

2. Material und Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes nach Erteilung der Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben „G128“, die am 18.01.2002 erteilt wurde. Der tierexperimentelle Teil dieser Arbeit wurde gemäß den Richtlinien des Deutschen Ethikrates und der US-Gesundheitsbehörde NIH und mit Billigung der Ethikkommission des CBF durchgeführt.

2.1. Studiendesign

Die Tiere wurden vor Beginn der Studie randomisiert in folgende Gruppen eingeteilt, um die gestellten Fragen zu beantworten:

1. Gruppe : Mäuse mit einem humanen Wildtyp Troponin T (TNT-WT)
2. Gruppe: Mäuse mit einem humanen Troponin T mit der Mutation I79N (TNT-I79N)
3. Gruppe: Mäuse mit einem humanen Wildtyp Troponin T behandelt mit Diltiazem
4. Gruppe: Mäuse mit einem humanen Troponin T mit der Mutation I79N behandelt mit Diltiazem

Es wurden insgesamt vier Gruppen mit jeweils zehn Mäusen im Alter von 3 bis 5 Monaten untersucht. Alle Tiere wurden 50 Tage lang mit Diltiazem oder Placebo behandelt, bevor die hämodynamische Messung durchgeführt wurde.

2.2. Mausstämme

In dieser Studie wurden transgene Mäuse, welche entweder ein humanes Troponin T ohne Mutation oder das humane Troponin T mit der Mutation I79N exprimierten, verwendet. Die transgenen Mäuse beruhen auf dem Stamm „B6/SJL“.

Die Tiere wurden freundlicherweise von Ph.D Todd Miller [53] aus der University of Miami, School of Medicine, zur Verfügung gestellt. Hergestellt wurden die Mäuse durch

ein transgenes Vektorkonstrukt. Hierbei wird die cDNA des transgenen humanen Proteins in embryonale Stammzellen von Mäusen gespritzt und über zelleigene Enzyme durch so genanntes „*crossing over*“ in die DNA eingebaut. Die nun transgen veränderten embryonalen Stammzellen wurden in zwei Tage alte Mäuseembryonen gespritzt und dann „pseudo-schwangeren“ Mäusen eingesetzt.

Dann wurde durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) die heterozygoten „founder“ Mäuse identifiziert und per Kreuzung mit nicht-transgenen B6/SJL Mäusen eine stabile transgene und homozygote Linie erstellt.

2.3. Pharmakologische Behandlung

Diltiazem ist ein Kalzium-Antagonist. Es blockiert spannungsabhängige Kalzium-Kanäle in der Wand der Gefäßmuskulatur und verhindert, dass Kalzium in die Muskelzellen einströmt. Zusätzlich wirkt Diltiazem direkt auf den Herzmuskel: es blockiert dort Kalziumkanäle der Muskelfasern des Herzens - das Herz schlägt langsamer, und die Schlagkraft lässt nach. Die in dieser Studie gewählte Dosierung hatte allerdings keinen signifikanten Blutdruck- oder Herzfrequenzabfall zur Folge.

Die behandelten Tiere (Gruppe 3 und 4) wurden mit 2,5 mg/pro KG Körpergewicht/Tag Diltiazem behandelt. Das entspricht einer Dosis, die bei Mäusen etabliert ist [43]. Die Tiere wurden einmal am Tag *per gavage* (oral) behandelt, das heißt, es wurde mit einer Spritze das in Wasser (0,1 ml) gelöste Diltiazem direkt in den Magen gespritzt. Diese Form der Behandlung ist genauer als eine Applikation über das Trinkwasser, da das Trinkvolumen der Mäuse und die Lösung des Pharmakons im Trinkwasser variiert. Die nicht mit Diltiazem behandelten Mäuse wurden nur mit Wasser (0,1 ml) behandelt, um einen eventuellen Einfluss der Gavagierung auf die Tiere auszugleichen.

2.4. Tierhaltung

Alle Mäuse wurden während des gesamten Versuchszeitraums in einem Tierstall der Sicherheitsstufe S1 gehalten. Die Räume standen unter Überdruck und wurden nur nach Händedesinfektion mit Schutzkleidung, Handschuhen, Mundschutz und Kopphaube betreten. Die Tiere wurden auf staubfreiem Weichholzgranulat in einem

„Makrolonkäfig“ des Typs II gehalten. Die Raumtemperatur lag konstant bei 20°C mit 50- 60 % Luftfeuchtigkeit. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit Altromin 1324 Alleinfutter (Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser. Der Gesundheitszustand wurde täglich durch das Pflegepersonal sowie durch monatliche veterinärmedizinische Kontrollen überwacht.

2.5. Hämodynamik-Messung

Die Aufzeichnung des Herzzyklus als Druck-Volumen-Kurve mittels der Konduktanzmethode ist die genaueste Methode um die linksventrikuläre systolische und diastolische Pumpfunktion des Herzens zu beschreiben. Eine große Anzahl von volumenabhängigen und auch volumenunabhängigen Parametern steht durch diese Analyse zur Verfügung und lässt einen genauen Rückschluss auf die kardiale Funktion zu. Die Aufzeichnung von Druck-Volumen-Kurven gilt daher als Goldstandard der Hämodynamik-Messung bei Menschen und großen Tieren [37].

Durch die Entwicklung eines Konduktanz-Katheters für Kleintiermodelle ist es nun gelungen, diese Druck-Volumen-Kurven auch *in vivo* im Maus- und Rattenmodell aufzuzeichnen [39]. So konnten wir zeigen, dass es mit dieser Technik möglich ist, die kardialen Auswirkungen z.B. nach Myokarditis [54] im Mausmodell zu beschreiben. Die Methode ist auch von besonderem Interesse, wenn es darum geht, den kardialen Phänotyp genetisch veränderter Kleintiere zu untersuchen [55].

2.6. Technik des Konduktanz-Katheters

Der Druck-Volumen-Katheter kann durch Messung der Konduktanz, also der Leitfähigkeit des Blutes, das Volumen im linken Ventrikel bestimmen. Der Katheter besteht aus vier Elektroden und einem Drucksensor. Die Elektroden sind paarweise über und unter dem Drucksensor angebracht. Die Messung von kardialen Blutvolumina mittels dieser Elektroden beruht auf einem elektrischen Feld, welches durch die äußeren Elektroden im linken Ventrikel aufgebaut wird. Die Potentialunterschiede an den inneren Elektroden werden kontinuierlich aufgezeichnet und so die Konduktanz zwischen den Elektroden im Ventrikel zu messen.

Durch die Formel

$$V_i(t) = (1/\alpha) (pL^2) [G_i(t)-G_{pi}]$$

wird nun das intraventrikuläre Volumen V_i errechnet. Hierbei ist α ein Volumen-Kalibrationsfaktor, p der elektrische Widerstand des Blutes, L der Abstand zwischen den Elektroden, G_i beschreibt die Gesamt-Konduktanz und G_{pin} die Konduktanz des umgebenden Gewebes, die so genannte „parallele Konduktanz“. Durch diese Berechnung ist es möglich, in Echtzeit und in vivo Druck und Volumen aufzuzeichnen, um so Druck-Volumen-Kurven zu erstellen.

2.7. Operativer Eingriff

2.7.1. Narkose

Zur Induktion der Narkose wurde Thiopental (Glaxo-Smith) verwendet. Hierbei wurden 125 $\mu\text{g}/\text{kgKG}$ intraperitoneal gespritzt. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde ein Schmerzreiz gesetzt und die Dosis bei Bedarf um 10% erhöht.

2.7.2. Intubation und Ventilation

Zur Intubation wurde die Maus in Rückenlage fixiert und der Hals überstreckt. Danach wurde unter visueller Kontrolle ein Plastiktubus in die Trachea geschoben und das Tier kontrolliert ventiliert (Mouse Minivent, Hugo Sachs, Deutschland). Die Ventilation mit Raumluft wurde mit einem Hubvolumen von 8 $\mu\text{l}/\text{g}$ Körpergewicht und 200 Zügen pro Minute durchgeführt. Der Erfolg der Intubation wurde durch visuelle Kontrolle der Thoraxbewegung kontrolliert.

2.7.3. Linksventrikuläre Katheterisierung

Es wurde ein Hautschnitt in Längsrichtung von kaudal nach kranial durchgeführt und sowohl die Halsmuskulatur als auch die Speicheldrüsen durchtrennt, wobei ein Blutverlust konsequent vermieden wurde. Eventuelle Blutungen wurden koaguliert. Die

rechte Arteria carotis communis wurde dargestellt und sowohl proximal als auch distal wurden Blutsperrern angelegt. Mit Mikroinstrumentarium wurde der Konduktanzkatheter in das Gefäß eingebracht und danach retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt und durch ständige Kontrolle der Druck-Volumen-Kurve optimal platziert.

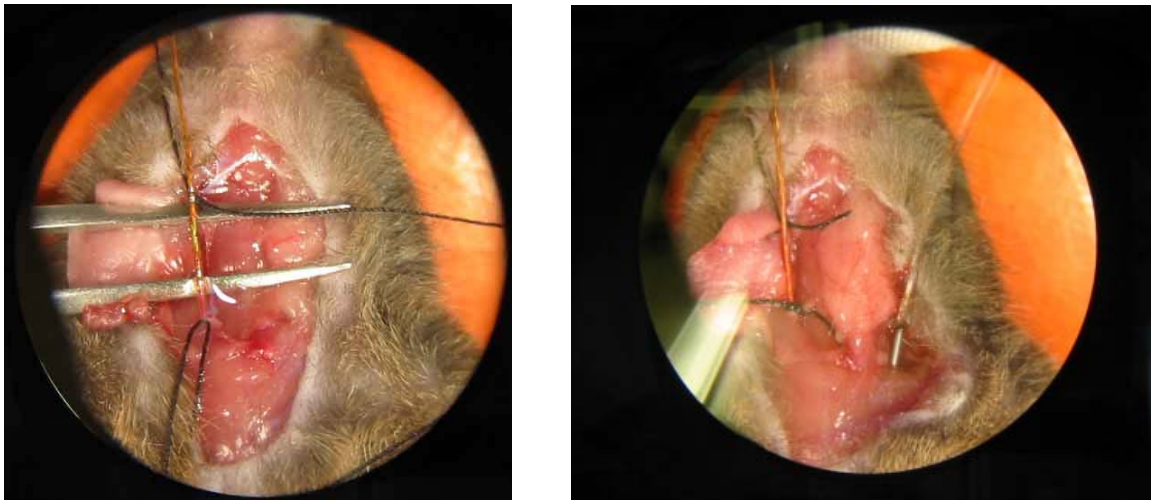


Abbildung 7: Einführen des Konduktanzkatheters in die Arteria carotis

2.7.4. Kalibrierung des Konduktanz-Volumen-Signals

Wie beschrieben ist das aufgezeichnete Volumensignal ein Gesamtvolumen aus der Konduktanz des Blutes und der parallelen Konduktanz. Durch Infusion von hypertoner Kochsalzlösung kann die parallele Konduktanz ermittelt und so das reale Blutvolumen errechnet werden [56]. Hierzu wird die linke Vena jugularis punktiert. Anschließend werden 5µl 10%-NaCl infundiert. Das Konduktanzsignal im linken Ventrikel nimmt durch den Einstrom der hypertonen NaCl rapide zu, obwohl das Volumen unverändert bleibt. Das zeigt, dass das Konduktanzsignal die Osmolarität des Volumens im linken Ventrikel angibt und daraus das Blutvolumen errechnet werden kann.

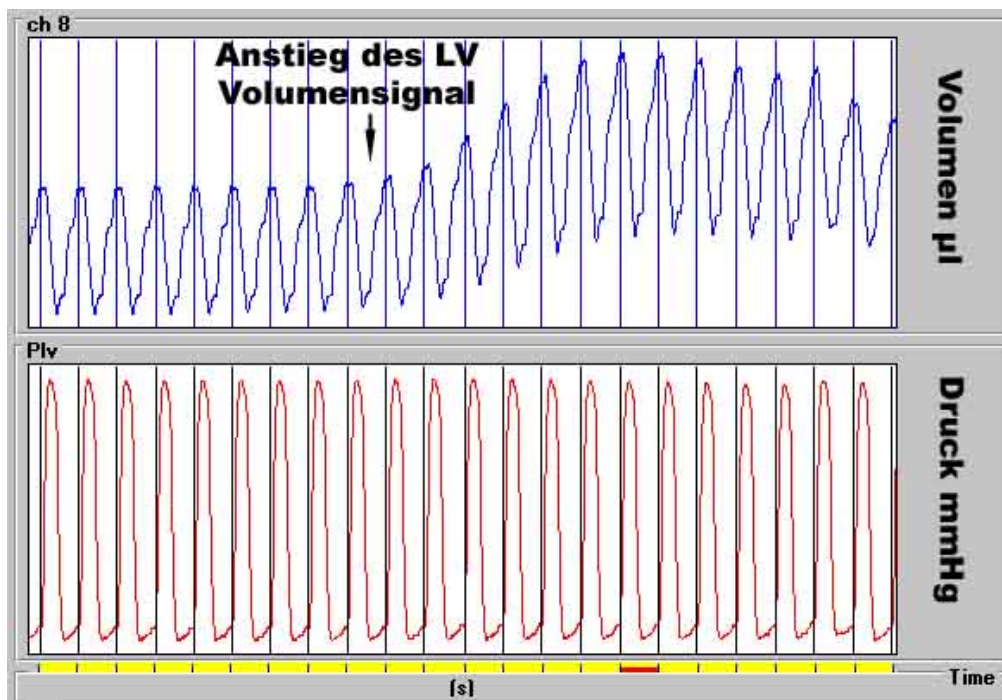


Abbildung 8: Anstieg des Konduktanzsignals während 10% NaCl-Bolus

2.8. Aufzeichnung der Hämodynamik

2.8.1. Basale Hämodynamik

2.8.2. vorlastabhängige Werte

Zur Aufzeichnung der basalen Hämodynamik wurde der Katheter optimal im linken Ventrikel platziert und danach fixiert. Für jede Aufzeichnung der Hämodynamik wurde die Ventilation für etwa fünf Sekunden abgestellt und in Apnoe-Druck-Volumen-Kurven aufgezeichnet. Die dabei gewonnenen ca. 30 Herzschläge wurden später analysiert und als Mittelwert aller Schläge ausgewertet.

2.8.3. vorlastunabhängige Werte

Vena-cava-Okklusions-Hämodynamik: Zur Aufzeichnung von vorlastunabhängigen Hämodynamik-Parametern wurde die Vorlast gesenkt und gleichzeitig die Hämodynamik im linken Ventrikel gemessen. Zur Senkung der Vorlast wurde die Vena cava inferior nach der Eröffnung des Peritoneums mit einer Pinzette für etwa 3

Sekunden abgeklemmt. Dadurch fiel der Druck im linken Ventrikel und das Volumen verringerte sich, so dass die Druck-Volumen-Kurven abfielen und nach links verschoben wurden.

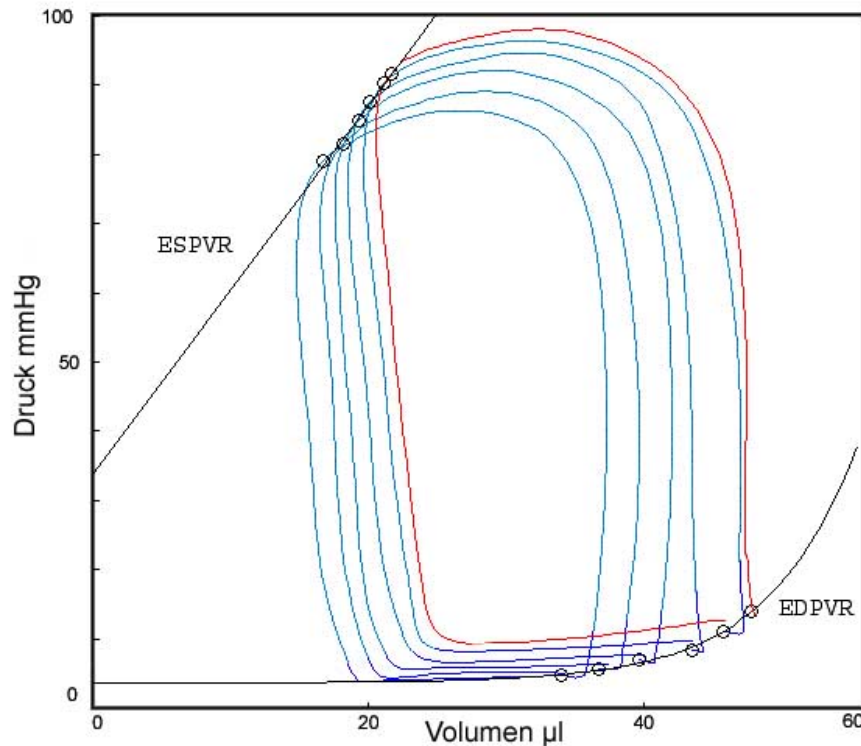


Abbildung 9: Druck-Volumen-Kurven einer Maus während der Vorlastreduktion. Eingezeichneter ESPVR und EDPVR

Wir analysierten aus diesen Messungen als Maß für die systolische Funktion:

Maximaler linksventrikulärer Druck (LVP max. mmHg): Der maximale linksventrikuläre Druck ist der höchste gemessene Druck im linken Ventrikel und ist daher ein Parameter der systolischen Herzfunktion. Der maximale linksventrikuläre Druck wird in mmHg angegeben.

linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt max mmHg/s): Die linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit ist ein Parameter der systolischen Funktion und insbesondere der Kontraktilität des linken Ventrikels. Er wird mathematisch aus der ersten Ableitung der linksventrikulären Druckkurve errechnet und

stellt daher die Geschwindigkeit der Veränderungen des Drucks im Ventrikel dar. Er wird durch die Einheit mmHg pro Sekunde beschrieben.

Schlagvolumen (SV μ l): Das Schlagvolumen ist das Volumen, das während der Ejektion aus dem Ventrikel in die Aorta ausgeworfen wird. Man errechnet es, indem man das enddiastolische Volumen vom endsystolischen Volumen subtrahiert: $ESV - EDV = SV$. Angegeben wird das Schlagvolumen bei der Maus in μ l.

Ejektionsfraktion (EF %): Die Ejektionsfraktion ist die prozentuale Auswurfsfraktion vom maximalen, also dem enddiastolischen Volumen des linken Ventrikels. Es wird durch folgende Formel

$$(\text{Maximales Volumen} - \text{minimales Volumen}) / (\text{maximales Volumen} * 100) = EF$$

errechnet und stellt einen in der Klinik wichtigen Faktor der systolischen Funktion dar.

Dabei ist es wichtig zu wissen, dass die Ejektionsfraktion von der Vor- und Nachlast und

somit vom Volumen abhängig ist. Angegeben wird die EF in %.

endsystolisches Volumen (ESV μ l): Das endsystolische Volumen ist das minimale Volumen, das nach dem Auswurf des Blutes im linken Ventrikel verbleibt. Im Mausmodell wird das Volumen wie alle Volumina im Herzen in μ l angegeben.

Kardialer Index (KI μ l/min/Gramm): Der kardiale Index beruht auf dem Herzzeitvolumen in Bezug auf das Körpergewicht der einzelnen Maus. Das Herzzeitvolumen wird durch die Formel *Schlagvolumen * Herzfrequenz = Herzzeitvolumen* errechnet. Das Herzzeitvolumen wird nun durch das jeweilige Körpergewicht der Tiere dividiert, und somit der Einfluss der Größe der Tiere auf den kardialen Index minimiert. Der kardiale Index ist daher ein wichtiger Faktor der systolischen Herzfunktion und dient als wichtigster Parameter zur Beurteilung der Pumpleistung des linken Ventrikels.

Herzfrequenz (HF b/min): Die Herzfrequenz gibt die Herzschläge pro Minute an und wird in Schläge pro Minute angegeben.

dP/dt max:min Ratio: Der Quotient zwischen der maximalen Druckanstiegs- bzw. minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit im linken Ventrikel dient als Parameter der Kinetik des linken Ventrikels zwischen Systole und Diastole [41].

Ea Nachlast (mmHg/ μ l): Die Nachlast errechnet sich aus dem LVP geteilt durch das Schlagvolumen, also $Ea = LVP / SV$. Entsprechend dieser Formel stellt sie den

Widerstand der arteriellen Gefäße dar. Die Nachlast ist damit direkt an der Regulierung der kardialen Pumpfunktion beteiligt.

Endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR mmHg/ μ l): Die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung ist ein Parameter, der nur während der Vena-Cava-Okklusion gewonnen werden kann. Er stellt die Kontraktilität des linken Ventrikels dar, ist aber im Gegensatz zum dP/dt max vor- und nachlastunabhängig. Der ESPVR wird als Steigung der linearen Gleichung durch die endsystolischen Druck-Volumen-Punkte angegeben.

Und als Maß für die diastolische Funktion:

Frühe Diastole:

linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min mmHg/sec): Die minimale Druckabfallsgeschwindigkeit ist ein Parameter der frühen diastolischen Relaxation. Er wird analog zur maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit aus der 1. Ableitung der Druckkurve errechnet und daher in mmHg/s angegeben.

Tau (ms): Tau ist ein Parameter der frühen diastolischen Funktion. Es bezeichnet die Zeitraum vom Punkt der minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Relaxation, wenn der Druck noch 10% des maximalen LVP ist.

Späte Diastole:

Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP mmHg): Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist einer der wichtigsten konventionellen Parameter der diastolischen Funktion. Er ist der Druck, der am Ende der Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion im linken Ventrikel gemessen wird.

Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR): Die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung ist ähnlich wie der ESPVR ein vor- und nachlastunabhängiger Parameter und so nur durch die Vorlastsenkung während der Vena-Cava-Okklusion zu gewinnen. Mit diesem Parameter kann die intrinsische Steifigkeit während der diastolischen Dehnung des linken Ventrikels bestimmt werden. Der EDPVR kann durch verschiedene mathematische Annäherungen errechnet werden. Es wird eine lineare oder exponentielle Funktion durch die enddiastolischen Druck-Volumen-Kurven gebildet. Dabei wird entweder die Steigung der linearen Funktion oder die exponentielle Steilheit der Kurve als Wert für den EDPVR gedeutet. Besonders im Mausmodell wird die exponentielle Funktion benutzt, da die EDPVR sich so genauer ausdrücken lässt.

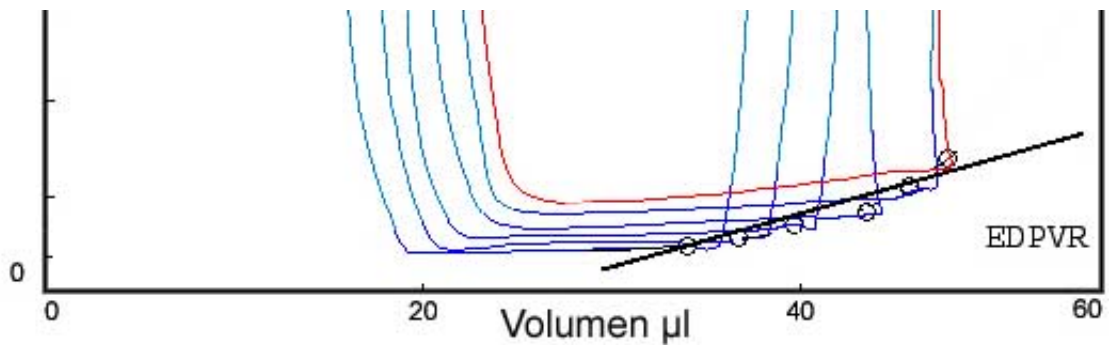


Abbildung 10: EDPVR, lineare Annäherung

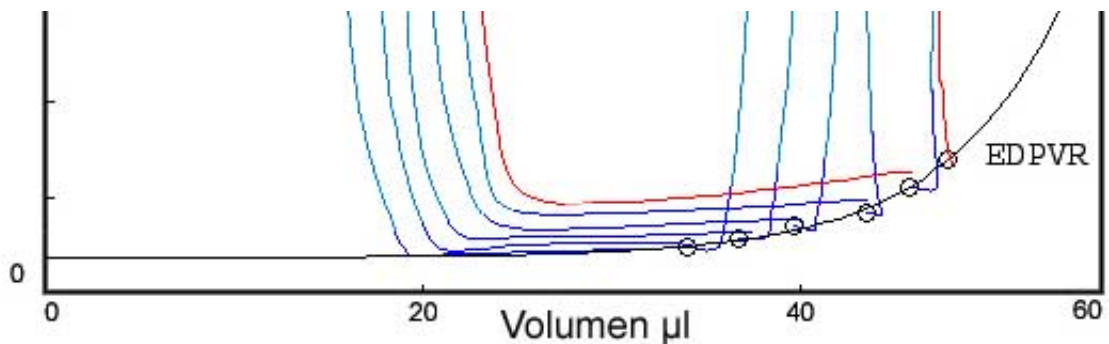


Abbildung 11: EDPVR, exponentiale Annäherung

2.8.4. Belastungshämodynamik

Zur Überprüfung der maximalen Herzleistung stimulierten wir das Herzkreislaufsystem mit Isoproterenol (Glaxo-Smith) in einer Dosis ($1,25 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht intraperitoneal). Nach 2 Minuten wurde noch einmal die vorlastabhängige Hämodynamik aufgezeichnet und alle Werte analysiert.

2.9. Mortalität

In den folgenden 5 Minuten wurde die Herzfunktion kontrolliert und ein eventuelles Herzversagen festgestellt.

Fünf Minuten nach der Stress-Induktion durch ein Katecholamin konnte einerseits ein Rückgang der Herzfunktion auf basale Werte, andererseits eine kardiale

Dekompensation und der Tod festgestellt werden. Überlebende Tiere wurden nach 5 Minuten durch eine KCL-Infusion getötet.

2.10. Statistische Auswertung

Für eine zufallskritische Absicherung der beobachteten Werte ist die Anwendung statistischer Testverfahren unerlässlich. Für die hier verwendeten Tests wurde hinsichtlich der Signifikanz eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ als ein signifikantes Ergebnis gewertet, wobei jeweils das genaue Signifikanzniveau als p-Wert angegeben wurde. p-Werte größer 0.05 wurden folglich als nicht signifikantes Ergebnis (n.s.) gewertet. Die Auswertung wurde mit SPSS 11.0, Statistical Package for the Social Sciences, durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Gruppenunterschiede wurde mittels der ANOVA-Prozedur (Analysis of Variance) berechnet. Die ANOVA ist an folgende Voraussetzungen geknüpft: die Fehlerkomponenten müssen normalverteilt sein, die Fehlervarianzen müssen homogen sein und die Fehlerkomponenten müssen voneinander unabhängig sein. Nachdem die ANOVA-Prozedur signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachwies, wurde als Post-HOC-Test der Tamhane's T2 Test angewandt, da die Varianzen der einzelnen Variablen unterschiedlich waren.

Zum Nachweis eines eventuellen Unterschiedes der Mortalität zwischen den 4 Gruppen wurde ein CHI-Quadrat-Test nach „Fisher's Exact Test“ durchgeführt, da die Gruppen mit $n=10$ eher klein waren.