induzierbarer PVC ist bereits an gesunden Tieren mit einem modifizierten Stimulationsprotokoll gezeigt worden (Clasen, 2018).

Das Auftreten kurzstreckiger VT nach Stimulation ist ebenfalls bereits beschrieben, jedoch in deutlich geringerer Anzahl (Sanchez et al., 2011). Hierbei sind jedoch Unterschiede im jeweils verwendeten Stimulationsprotokoll zu beachten (s. 2.5.4.). Insbesondere vor dem Hintergrund der beim Menschen sehr eingeschränkten bzw. unklaren Bedeutung einzelner PVC und der großen prognostischen Bedeutung anhaltenden VT für den SCD, ist die wiederholte Auslösbarkeit VT in dem hier verwendeten IR-Modell eine Grundlage zur weiteren Identifizierung pro-arrhythmogener Faktoren in der Maus, die auch bessere Rückschlüsse auf den Menschen zulassen kann (Ataklte et al., 2013, Priori et al., 2015).

Nachdem sich der Arrhythmiescore nach Clasen et al. bereits für unbehandelte Mäuse ohne Infarkt *als nützlich erwiesen hat*, konnte hier gezeigt werden, dass er ebenso an IR-Tieren anwendbar und geeignet ist (Clasen, 2018, van der Werf et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass das von Clasen et al. an nicht IR-Mäusen verwendete Stimulationsprotokoll auch in IR-Mäusen effektiv Arrhythmien induziert (Clasen, 2018). Die induzierten VA durch das Stimulationsprotokoll waren dabei in der IR-Gruppe höher als in der *Sham*-Gruppe, was für eine gesteigerte ventrikuläre Vulnerabilität der IR-Gruppe spricht und in Zukunft genutzt werden kann, um die gesteigerte ventrikuläre Vulnerabilität zu untersuchen. Zudem trägt

der Clasen-Score durch seine genauere Unterteilung der höhergradigen VA und Bewertung der VT Dauer zu einer besseren Differenzierung bei (Clasen, 2018, Priori et al., 2015, van der Werf et al., 2011). Neben der bereits bekannten hohen prognostischen Bedeutung von VT, konnte am Menschen auch eine hohe prädiktive Vorhersagekraft von nsVT, die ausschließlich in den untersuchten Tieren auslösbar waren, auf die Hospitalisierungsrate gezeigt werden (Makimoto et al., 2020).

4.5.3 Qualitative Arrhythmieanalyse der ventrikulären Tachykardien (VT)

Neben der rein quantitativen Betrachtung der Arrhythmien ließen sich in mehr IR-Tieren (%) als in *Sham*- bzw. *Control*-Tieren VT auslösen. In anderen Arbeitsgruppen ließen sich prozentual in der IR-Gruppe nur ähnlich viele Arrhythmien auslösen, wenn die Arrhythmie-Untersuchung entweder sich direkt der Reperfusion anschloss (Bak et al., 2010, Burger et al., 2009) oder innerhalb von 24h nach Operation stattfand (Bak et al., 2010, Burger et al., 2009, Jiang et al., 2019). In Arbeitsgruppen, in denen die EPU deutlich später nach der IR-Operation stattfand (6 Wochen), ließen sich bei deutlich längeren Ischämiezeiten prozentual in weniger Tieren VT auslösen als in dieser Studie (Gardiwal et al., 2009, Gehrman et al., 2001). Die Ergebnisse zwischen den Gruppen schwankten jedoch stark (7,7%- 69%) (Gardiwal et al., 2009, Gehrman et al., 2001).

Die deutlich erhöhte Arrhythmogenität der IR-Gruppe muss einerseits vor dem Hintergrund des in dieser Arbeitsgruppe erweiterten Stimulationsprotokolls (Miniburst (MB) gesehen werden, andererseits kann dies auch ein Hinweis auf das stattfindende *cardiac remodeling* sein, welches in weiteren Versuchen näher bestimmt werden sollte. Hierzu passend zeigte sich bereits in der Echokardiographie eine Verbesserung der echokardiographischen Parameter mit zunehmendem Abstand zur IR-Operation, welches eine Erklärung für die initial erhöhte Arrhythmogenität nach der IR-Operation bieten könnte. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Mäuse bei dem hier verwendeten IR-Modell in der subakuten Phase (7d), mit beginnender Fibrosierung nach dem dreiphasigen Ischämie-Modell, befanden, wohingegen die Untersuchungen von Gehrman et al. und Gardiwal et al. (6 Wochen) in der chronischen Phase durchgeführt wurden, in der die Infarkt Narbe eingeeilt ist (Bonaventura et al., 2016, Gardiwal et al., 2009, Gehrman et al., 2001). Hierbei zu beachten sind die zwischen Menschen und Mäusen unterschiedlich definierten Zeiträume von akut, subakut bis chronisch. Während der subakute Zeitraum bei Mäusen zwischen 3h-7d *post* Ischämie liegt, liegt dieser Zeitraum beim Menschen zwischen 2d-30d (Lindsey et al., 2018, Thygesen et al., 2018).

Zur weiteren qualitativen Betrachtung folgte der Vergleich der VT Ankopplungszeit, Zykluslänge und Dauer zwischen *Sham* und IR.

Es zeigte sich in der IR-Gruppe eine erhöhte VT Ankopplungszeit, sodass bereits weniger aggressive Stimulationen mit deutlich größerem Abstand zueinander in der Lage waren, in der IR-Gruppe Arrhythmien auszulösen, was für eine erhöhte Arrhythmogenität in dieser Gruppe spricht.

Unterschiede in der durchschnittlichen Dauer der ausgelösten VT bestanden nicht.

Am Menschen konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte VT-Zykluslänge ein negativer Prädiktor für das Überleben insgesamt und das Wiederauftreten von VT an ischämisch vorgeschädigten Herzen ist (Vaseghi et al., 2017). Hierzu zeigten sich in der IR-Gruppe zwar keine längeren VT Zykluslängen als in der *Sham*-Gruppe, jedoch deuten sich diese an und sollten in einer größeren Versuchspopulation nochmals eingehender untersucht werden. Aufgrund der im subakuten Modell eingehheilten Narbe ließe sich dann vermuten, dass die längere Zykluslänge eher auf strukturellen, narbenassoziierten Faktoren beruht als auf einer Folge einer Inflammation (akute Phase).

4.5.4 Vergleich der ventrikulären Stimulationsprotokolle

Im Vergleich der programmierten elektrischen Stimulation (PES) jeweils untereinander zeigte sich kein Einfluss der Frequenzabhängigkeit (80ms, 90ms, 100ms) auf die Arrhythmogenese. Im *Burst*-Protokoll bestand ebenfalls kein Unterschied zwischen der Zykluslänge der Stimulationen (50ms, 40ms, 30ms, 20ms, 10ms) auf die Arrhythmie-Induktion. Ein solcher Einfluss ließ sich bei keinen der publizierten Daten bislang zeigen, sodass im Folgenden die Stimulationsprotokolle mit einer Frequenz von 100ms analysiert wurden (Clasen, 2018, Clasen, 2012).

Im Vergleich der Stimulationsprotokolle miteinander zeigte sich, dass das *Burst*- und MB-Stimulationsprotokoll innerhalb der IR-Gruppe die meisten Arrhythmien auslöste. Hierbei bestanden nur beim MB-Protokoll in der IR-Gruppe mehr Arrhythmien als in der *Sham*-Gruppe. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass das *Burst*-Stimulationsprotokoll in der *Sham*-Gruppe von allen Protokollen die meisten Arrhythmien auslöste und es in der IR-Gruppe auf der anderen Seite starke Schwankungen in Bezug auf die Arrhythmogenität des *Burst*-Stimulationsprotokolls gab. Das PES-Protokoll scheint in dieser Untersuchung nicht aggressiv genug zu sein, um die erhöhte Arrhythmogenität im IR-Modell nachzuweisen.

Im Vergleich der prozentualen VT-Induktion in *Sham*- und IR-Tieren durch die jeweiligen Stimulationsprotokolle zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Das MB-Protokoll erzeugte in der IR-Gruppe die meisten Arrhythmien und als einziges Stimulationsprotokoll mehr als in der *Sham*-Gruppe. Mittels MB-Protokolls lässt sich also besser zwischen ischämisch vorgeschädigten und damit vulnerablen Tieren und *Sham*-Tieren unterscheiden als mit den anderen Protokollen. Das *Burst*-Stimulationsprotokoll erzeugte in einer ähnlich großen Zahl VT in *Sham*- wie in IR-Tieren, sodass kaum Trennschärfe zwischen den Gruppen durch

das Stimulationsprotokoll besteht. Das *Burst*-Stimulationsprotokoll scheint in diesen Versuchen zu aggressiv zu sein, da es auch in der *Sham*-Gruppe viele Arrhythmien und auch VT auslöst (Maguire et al., 2003).

Das PES-Protokoll hingegen kann weder in der *Sham*- noch in der IR-Gruppe VT auslösen, sodass dieses Protokoll, wie auch schon zuvor in diesen Untersuchungen, als unzureichend erscheint.

In anderen Arbeitsgruppen mit ähnlichem IR-Modell wurden ebenfalls mit den beiden herkömmlichen Stimulationsprotokollen (PES, *Burst*) nur prozentual in wenigen Tieren VT ausgelöst (Gardiwal et al., 2009, Liao et al., 2010). Dabei lagen die Ischämiezeiten teilweise mehr als doppelt so hoch (120 Minuten) wie in dem hier verwendeten Modell (Liao et al., 2010). Hier könnte es in Zukunft nützlich sein, ebenfalls das MB-Stimulationsprotokoll zu verwenden, um die Arrhythmogenität möglicherweise genauer zu bestimmen.

Beim Vergleich der Einzelschritte des MB-Stimulationsprotokolls (MB-S4-11) zeigte sich in unbehandelten *Control*-Tieren in Voruntersuchungen keine Zunahme der induzierten Arrhythmien mit zunehmenden Stimuli (S4-11) (Clasen, 2018). Im Vergleich der Einzelschritte in der IR-Gruppe zeigte sich ab MB-S5 ein Sättigungsverhalten der induzierbaren Arrhythmien, es bestanden jedoch Unterschiede der anderen Teilschritte zu MB-S4 sowie PES-S4. Ein mögliches Calcium-*Overload* als Grundlage für die erhöhte Arrhythmogenität der IR-Tiere durch das MB-Stimulationsprotokoll ist damit unwahrscheinlich (Antoons et al., 2002, Koller et al., 1995).

Insgesamt ließen sich mittels MB-Stimulationsprotokoll effektivere Arrhythmien induzieren und besser zwischen vulnerablen Tieren (IR-Gruppe) und nicht vulnerablen Tieren (*Sham*-Gruppe) unterscheiden.

4.5.5 Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mittels Isoproterenol

Isoproterenol hatte in dieser Studie keinen proarrhythmogenen Einfluss auf die IR- und *Sham*-Gruppe, wie bei Clasen et al. für das MB-Protokoll beschrieben (Clasen, 2018). In der Literatur zeigten sich protektive Effekte einer reinen beta-adrenergen Stimulation, jedoch im akuten postoperativen Stadium und nach vorheriger Aufsättigung (Asimakis et al., 1994, Fenton et al., 1995). Der Mechanismus hierbei scheint eine erhöhte Funktion der Phosphorylase a zu sein, welche zu einer erhöhten Glykogenolyse und damit geringeren anaeroben Glykolyse führt (Asimakis et al., 1994, Shen and Zipes, 2014). Zum Zeitpunkt 7d postoperativ gibt es für das IR-Modell keine Daten bezüglich beta-adrenerger Stimulation in der Literatur. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ischämie-bedingtes Narbengewebe äußerst sensitiv gegenüber Arrhythmien aufgrund einer heterogenen sympathischen Innervation im Narbengewebe („nerve sprouting“) ist (Shen and Zipes,

2014). Dieser Effekt zeigte sich mittels Isoproterenolinjektion in den hier durchgeführten Versuchen nicht. Grund hierfür könnte eine nach IR-Operation erhöhte neurohumorale Aktivierung sein, weshalb das Myokard weniger sensibel auf eine Isoproterenolstimulation reagiert. In Zukunft wäre eine histologische Aufarbeitung des induzierten Infarktgebiets zur Korrelation der sympathischen Innervation mit den induzierbaren Arrhythmien interessant, um das arrhythmogene Potential narbenassoziierter Veränderungen in der Sympathikus-Innervation zu bestimmen.

4.6 Korrelation funktionell-struktureller Parameter und der Arrhythmogenität

4.6.1 Korrelation zwischen Ejektionsfraktion und ventrikulärer Arrhythmien

Ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen EF und induzierbaren Arrhythmien ließ sich nicht zeigen. Einschränkend hierbei ist jedoch auf die geringe Zahl der untersuchten Tiere (n=7) zu verweisen. Daneben sind andere Einflussfaktoren auf die VA zu nennen, weshalb möglicherweise hier kein direkter Zusammenhang zur LV-Funktion gezeigt werden kann. Eine direkte Korrelation zwischen induzierbaren Arrhythmien und der echokardiographischen EF im subakuten IR-Modell wurde bislang in der Literatur nicht untersucht.

4.6.2 Korrelationsanalysen der Infarktgröße

Zudem zeigte sich zwischen linksventrikulärer EF und Infarktgröße eine negative Korrelation, was für einen negativen kardiodynamischen Effekt der Infarktnarbe spricht. Zwischen induzierbaren VA und der Infarktgröße bestand innerhalb der IR-Gruppe eine positive Korrelation. Die Größe der infarktbedingten Narbe scheint daher einen Einfluss auf die Arrhythmie zu haben. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Subgruppen mit kleineren Infarktgrößen weniger VA in EPU zeigen, jedoch wurden immer ganze Subgruppen miteinander verglichen, eine Korrelationsanalyse zwischen Infarktgröße und VA wurde bislang nicht unternommen (Lungkaphin et al., 2015, Spannbauer et al., 2019). Hierbei kann das Narbengewebe im Rahmen eines *reentry*-Kreislaufes als unidirektionaler Block interpretiert werden, der bei Stimulation in der EPU das Auftreten VT begünstigt. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Automatie und *triggered activity* wäre in Zukunft die Ableitung von monophasischen Aktionspotentialen an Schnittpräparaten oder Untersuchungen mittels optical mapping notwendig (Lee et al., 2019). Ebenso könnte *ex vivo* eine mögliche intrazelluläre Calcium- bzw. Natrium-Akkumulation untersucht werden (Enriquez et al., 2017).

4.7 Limitationen

Limitationen der Untersuchungen sind die insgesamt geringe Zahl der Versuchstiere pro Untergruppe. Aufgrund der Fokussierung auf den Zeitpunkt 7d *post* IR können Aussagen zu anderen Zeitpunkten nicht getroffen werden und sollten in Zukunft vergleichend untersucht werden. Ein möglicher arrhythmogener Einfluss des verwendeten Narkosemittels Isofluran kann trotz ähnlicher Versuchszeiten und damit Isofluran-Dosierungen nicht ausgeschlossen werden. Ebenso wurden bei dieser Untersuchung ausschließlich induzierte ventrikuläre Arrhythmien betrachtet. Einflüsse auf atriale Arrhythmien wurden nicht untersucht.

Schlussfolgerungen

Diese Studie diente der elektrophysiologischen Charakterisierung des arrhythmogenen *remodeling* im IR-Mausmodell 7d postoperativ. Hierzu wurden die Versuchstiere echokardiographisch, histologisch, elektrokardiographisch und invasiv elektrophysiologisch untersucht. Das kürzlich vorgestellte Miniburst-Stimulationsprotokoll (MB) wurde erstmals an IR-Tieren getestet und zeigte qualitativ und quantitativ höhere Arrhythmien sowie eine bessere Trennschärfe im Vergleich zu herkömmlichen Stimulationsprotokollen.

1. Im IR-Modell zeigten sich einerseits mehr Arrhythmien (Score-Punkte) und andererseits höhergradigere Arrhythmien (VT) und damit eine höhere ventrikuläre Vulnerabilität.

2. Am besten eignet sich das MB-Stimulationsprotokoll für die Untersuchung der ventrikulären Vulnerabilität in IR Mäusen. Mittels MB-Stimulationsprotokoll konnten sowohl quantitativ mehr als auch qualitativ höhergradigere Arrhythmien in der IR- als in der *Sham*-Gruppe induziert werden. Diese Unterscheidung gelang nicht mit dem konventionellen programmierten elektrischen Stimulationsprogramm oder der Burststimulation.

3. Je größer die induzierte Infarkt Narbe war, desto mehr VA ließen sich induzieren. Dies deutet, bei niedriger n-Zahl, auf einen infarkt Narbenbedingten Effekt auf die VA-Induktion hin. Die negative Korrelation zwischen Infarktgröße und Ejektionsfraktion zeigte eine auf die Ischämie zurückzuführende Verminderung der Ejektionsfraktion, wobei eine Korrelation zwischen Ejektionsfraktion und VA nicht gezeigt werden konnte.

In Zukunft könnte es interessant sein, weitere Zeitpunkte nach akutem Myokardinfarkt im IR-Modell hinsichtlich ihrer Arrhythmogenität zu untersuchen. Zudem könnte zum besseren Verständnis der Arrhythmiemechanismen eine Untersuchung mittels *optical mapping* hilfreich sein. Außerdem könnte mittels Immunhistochemie Unterschiede in der Ionenkanalzusammensetzung des Infarktgebiets aufgezeigt werden, welche als Ziel für zukünftige pharmakologische Therapien dienen könnten. Das IR Maus Modell eignet sich zur näheren Untersuchung von Arrhythmiemechanismen.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Ablauf des Herzaktionspotentials.....	2
Abb. 2 EKG des Menschen.....	4
Abb. 3 <i>Early</i> und <i>delayed afterdepolarization</i>	7
Abb. 4 <i>Reentry</i> -Erregungskreisläufe bei Arrhythmieinduktion	9
Abb. 5 Murines Beispiel-EKG.....	14
Abb. 6 Versuchsablauf der Arrhythmieanalyse.....	19
Abb. 7 Oberflächen-EKG-Ableitung	29
Abb. 8 Bestandteile des Stimulationsprotokolls.....	33
Abb. 9 Arrhythmieeinteilung nach Lambeth-Kriterien	35
Abb. 10 Infarktgrößenbestimmung nach Gomoris-Trichrome-Färbung.....	39
Abb. 11 Herzfrequenzen <i>prä-</i> und <i>postoperativ</i> in der Echokardiographie.....	42
Abb. 12 Linksventrikuläre systolische Funktion in der Echokardiographie.....	43
Abb. 13 Histologische Darstellung der postischämischen Fibrose.....	44
Abb. 14 Vergleich der ventrikulären Refraktärperioden	46
Abb. 15 Vergleich ventrikulärer Arrhythmien und der ventrikulären Refraktärperiode.....	46
Abb. 16 Herzfrequenz nach Isoproterenolgabe	47
Abb. 17 Anzahl induzierbarer ventrikulärer Arrhythmien in der EPU	50
Abb. 18 Induzierte ventrikuläre Arrhythmien nach Score-Punkten.....	51
Abb. 19 Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien	52
Abb. 20 Qualitativer Vergleich der induzierten ventrikulären Tachykardien	53
Abb. 21 Ventrikuläre Arrhythmieinduktion mittels herkömmlicher Stimulationsprotokolle ..	54
Abb. 22 Arrhythmieinduktion im Vergleich der verschiedenen Stimulationsprotokolle	55
Abb. 23 Arrhythmieinduktion mittels Miniburst und PES-Protokoll.....	56
Abb. 24 Induktion ventrikulärer Tachykardien mittels Stimulationsprotokolls	57
Abb. 25 Arrhythmieinduktion vor und nach Isoproterenolgabe	58
Abb. 26 Prozentuale Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien nach Isoproterenolgabe	58
Abb. 27 Vergleich induzierbarer Score-Punkte und der kardialen Ejektionsfraktion	59
Abb. 28 Vergleich der linksventrikulären Ejektionsfraktion und der Infarktgröße	60
Abb. 29 Vergleich induzierbarer Score-Punkte und der Infarktgröße.....	60

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Score-Bewertung ventrikulärer Arrhythmien	36
Tabelle 2 Echokardiographische Parameter <i>prä-</i> und <i>postoperativ</i>	43
Tabelle 3 Elektrophysiologische Charakteristika im Oberflächen-EKG.....	45
Tabelle 4 Elektrophysiologische Charakteristika nach Isoproterenolgabe	48
Tabelle 5 Periinterventionelle Parameter der elektrophysiologischen Untersuchung.....	49

7 Literatur- und QuellenverzeichnisLiteraturverzeichnis

- ADABAG, A. S., LUEPKER, R. V., ROGER, V. L. & GERSH, B. J. (2010). Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors. *Nature Reviews Cardiology*, 7, 216.
- AKTORIES K., FÖRSTERMANN U., HOFMANN F. & K., S. (2013). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Elsevier Urban & Fischer*, 242-251; 157-158; 132-133; 227.
- AL-KHATIB, S. M., STEVENSON, W. G., ACKERMAN, M. J., BRYANT, W. J., CALLANS, D. J., CURTIS, A. B., DEAL, B. J., DICKFELD, T., FIELD, M. E., FONAROW, G. C., GILLIS, A. M., GRANGER, C. B., HAMMILL, S. C., HLATKY, M. A., JOGLAR, J. A., KAY, G. N., MATLOCK, D. D., MYERBURG, R. J. & PAGE, R. L. (2018). 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death. *Journal of the American College of Cardiology*, 72, e91-e220.
- ALVAREZ, C. K., CRONIN, E., BAKER, W. L. & KLUGER, J. (2019). Heart failure as a substrate and trigger for ventricular tachycardia. *J Interv Card Electrophysiol*, 56, 229-247.
- ANDRIE, R. P., BEIERT, T., KNAPPE, V., LINHART, M., STOCKIGT, F., KLEIN, A. M., GHANEM, A., LUBKEMEIER, I., ROLL, W., NICKENIG, G., FLEISCHMANN, B. K. & SCHRICKEL, J. W. (2019). Treatment with mononuclear cell populations improves post-infarction cardiac function but does not reduce arrhythmia susceptibility. *PLoS One*, 14, e0208301.
- ANTOONS, G., MUBAGWA, K., NEVELSTEEN, I. & SIPIDO, K. R. (2002). Mechanisms underlying the frequency dependence of contraction and $[Ca^{2+}]_i$ transients in mouse ventricular myocytes. *J Physiol*, 543, 889-98.
- ANTZELEVITCH, C. & BURASHNIKOV, A. (2011). Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Card Electrophysiol Clin*, 3, 23-45.
- ASIMAKIS, G. K., INNERS-MCBRIDE, K., CONTI, V. R. & YANG, C. J. (1994). Transient beta adrenergic stimulation can precondition the rat heart against postischemic contractile dysfunction. *Cardiovasc Res*, 28, 1726-34.
- ATAKLTE, F., ERQOU, S., LAUKKANEN, J. & KAPTOGE, S. (2013). Meta-analysis of ventricular premature complexes and their relation to cardiac mortality in general populations. *Am J Cardiol*, 112, 1263-70.
- AUMÜLLER G., AUST G., DOLL A., ENGELE J., KIRSCH J., MENSE S., REIßIG D., SALVETTER J., SCHMIDT W., SCHMITZ F., SCHULTE E., SPANEL-BOROWSKI K., WOLFF W., WURZINGER L. & ZILCH H.-G. (2010). Anatomie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- BACHAROVA, L. (2019). Missing Link between Molecular Aspects of Ventricular Arrhythmias and QRS Complex Morphology in Left Ventricular Hypertrophy. *Int J Mol Sci*, 21.
- BAK, I., CZOMPA, A., JUHASZ, B., LEKLI, I. & TOSAKI, A. (2010). Reduction of reperfusion-induced ventricular fibrillation and infarct size via heme oxygenase-1 overexpression in isolated mouse hearts. *J Cell Mol Med*, 14, 2268-72.

- BARBER, M. J., MUELLER, T. M., HENRY, D. P., FELTEN, S. Y. & ZIPES, D. P. (1983). Transmural myocardial infarction in the dog produces sympathectomy in noninfarcted myocardium. *Circulation*, 67, 787-796.
- BARDY, G. H., LEE, K. L., MARK, D. B., POOLE, J. E., PACKER, D. L., BOINEAU, R., DOMANSKI, M., TROUTMAN, C., ANDERSON, J., JOHNSON, G., MCNULTY, S. E., CLAPP-CHANNING, N., DAVIDSON-RAY, L. D., FRAULO, E. S., FISHBEIN, D. P., LUCERI, R. M. & IP, J. H. (2005). Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med*, 352, 225-37.
- BAUMGARDT, S. L., PATERSON, M., LEUCKER, T. M., FANG, J., ZHANG, D. X., BOSNJAK, Z. J., WARLTIER, D. C., KERSTEN, J. R. & GE, Z. D. (2016). Chronic Co-Administration of Sepsiapterin and L-Citrulline Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy and Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Obese Type 2 Diabetic Mice. *Circ Heart Fail*, 9, e002424.
- BERUL, C. I. (2003). Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. *Physiological genomics*, 13, 207-216.
- BERUL, C. I., ARONOVITZ, M. J., WANG, P. J. & MENDELSON, M. E. (1996). In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. *Circulation*, 94, 2641-2648.
- BERUL, C. I., CHRISTE, M. E., ARONOVITZ, M. J., SEIDMAN, C. E., SEIDMAN, J. G. & MENDELSON, M. E. (1997). Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest*, 99, 570-6.
- BETSUYAKU, T., KANNO, S., LERNER, D. L., SCHUESSLER, R. B., SAFFITZ, J. E. & YAMADA, K. A. (2004). Spontaneous and inducible ventricular arrhythmias after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Pathol*, 13, 156-64.
- BEVILACQUA, L. M., SIMON, A. M., MAGUIRE, C. T., GEHRMANN, J., WAKIMOTO, H., PAUL, D. L. & BERUL, C. I. (2000). A targeted disruption in connexin40 leads to distinct atrioventricular conduction defects. *Journal of interventional cardiac electrophysiology*, 4, 459-567.
- BLOCK, M., BORGGREFE, M., GOEDEL-MEINEN, L., HOHNLOSER, S., KALUSCHE, D., KUCK, K., MEINERTZ, T., OEFF, M., PITSCHNER, J. & VOLKMANN, H. (1998). Richtlinien für die Durchführung invasiver elektrophysiologischer Untersuchungen. *Z Kardiol*, 87, 502-512.
- BOGEHOLZ, N., ECKARDT, L. & POTT, C. (2014). Advantages and limitations of transgenic mice: the role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac electrophysiology and arrhythmia. *Current medicinal chemistry*, 21, 1330-1335.
- BOMPOTIS, G. C., PAPPAS, L. K., ANGELIDIS, C., KOSSYVAKIS, C., GIANOPOULOS, G. & DEFTEREOS, S. (2016). Calcium Handling and Arrhythmogenesis. *Med Chem*, 12, 170-6.
- BONAVENTURA, A., MONTECUCCO, F. & DALLEGRI, F. (2016). Cellular recruitment in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Clin Invest*, 46, 590-601.

- BOUKENS, B. J., HOOGENDIJK, M. G., VERKERK, A. O., LINNENBANK, A., VAN DAM, P., REMME, C.-A., FIOLET, J. W., OPTHOF, T., CHRISTOFFELS, V. M. & CORONEL, R. (2012). Early repolarization in mice causes overestimation of ventricular activation time by the QRS duration. *Cardiovascular research*, 97, 182-191.
- BOUKENS, B. J., RIVAUD, M. R., RENTSCHLER, S. & CORONEL, R. (2014). Misinterpretation of the mouse ECG: 'musing the waves of *Mus musculus*'. *The Journal of physiology*, 592, 4613-4626.
- BREWSTER, D., HUMPHREY, M. J. & MCLEAVY, M. A. (1981). The systemic bioavailability of buprenorphine by various routes of administration. *J Pharm Pharmacol*, 33, 500-6.
- BRUNNER, M., GUO, W., MITCHELL, G. F., BUCKETT, P. D., NERBONNE, J. M. & KOREN, G. (2001). Characterization of mice with a combined suppression of I to and IK, slow. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281, H1201-H1209.
- BURGER, D. E., XIANG, F. L., HAMMOUD, L., JONES, D. L. & FENG, Q. (2009). Erythropoietin protects the heart from ventricular arrhythmia during ischemia and reperfusion via neuronal nitric-oxide synthase. *J Pharmacol Exp Ther*, 329, 900-7.
- BUXTON, A. E., CALKINS, H., CALLANS, D. J., DIMARCO, J. P., FISHER, J. D., GREENE, H. L., HAINES, D. E., HAYES, D. L., HEIDENREICH, P. A. & MILLER, J. M. (2006). ACC/AHA/HRS (2006) key data elements and definitions for electrophysiological studies and procedures: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards (ACC/AHA/HRS Writing Committee to Develop Data Standards on Electrophysiology). *Journal of the American College of Cardiology*, 48, 2360-2396.
- CAO, J.-M., FISHBEIN, M. C., HAN, J. B., LAI, W. W., LAI, A. C., WU, T.-J., CZER, L., WOLF, P. L., DENTON, T. A. & SHINTAKU, I. P. (2000). Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation*, 101, 1960-1969.
- CESAROVIC, N., NICHOLLS, F., RETTICH, A., KRONEN, P., HÄSSIG, M., JIRKOF, P. & ARRAS, M. (2010). Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. *Laboratory animals*, 44, 329-336.
- CHÁVEZ-GONZÁLEZ, E., RODRÍGUEZ JIMÉNEZ, A. E. & MORENO-MARTÍNEZ, F. L. (2017). QRS duration and dispersion for predicting ventricular arrhythmias in early stage of acute myocardial infraction. *Med Intensiva*, 41, 347-355.
- CHEN, Y., YIN, C., YANG, Y., FAN, Z., SHANG, J. & TAN, W. (2017). Inhibition of rapid delayed rectifier potassium current (IKr) by ischemia/reperfusion and its recovery by vitamin E in ventricular myocytes. *J Electrocardiol*, 50, 437-443.
- CHENG, J.-H. & KODAMA, I. (2004). Two components of delayed rectifier K⁺ current in heart: molecular basis, functional diversity, and contribution to repolarization. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 137-145.
- CHUGH, S. S., REINIER, K., TEODORESCU, C., EVANADO, A., KEHR, E., AL SAMARA, M., MARIANI, R., GUNSON, K. & JUI, J. (2008). Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis*, 51, 213-28.

- CLASEN, E., ANGENDOHR, JUNGEN, SHIN, DONNER, FÜRNKRANZ, KELM, KLÖCKER, MEYER, MAKIMOTO (2018). A modified approach for programmed electrical stimulation in mice: Inducibility of ventricular arrhythmias. *PloS One*.
- CLASEN, L. (2012). Elektrophysiologische Untersuchungen der TASK-1 „Knock-out“-Maus. *Doktorarbeit*.
- CLUSIN, W., BUCHBINDER, M. & HARRISON, D. (1983). Calcium overload, "injury" current, and early ischaemic cardiac arrhythmias—a direct connection. *The Lancet*, 321, 272-274.
- COBB, L. A., FAHRENBRUCH, C. E., OLSUFKA, M. & COPASS, M. K. (2002). Changing incidence of out-of-hospital ventricular fibrillation, 1980-2000. *Jama*, 288, 3008-3013.
- CONNOLLY, A. J. & BISHOP, M. J. (2016). Computational Representations of Myocardial Infarct Scars and Implications for Arrhythmogenesis. *Clin Med Insights Cardiol*, 10, 27-40.
- CONTI, C. R. (2006). Inhibition of sodium-dependent calcium overload to treat myocardial ischemia. *Clin Cardiol*, 29, 141-3.
- COUNCIL, N. R. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals.
- COWAN, A., DOXEY, J. C. & HARRY, E. J. (1977). The animal pharmacology of buprenorphine, an oripavine analgesic agent. *Br J Pharmacol*, 60, 547-54.
- CRANEFIELD, P. F. (1977). Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circulation Research*, 41, 415-423.
- CRONIN, E. M., BOGUN, F. M., MAURY, P., PEICHL, P., CHEN, M., NAMBOODIRI, N., AGUINAGA, L., LEITE, L. R., AL-KHATIB, S. M., ANTER, E., BERRUEZO, A., CALLANS, D. J., CHUNG, M. K., CUCULICH, P., D'AVILA, A., DEAL, B. J., DELLA BELLA, P., DENEKE, T., DICKFELD, T.-M., HADID, C., HAQQANI, H. M., KAY, G. N., LATCHAMSETTY, R., MARCHLINSKI, F., MILLER, J. M., NOGAMI, A., PATEL, A. R., PATHAK, R. K., SÁENZ MORALES, L. C., SANTANGELI, P., SAPP, J. L., JR., SARKOZY, A., SOEJIMA, K., STEVENSON, W. G., TEDROW, U. B., TZOU, W. S., VARMA, N., ZEPPEFELD, K. & GROUP, E. S. D. (2019). 2019 HRS/EHRA/APHRS/LAHRs expert consensus statement on catheter ablation of ventricular arrhythmias. *EP Europace*, 21, 1143-1144.
- CUSTODIS, F., SCHIRMER, S. H., BAUMHAKEL, M., HEUSCH, G., BOHM, M. & LAUFS, U. (2010). Vascular pathophysiology in response to increased heart rate. *J Am Coll Cardiol*, 56, 1973-83.
- DAHAN, A., YASSEN, A., ROMBERG, R., SARTON, E., TEPPEMA, L., OLOFSEN, E. & DANHOF, M. (2006). Buprenorphine induces ceiling in respiratory depression but not in analgesia. *Br J Anaesth*, 96, 627-32.
- DENEKE, T., BOSCH, R., ECKARDT, L., NOWAK, B., SCHWAB, J., SOMMER, P., VELTMANN, C. & HELMS, T. (2019). Der tragbare Kardioverter/Defibrillator (WCD)—Indikationen und Einsatz. *Der Kardiologe*, 13, 292-304.
- DIBB, K., EISNER, D. & TRAFFORD, A. (2007). Regulation of systolic [Ca²⁺]_i and cellular Ca²⁺ flux balance in rat ventricular myocytes by SR Ca²⁺, L-type Ca²⁺ current and diastolic [Ca²⁺]_i. *The Journal of physiology*, 585, 579-592.

- DIETRICH, E. S., TVEITA, T. & SMITH, G. (2019). Hypothermia and cardiac electrophysiology: a systematic review of clinical and experimental data. *Cardiovasc Res*, 115, 501-509.
- DONOGHUE, M., WAKIMOTO, H., MAGUIRE, C. T., ACTON, S., HALES, P., STAGLIANO, N., FAIRCHILD-HUNTRESS, V., XU, J., LORENZ, J. N., KADAMBI, V., BERUL, C. I. & BREITBART, R. E. (2003). Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 1043-53.
- DURRER, D., VAN DAM, R. T., FREUD, G., JANSE, M., MEIJLER, F. & ARZBAECHER, R. (1970). Total excitation of the isolated human heart. *Circulation*, 41, 899-912.
- ECHT, D. S., LIEBSON, P. R., MITCHELL, L. B., PETERS, R. W., OBIAS-MANNO, D., BARKER, A. H., ARENSBERG, D., BAKER, A., FRIEDMAN, L., GREENE, H. L. & ET AL. (1991). Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med*, 324, 781-8.
- ENRIQUEZ, A., FRANKEL, D. S. & BARANCHUK, A. (2017). Pathophysiology of ventricular tachyarrhythmias : From automaticity to reentry. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*, 28, 149-156.
- FAGGIONI, M., HWANG, H. S., VAN DER WERF, C., NEDEREND, I., KANNANKERIL, P. J., WILDE, A. A. & KNOLLMANN, B. C. (2013). Accelerated sinus rhythm prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and in patients. *Circulation research*, 112, 689-697.
- FENTON, R. A., GALECKAS, K. J. & DOBSON, J. G., JR. (1995). Endogenous adenosine reduces depression of cardiac function induced by beta-adrenergic stimulation during low flow perfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 27, 2373-83.
- FERRARI, G. M., SHULL JR, S., DFOREMAN, R. & JSCHWARTZ, P. (1991). Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circulation research*.
- FISCH, C. (1973). Relation of electrolyte disturbances to cardiac arrhythmias. *Circulation*, 47, 408-419.
- FORTUIN, N. J. & WEISS, J. L. (1977). Exercise stress testing. *Circulation*, 56, 699-712.
- FOZZARD, H. A. 1992. Afterdepolarizations and triggered activity. *Cardiac Adaptation in Heart Failure*, 105-113.
- FRANCIOSI, S., PERRY, F. K. G., ROSTON, T. M., ARMSTRONG, K. R., CLAYDON, V. E. & SANATANI, S. (2017). The role of the autonomic nervous system in arrhythmias and sudden cardiac death. *Auton Neurosci*, 205, 1-11.
- GADSBY, D. C. & CRANFIELD, P. F. (1979). Electrogenic sodium extrusion in cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol*, 73, 819-37.
- GARDIWAL, A., REISSMANN, L. M., KOTLARZ, D., OSWALD, H., KORTE, T., LANDMESSER, U., KLEIN, G. & TEMPLIN, C. (2009). Arrhythmia susceptibility in mice after therapy with beta-catenin-transduced hematopoietic progenitor cells after myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiology*, 114, 199-207.

- GEHRMANN, J., FRANTZ, S., MAGUIRE, C. T., VARGAS, M., DUCHARME, A., WAKIMOTO, H., LEE, R. T. & BERUL, C. I. (2001). Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Research in Cardiology*, 96, 237-250.
- GIOTTI, A., LEDDA, F. & MANNAIONI, P. (1973). Effects of noradrenaline and isoprenaline, in combination with α - and β - receptor blocking substances, on the action potential of cardiac Purkinje fibres. *The Journal of physiology*, 229, 99-113.
- GOMORI, G. (1950). A rapid one-step trichrome stain. *Am J Clin Pathol*, 20, 661-4.
- GUO, J., MI, S., LI, J., LIU, W., YIN, Y. & WEI, Q. (2012). Calcineurin B subunit acts as a potential agent for preventing cardiac ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*, 370, 163-71.
- GUSSAK, I., BRUGADA, P., BRUGADA, J., WRIGHT, R. S., KOPECKY, S. L., CHAITMAN, B. R. & BJERREGAARD, P. (2000). Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology*, 94, 99-102.
- HAN, X. & FERRIER, G. (1992). Ionic mechanisms of transient inward current in the absence of Na (+) - Ca²⁺ exchange in rabbit cardiac Purkinje fibres. *The Journal of physiology*, 456, 19-38.
- HAVERKAMP, W., BREITHARDT, G., CAMM, A. J., JANSE, M. J., ROSEN, M. R., ANTZELEVITCH, C., ESCANDE, D., FRANZ, M., MALIK, M. & MOSS, A. (2000). The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications: report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research*, 47, 219-233.
- HEARSE, D. J. & SUTHERLAND, F. J. (2000). Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol Res*, 41, 597-603.
- HEUSCH, G. & KLEINBONGARD, P. (2016). Ivabradine: Cardioprotection By and Beyond Heart Rate Reduction. *Drugs*, 76, 733-740.
- HIRSCH, J. A. & BISHOP, B. (1981). Respiratory sinus arrhythmia in humans: how breathing pattern modulates heart rate. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 241, H620-H629.
- HOLTER, N. J. (1961). New method for heart studies: continuous electrocardiography of active subjects over long periods is now practical. *Science*, 134, 1214-1220.
- HOTHI, S. S., GURUNG, I. S., HEATHCOTE, J. C., ZHANG, Y., BOOTH, S. W., SKEPPER, J. N., GRACE, A. A. & HUANG, C. L. (2008). Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflugers Arch*, 457, 253-70.

- IBANEZ, B., JAMES, S., AGEWALL, S., ANTUNES, M. J., BUCCIARELLI-DUCCI, C., BUENO, H., CAFORIO, A. L. P., CREA, F., GOUDEVENOS, J. A., HALVORSEN, S., HINDRICKS, G., KASTRATI, A., LENZEN, M. J., PRESCOTT, E., ROFFI, M., VALGIMIGLI, M., VARENHORST, C., VRANCKX, P., WIDIMSKÝ, P. & GROUP, E. S. D. (2017). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 39, 119-177.
- ISSA, MILLER & ZIPES (2019). *Clinical Arrhythmology and Electrophysiology*. Elsevier.
- JANSE, M. J., VAN CAPELLE, F. J., MORSINK, H., KLÉBER, A. G., WILMS-SCHOPMAN, F., CARDINAL, R., D'ALNONCOURT, C. N. & DURRER, D. (1980). Flow of "injury" current and patterns of excitation during early ventricular arrhythmias in acute regional myocardial ischemia in isolated porcine and canine hearts. Evidence for two different arrhythmogenic mechanisms. *Circulation Research*, 47, 151-165.
- JIANG, X., KONG, B., SHUAI, W., SHEN, C., YANG, F., FU, H. & HUANG, H. (2019). Loss of MD1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury and susceptibility to ventricular arrhythmia. *Eur J Pharmacol*, 844, 79-86.
- JOSEPHSON, M. E. & ANTER, E. (2015). Substrate Mapping for Ventricular Tachycardia: Assumptions and Misconceptions. *JACC Clin Electrophysiol*, 1, 341-352.
- JOSEPHSON, M. E., HOROWITZ, L. N., FARSHIDI, A. & KASTOR, J. A. (1978). Recurrent sustained ventricular tachycardia. 1. Mechanisms. *Circulation*, 57, 431-440.
- KAESE, S. & VERHEULE, S. (2012). Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Frontiers in physiology*, 3, 345.
- KARAGUEUZIAN, H. S. & KATZUNG, B. G. (1982). Voltage - clamp studies of transient inward current and mechanical oscillations induced by ouabain in ferret papillary muscle. *The Journal of physiology*, 327, 255-271.
- KASS, R., LEDERER, W., TSIEN, R. & WEINGART, R. (1978). Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. *The Journal of physiology*, 281, 187-208.
- KLEINDIENST, A., BATAULT, S., BELAIDI, E., TANGUY, S., ROSSELIN, M., BOULGHOBRA, D., MEYER, G., GAYRARD, S., WALTHER, G., GENY, B., DURAND, G., CAZORLA, O. & REBOUL, C. (2016). Exercise does not activate the beta3 adrenergic receptor-eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Res Cardiol*, 111, 40.
- KOHN, D. F., MARTIN, T. E., FOLEY, P. L., MORRIS, T. H., SWINDLE, M. M., VOGLER, G. A. & WIXSON, S. K. (2007). Guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46, 97-108.
- KOLLER, B. S., KARASIK, P. E., SOLOMON, A. J. & FRANZ, M. R. (1995). Relation between repolarization and refractoriness during programmed electrical stimulation in the human right ventricle. Implications for ventricular tachycardia induction. *Circulation*, 91, 2378-84.

- KORTE, T., FUCHS, M., GUENER, Z., V BONIN, J., DE SOUSA, M., NIEHAUS, M., TEBBENJOHANNIS, J. & DREXLER, H. (2002). In-vivo electrophysiological study in mice with chronic anterior myocardial infarction. *J Interv Card Electrophysiol*, 6, 121-32.
- KUMMER, W. (1987). Galanin- and neuropeptide Y-like immunoreactivities coexist in paravertebral sympathetic neurones of the cat. *Neurosci Lett*, 78, 127-31.
- LANCET, T. (1985). ISOFLURANE. *The Lancet*.
- LAWRIE, D., HIGGINS, M., GODMAN, M., OLIVER, M., JULIAN, D. & DONALD, K. (1968). Ventricular fibrillation complicating acute myocardial infarction. *The Lancet*, 292, 523-528.
- LAZARENKO, R. M., WILLCOX, S. C., SHU, S., BERG, A. P., JEVTOVIC-TODOROVIC, V., TALLEY, E. M., CHEN, X. & BAYLISS, D. A. (2010). Motoneuronal TASK channels contribute to immobilizing effects of inhalational general anesthetics. *J Neurosci*, 30, 7691-704.
- LEDERER, W. & TSIEN, R. (1976). Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres. *The Journal of physiology*, 263, 73-100.
- LEE, P., QUINTANILLA, J. G., ALFONSO-ALMAZÁN, J. M., GALÁN-ARRIOLA, C., YAN, P., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, J., PÉREZ-CASTELLANO, N., PÉREZ-VILLACASTÍN, J., IBAÑEZ, B., LOEW, L. M. & FILGUEIRAS-RAMA, D. (2019). In vivo ratiometric optical mapping enables high-resolution cardiac electrophysiology in pig models. *Cardiovasc Res*, 115, 1659-1671.
- LI, H., GUO, W., YAMADA, K. A. & NERBONNE, J. M. (2004). Selective elimination of IK_{slow1} in mouse ventricular myocytes expressing a dominant negative Kv1.5 α subunit. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286, H319-H328.
- LIAO, S. Y., LIU, Y., SIU, C. W., ZHANG, Y., LAI, W. H., AU, K. W., LEE, Y. K., CHAN, Y. C., YIP, P. M., WU, E. X., WU, Y., LAU, C. P., LI, R. A. & TSE, H. F. (2010). Proarrhythmic risk of embryonic stem cell-derived cardiomyocyte transplantation in infarcted myocardium. *Heart Rhythm*, 7, 1852-9.
- LINDSEY, M. L., BOLLI, R., CANTY, J. M., JR., DU, X. J., FRANGOGIANNIS, N. G., FRANTZ, S., GOURDIE, R. G., HOLMES, J. W., JONES, S. P., KLONER, R. A., LEFER, D. J., LIAO, R., MURPHY, E., PING, P., PRZYKLENK, K., RECCHIA, F. A., SCHWARTZ LONGACRE, L., RIPPLINGER, C. M., VAN EYK, J. E. & HEUSCH, G. (2018). Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 314, H812-h838.
- LONDON, B. (2001a). Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 12, 1089-1091.
- LONDON, B. (2001b). Use of transgenic and gene-targeted mice to study K⁺ channel function in the cardiovascular system. *Potassium Channels in Cardiovascular Biology*, 177-191.
- LOPATIN, A. & NICHOLS, C. (2001). Inward rectifiers in the heart: an update on IK₁. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33, 625-638.

- LUNGKAPHIN, A., PONGCHAIDECHA, A., PALEE, S., ARJINAJARN, P., POMPIMON, W. & CHATTIPAKORN, N. (2015). Pinocembrin reduces cardiac arrhythmia and infarct size in rats subjected to acute myocardial ischemia/reperfusion. *Appl Physiol Nutr Metab*, 40, 1031-7.
- MAGUIRE, C. T., WAKIMOTO, H., PATEL, V. V., HAMMER, P. E., GAUVREAU, K. & BERUL, C. I. (2003). Implications of ventricular arrhythmia vulnerability during murine electrophysiology studies. *Physiol Genomics*, 15, 84-91.
- MAKIMOTO, H., ZIELKE, S., CLASEN, L., LIN, T., GERGURI, S., MÜLLER, P., SCHMIDT, J., BEJINARIU, A., KURT, M. & BRINKMEYER, C. (2020). Clinical significance of precedent asymptomatic non-sustained ventricular tachycardias on subsequent ICD interventions and heart failure hospitalization in primary prevention ICD patients. *European journal of medical research*, 25, 1-9.
- MARTIN, C. A., MATTHEWS, G. D. K. & HUANG, C. L.-H. (2012). Sudden cardiac death and inherited channelopathy: the basic electrophysiology of the myocyte and myocardium in ion channel disease. *Heart*, 98, 536-543.
- MEIJERS, W. C., VAN DER VELDE, A. R., PASCUAL-FIGAL, D. A. & DE BOER, R. A. (2015). Galectin-3 and post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Eur J Pharmacol*, 763, 115-21.
- MERENTIE, M., LIPPONEN, J. A., HEDMAN, M., HEDMAN, A., HARTIKAINEN, J., HUUSKO, J., LOTTONEN-RAIKASLEHTO, L., PARVIAINEN, V., LAIDINEN, S., KARJALAINEN, P. A. & YLÄ-HERTTUALA, S. (2015). Mouse ECG findings in aging, with conduction system affecting drugs and in cardiac pathologies: Development and validation of ECG analysis algorithm in mice. *Physiol Rep*, 3.
- MERX, M. W., GORRESSEN, S., VAN DE SANDT, A. M., CORTESE-KROTT, M. M., OHLIG, J., STERN, M., RASSAF, T., GÖDECKE, A., GLADWIN, M. T. & KELM, M. (2013). Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Basic Research in Cardiology*, 109, 398.
- MÉRY, P.-F., ABI-GERGES, N., VANDECASTEELE, G., JUREVICIUS, J., ESCHENHAGEN, T. & FISCHMEISTER, R. (1997). Muscarinic regulation of the L-type calcium current in isolated cardiac myocytes. *Life sciences*, 60, 1113-1120.
- MICHAEL, L. H., ENTMAN, M. L., HARTLEY, C. J., YOUKER, K. A., ZHU, J., HALL, S. R., HAWKINS, H. K., BERENS, K. & BALLANTYNE, C. M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*, 269, H2147-54.
- MITCHELL, G. F., JERON, A. & KOREN, G. (1998). Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 274, H747-H751.
- MOHAMED, U., NAPOLITANO, C. & PRIORI, S. G. (2007). Molecular and electrophysiological bases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 18, 791-7.
- MORADY, F., KADISH, A., DE BUILEIR, M., KOU, W. H., CALKINS, H., SCHMALTZ, S., ROSENHECK, S. & SOUSA, J. (1991). Prospective comparison of a conventional and an accelerated protocol for programmed ventricular stimulation in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 83, 764-773.

- MORITA, H., ZIPES, D. P., MORITA, S. T. & WU, J. (2007). Differences in arrhythmogenicity between the canine right ventricular outflow tract and anteroinferior right ventricle in a model of Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, 4, 66-74.
- MUGELLI, A., CERBAI, E., AMERINI, S. & VISENTIN, S. (1986). The role of temperature on the development of oscillatory afterpotentials and triggered activity. *J Mol Cell Cardiol*, 18, 1313-6.
- MURESAN, L., CISMARU, G., MARTINS, R. P., BATAGLIA, A., ROSU, R., PUIU, M., Gusetu, G., MADA, R. O., MURESAN, C., ISPAS, D. R., LE BOUAR, R., DIENE, L. L., RUGINA, E., LEVY, J., KLEIN, C., SELLAL, J. M., POUILL, I. M., LAURENT, G. & DE CHILLOU, C. (2019). Recommendations for the use of electrophysiological study: Update 2018. *Hellenic J Cardiol*, 60, 82-100.
- NIERMANN, C., GORRESSEN, S., KLIER, M., GOWERT, N. S., BILLUART, P., KELM, M., MERX, M. W. & ELVERS, M. (2016). Oligophrenin1 protects mice against myocardial ischemia and reperfusion injury by modulating inflammation and myocardial apoptosis. *Cell Signal*, 28, 967-78.
- OLDE NORDKAMP, L. R., WILDE, A. A., TIJSEN, J. G., KNOPS, R. E., VAN DESSEL, P. F. & DE GROOT, J. R. (2013). The ICD for primary prevention in patients with inherited cardiac diseases: indications, use, and outcome: a comparison with secondary prevention. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 6, 91-100.
- PAPE H-C., KLINKE R., KURTZ A. & S., S. (2014). Physiologie. *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- PATEL, V. V., ARAD, M., MOSKOWITZ, I. P., MAGUIRE, C. T., BRANCO, D., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. E. & BERUL, C. I. (2003). Electrophysiologic characterization and postnatal development of ventricular pre-excitation in a mouse model of cardiac hypertrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 42, 942-51.
- PERALTA, E. G., WINSLOW, J. W., PETERSON, G. L., SMITH, D. H., ASHKENAZI, A., RAMACHANDRAN, J., SCHIMMERLIK, M. I. & CAPON, D. J. (1987). Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science*, 236, 600-605.
- PETRIC, S., CLASEN, L., VAN WEßEL, C., GEDULDIG, N., DING, Z., SCHULLENBERG, M., MERSMANN, J., ZACHAROWSKI, K., ALLER, M. I. & SCHMIDT, K. G. (2012). In vivo electrophysiological characterization of TASK-1 deficient mice. *Cellular physiology and biochemistry*, 30, 523-537.
- PETZ, A., GRANDOCH, M., GORSKI, D. J., ABRAMS, M., PIROTH, M., SCHNECKMANN, R., HOMANN, S., MULLER, J., HARTWIG, S., LEHR, S., YAMAGUCHI, Y., WIGHT, T. N., GORRESSEN, S., DING, Z., KOTTER, S., KRUGER, M., HEINEN, A., KELM, M., GODECKE, A., FLOGEL, U. & FISCHER, J. W. (2019). Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury. *Circ Res*, 124, 1433-1447.
- PICCINI, J. P., BERGER, J. S. & O'CONNOR, C. M. (2009). Amiodarone for the prevention of sudden cardiac death: a meta-analysis of randomized controlled trials. *European heart journal*, 30, 1245-1253.
- PODRID, P. J., FUCHS, T. & CANDINAS, R. (1990). Role of the sympathetic nervous system in the genesis of ventricular arrhythmia. *Circulation*, 82, 1103-13.

- POTTER, E. K. & SMITH-WHITE, M. A. (2005). Galanin modulates cholinergic neurotransmission in the heart. *Neuropeptides*, 39, 345-8.
- PRIORI, S. G., BLOMSTROM-LUNDQVIST, C., MAZZANTI, A., BLOM, N., BORGGREFE, M., CAMM, J., ELLIOTT, P. M., FITZSIMONS, D., HATALA, R., HINDRICKS, G., KIRCHHOF, P., KJELDSEN, K., KUCK, K. H., HERNANDEZ-MADRID, A., NIKOLAOU, N., NOREKVAL, T. M., SPAULDING, C. & VAN VELDHUISEN, D. J. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Europace*, 17, 1601-87.
- PRIORI, S. G. & CORR, P. B. (1990). Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 258, H1796-H1805.
- QU, Z. & WEISS, J. N. (2015). Mechanisms of ventricular arrhythmias: from molecular fluctuations to electrical turbulence. *Annual review of physiology*, 77, 29-55.
- SABIR, I. N., KILLEEN, M. J., GRACE, A. A. & HUANG, C. L.-H. (2008). Ventricular arrhythmogenesis: insights from murine models. *Progress in biophysics and molecular biology*, 98, 208-218.
- SANCHEZ, J. A., RODRIGUEZ-SINOVAS, A., FERNANDEZ-SANZ, C., RUIZ-MEANA, M. & GARCIA-DORADO, D. (2011). Effects of a reduction in the number of gap junction channels or in their conductance on ischemia-reperfusion arrhythmias in isolated mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H2442-53.
- SANKARANARAYANAN, R., KISTAMÁS, K., GREENSMITH, D. J., VENETUCCI, L. A. & EISNER, D. A. (2017). Systolic [Ca²⁺] i regulates diastolic levels in rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology*, 595, 5545-5555.
- SCHMITT, F. O. & ERLANGER, J. (1928). Directional differences in the conduction of the impulse through heart muscle and their possible relation to extrasystolic and fibrillary contractions. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 87, 326-347.
- SCHONBERGER, T., JURGENS, T., MULLER, J., ARMBRUSTER, N., NIERMANN, C., GORRESSEN, S., SOMMER, J., TIAN, H., DI PAOLO, G., SCHELLER, J., FISCHER, J. W., GAWAZ, M. & ELVERS, M. (2014). Pivotal role of phospholipase D1 in tumor necrosis factor-alpha-mediated inflammation and scar formation after myocardial ischemia and reperfusion in mice. *Am J Pathol*, 184, 2450-64.
- SCHRICKEL, J. W., BIELIK, H., YANG, A., SCHIMPF, R., SHLEVKOV, N., BURKHARDT, D., MEYER, R., GROHÉ, C., FINK, K. & TIEMANN, K. (2002). Induction of atrial fibrillation in mice by rapid transesophageal atrial pacing. *Basic research in cardiology*, 97, 452-460.
- SCHRICKEL, J. W., BRIXIUS, K., HERR, C., CLEMEN, C. S., SASSE, P., REETZ, K., GROHÉ, C., MEYER, R., TIEMANN, K. & SCHRÖDER, R. (2007). Enhanced heterogeneity of myocardial conduction and severe cardiac electrical instability in annexin A7-deficient mice. *Cardiovascular research*, 76, 257-268.

- SCHWARTZ, P. J., LA, M. R. & VANOLI, E. (1992). Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation*, 85, 177-91.
- SHEN, M. J. & ZIPES, D. P. (2014). Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. *Circulation research*, 114, 1004-1021.
- SHIMIZU, W., NODA, T., TAKAKI, H., KURITA, T., NAGAYA, N., SATOMI, K., SUYAMA, K., AIHARA, N., KAMAKURA, S. & SUNAGAWA, K. (2003). Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 41, 633-642.
- SHIVKUMAR, K., AJIJOLA, O. A., ANAND, I., ARMOUR, J. A., CHEN, P. S., ESLER, M., FERRARI, G. M., FISHBEIN, M. C., GOLDBERGER, J. J. & HARPER, R. M. (2016). Clinical neurocardiology defining the value of neuroscience - based cardiovascular therapeutics. *The Journal of physiology*, 594, 3911-3954.
- SONG, L., ALCALAI, R., ARAD, M., WOLF, C. M., TOKA, O., CONNER, D. A., BERUL, C. I., ELДАР, M., SEIDMAN, C. E. & SEIDMAN, J. G. (2007). Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest*, 117, 1814-23.
- SONG, Y., SHAN, J. G., XUE, Z., WANG, S. Y., XU, H., LIU, Y., GUO, Y. S. & REN, X. (2016). Remote Postconditioning Induced by Trauma Protects the Mouse Heart against Ischemia Reperfusion Injury. Involvement of the Neural Pathway and Molecular Mechanisms. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 30, 271-280.
- SPANNBAUER, A., TRAXLER, D., LUKOVIC, D., ZLABINGER, K., WINKLER, J., GUGERELL, A., FERDINANDY, P., HAUSENLOY, D. J., PAVO, N., EMMERT, M. Y., HOERSTRUP, S. P., JAKAB, A., GYÖNGYÖSI, M. & RIESENHUBER, M. (2019). Effect of Ischemic Preconditioning and Postconditioning on Exosome-Rich Fraction microRNA Levels, in Relation with Electrophysiological Parameters and Ventricular Arrhythmia in Experimental Closed-Chest Reperfused Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci*, 20.
- SPEERSCHNEIDER, T. & THOMSEN, M. B. (2013). Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta Physiologica*, 209, 262-271.
- SPINALE, F. G. (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiological reviews*, 87, 1285-1342.
- SRINIVASAN, N. T., SCHILLING, RICHARD J (2018). Sudden cardiac death and arrhythmias. *Arrhythmia & electrophysiology review*, 7, 111.
- STABLES, C. L. & CURTIS, M. J. (2009). Development and characterization of a mouse in vitro model of ischaemia-induced ventricular fibrillation. *Cardiovascular Research*, 83, 397-404.
- TAMAOKI, N. (2001). The rasH2 transgenic mouse: nature of the model and mechanistic studies on tumorigenesis. *Toxicol Pathol*, 29 Suppl, 81-9.

- THYGESEN, K., ALPERT, J. S., JAFFE, A. S., CHAITMAN, B. R., BAX, J. J., MORROW, D. A., WHITE, H. D., MICKLEY, H., CREA, F., VAN DE WERF, F., BUCCIARELLI-DUCCI, C., KATUS, H. A., PINTO, F. J., ANTMAN, E. M., HAMM, C. W., DE CATERINA, R., JANUZZI, J. L., JR., APPLE, F. S., ALONSO GARCIA, M. A., UNDERWOOD, S. R., CANTY, J. M., JR., LYON, A. R., DEVEREAUX, P. J., ZAMORANO, J. L., LINDAHL, B., WEINTRAUB, W. S., NEWBY, L. K., VIRMANI, R., VRANCKX, P., CUTLIP, D., GIBBONS, R. J., SMITH, S. C., ATAR, D., LUEPKER, R. V., ROBERTSON, R. M., BONOW, R. O., STEG, P. G., O'GARA, P. T. & FOX, K. A. A. (2018). [Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)]. *Kardiol Pol*, 76, 1383-1415.
- TOMASELLI, G. F. & ZIPES, D. P. (2004). What causes sudden death in heart failure? *Circulation research*, 95, 754-763.
- TSE, G. & YAN, B. P. (2017). Traditional and novel electrocardiographic conduction and repolarization markers of sudden cardiac death. *Europace*, 19, 712-721.
- UEDA, N., ZIPES, D. P. & WU, J. (2006). Coronary occlusion and reperfusion promote early afterdepolarizations and ventricular tachycardia in a canine tissue model of type 3 long QT syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H607-12.
- VAN DER WERF, C., KANNANKERIL, P. J., SACHER, F., KRAHN, A. D., VISKIN, S., LEENHARDT, A., SHIMIZU, W., SUMITOMO, N., FISH, F. A. & BHUIYAN, Z. A. (2011). Flecainide therapy reduces exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of the American College of Cardiology*, 57, 2244-2254.
- VAN RIJEN, H. V., VAN VEEN, T. A., VAN KEMPEN, M. J., WILMS-SCHOPMAN, F. J., POTSE, M., KRUEGER, O., WILLECKE, K., OPTHOF, T., JONGSMA, H. J. & DE BAKKER, J. M. (2001). Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation*, 103, 1591-1598.
- VASEGHI, M., BARWAD, P., MALAVASSI CORRALES, F. J., TANDRI, H., MATHURIA, N., SHAH, R., SORG, J. M., GIMA, J., MANDAL, K., SAENZ MORALES, L. C., LOKHANDWALA, Y. & SHIVKUMAR, K. (2017). Cardiac Sympathetic Denervation for Refractory Ventricular Arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*, 69, 3070-3080.
- VON MERING, C., KRAUSE, R., SNEL, B., CORNELL, M., OLIVER, S. G., FIELDS, S. & BORK, P. (2002). Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*, 417, 399.
- VRACKO, R., THORNING, D. & FREDERICKSON, R. G. (1991). Nerve fibers in human myocardial scars. *Human pathology*, 22, 138-146.
- WALKER, M., CURTIS, M., HEARSE, D., CAMPBELL, R., JANSE, M., YELLON, D., COBBE, S., COKER, S., HARNESS, J. & HARRON, D. (1988). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovascular research*, 22, 447-455.
- WANG, X., WANG, J., TU, T., IYAN, Z., MUNGUN, D., YANG, Z. & GUO, Y. (2018). Remote Ischemic Postconditioning Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibition of the RAGE-HMGB1 Pathway. *Biomed Res Int*, 2018, 4565630.
- WEISS, J. N., GARFINKEL, A., KARAGUEUZIAN, H. S., CHEN, P.-S. & QU, Z. (2010). Early afterdepolarizations and cardiac arrhythmias. *Heart rhythm*, 7, 1891-1899.

- WILLIAMSON, A. J., SOARES, J. H., HENAO-GUERRERO, N., COUNCIL-TROCHE, R. M. & PAVLISKO, N. D. (2018). Cardiovascular and respiratory effects of two doses of fentanyl in the presence or absence of bradycardia in isoflurane-anesthetized dogs. *Vet Anaesth Analg*, 45, 423-431.
- WIT, A. L. & BOYDEN, P. A. (2007). Triggered activity and atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 4, S17-23.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017). Cardiovascular Diseases.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2018). *Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY)* [Online]. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/: World Health Organizations. [Accessed 21.08.2018 2018].
- YAMAMOTO, S., MATSUI, K., SASABE, M. & OHASHI, N. (2002). Effect of an orally active Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, SMP-300, on experimental angina and myocardial infarction models in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39, 234-41.
- YAMAUCHI, S., YAMAKI, M., WATANABE, T., YUUKI, K., KUBOTA, I. & TOMOIKE, H. (2002). Restitution properties and occurrence of ventricular arrhythmia in LQT2 type of long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 13, 910-4.
- YANG, X. P., LIU, Y. H., RHALEB, N. E., KURIHARA, N., KIM, H. E. & CARRETERO, O. A. (1999). Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol*, 277, H1967-74.
- YANOWITZ, F., PRESTON, J. B. & ABILDSSKOV, J. (1966). Functional distribution of right and left stellate innervation to the ventricles. *Circ Res*, 18, 416-428.
- YU, Y., YE, L., LI, Y. G., BURKIN, D. J. & DUAN, D. D. (2016). Heart-specific overexpression of the human short CLC-3 chloride channel isoform limits myocardial ischemia-induced ERP and QT prolongation. *Int J Cardiol*, 214, 218-24.
- ZHANG, Y., POST, W. S., DALAL, D., BLASCO-COLMENARES, E., TOMASELLI, G. F. & GUALLAR, E. (2011). QT-interval duration and mortality rate: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Archives of internal medicine*, 171, 1727-1733.
- ZHANG, Y., TAKAGAWA, J., SIEVERS, R. E., KHAN, M. F., VISWANATHAN, M. N., SPRINGER, M. L., FOSTER, E. & YEGHIAZARIANS, Y. (2007). Validation of the wall motion score and myocardial performance indexes as novel techniques to assess cardiac function in mice after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H1187-92.
- ZIPES, D. P. & WELLENS, H. J. (1998). Sudden cardiac death. *Circulation*, 98, 2334-51.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm, Direktor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, in dessen Klinik ich diese Promotion im kardiologischen Forschungslabor unter Leitung von Frau Prof. Dr. Dr. rer. nat. Miriam Cortese-Krott und Herrn Prof Dr. rer. nat. Norbert Gerdes absolvieren durfte.

An dieser Stelle bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Hisaki Makimoto für die Anregung des Promotionsthemas, das Vermitteln wissenschaftlicher Fähigkeiten und sein herzliches Engagement als Doktorvater. Bei Frau Prof. Dr. med. Maria Grandoch bedanke ich mich für lehrreiches Feedback als Cobetreuerin. Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Lukas Clasen für das Vermitteln grundlegender labortechnischer Fähigkeiten und stetige Erreichbarkeit sowie die Hilfe zur technischen Durchführung der Versuche.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, insbesondere Frau Stefanie Becher, für die Bereitstellung und Durchführung der IR Operation, viele hilfreiche Tipps und für die sehr freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ebenso danke ich allen Versuchstieren, die Versuche im Gebiet der elektrophysiologischen Grundlagenforschung erst möglich machen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützt und mein Studium und meine Promotion erst ermöglicht haben.