

AUS DER UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN III
DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS HALLE (SAALE)
(DIREKTOR: PROF. DR. MED. STEFAN FRANTZ)

Der Einfluss von Endotoxin auf die Herzfrequenz und
Herzfrequenzvariabilität bei Wildtyp-Mäusen – ein Modell der
kardialen autonomen Dysfunktion bei Intensivpatienten mit
Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (MODS)

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN (DR. MED.)

VORGELEGT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

von Sara Ruccius, geborene Hettrich,
geboren am 08.10.1984 in Berlin
Betreuer: APL. Prof. Dr. med. Henning Ebelt

Gutachter/Gutachterin:
APL. Prof. Dr. med. Henning Ebelt (Erfurt)
Prof. Dr. phil. habil. Kuno Hottenrott
PD Dr. med. Juliane Stieber (Erlangen)

03.11.2015

09.11.2016

REFERAT

Eine Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität (HRV) ist bei Intensivpatienten mit einem Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (MODS) prognostisch ungünstig. Die Rolle des Endotoxins bei der Entstehung dieser HRV-Einengung wurde mittels fortlaufender telemetrischer EKG- und Aktivitätsregistrierung durch intraperitoneal platzierte Biopotentialtransmitter bei adulten männlichen ICR-Wildtyp-Mäusen evaluiert, nachdem zunächst die Einschätzung der Stabilisierung nach operativer Transmitterimplantation und der autonomen Regulation der HRV bei den Tieren erfolgte.

Bei Wildtyp-Mäusen ist die Ruheherzfrequenz unmittelbar postoperativ erhöht, die HRV und die Zirkadianität sind eingeschränkt. Während sich die Ruheherzfrequenz nach 5 Tagen normalisiert, benötigt die HRV-Stabilisierung mindestens 10 Tage. Atropin- und Isoproterenolapplikation bewirken eine ausgeprägte Tachykardisierung. Propranololapplikation verursacht eine Bradykardie. Atropin reduziert alle und Propranolol keinen der untersuchten HRV-Parameter. Eine autonome Blockade beeinflusst weder die Herzfrequenz noch die HRV signifikant. Isoproterenol senkt die Standardabweichung der normalen RR-Intervalle (SDNN) und führt zu einer Reduktion der Low Frequency/High Frequency-Ratio (LF/HF-Ratio). Propranolol hebt die LF/HF-Ratio an. Endotoxin führt zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz und unter einer autonomen Blockade zu einer Bradykardisierung. Es kommt zu einer hochgradig eingeschränkten HRV, vor allem bei alleiniger Endotoxin-Applikation.

Die Experimente weisen auf einen postoperativen Stabilisierungszeitraum von mindestens 10 Tagen und auf einen ausgeglichenen autonomen Ruhetonus bei Wildtyp-Mäusen hin. Der Parasympathikus ist entscheidend an der Entstehung der HRV beteiligt. Die in Zellkulturexperimenten beschriebene direkte Hemmung des kardialen Schrittmacherstroms I_f und dessen Sympathikus-Sensibilisierung durch Endotoxin werden in den hier vorgestellten in-vivo-Experimenten bei ICR-Wildtyp-Mäusen funktionell bestätigt. Die Befunde unterstützen die Hypothese der Interaktion von Endotoxin mit den kardialen Schrittmacherzellen und stellen deren zentralen Stellenwert bei der Entstehung der prognoserelevanten autonomen kardialen Dysfunktion bei Patienten mit MODS zur Diskussion.

Ruccius, Sara: Der Einfluss von Endotoxin auf die Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität bei Wildtyp-Mäusen – ein Modell der kardialen autonomen Dysfunktion bei Intensivpatienten mit Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (MODS). Halle (Saale), Martin-Luther-Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 12.08.2015.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielstellung	7
3	Material und Methodik	8
3.1	Versuchstiere und Tierhaltung	8
3.2	Implantation der Telemetrie-Transmitter	8
3.3	Postoperative Beobachtung, pharmakologische Beeinflussung des autonomen Nervensystems und Endotoxinapplikation	10
3.4	Datengewinnung und Datenaufzeichnung	12
3.5	Datenverarbeitung	14
4	Ergebnisse	21
4.1	Stabilisierung und Eintreten einer zirkadianen Rhythmik nach operativer Transmitterimplantation	21
4.2	Autonome Regulation der Ruheherzfrequenz und der Herzfrequenzvariabilität	27
4.3	Einfluss von Endotoxin auf die Ruheherzfrequenz und die Herzfrequenzvariabilität	31
5	Diskussion	34
5.1	Telemetrische Datengewinnung an Mäusen	34
5.2	Herzfrequenzvariabilität in Mensch und Maus – Rückschlüsse auf die Re- gulation des autonomen Nervensystems	38
5.3	Die Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität bei Sepsis und MODS	45
5.4	Die Rolle von Endotoxin in der gestörten Interorgankommunikation	48
5.5	Studienlimitierung und Forschungsexposé	54
6	Zusammenfassung	56
7	Literaturverzeichnis	58
8	Thesen	70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
APR-1	Ambient Pressure Reference Monitor
ASDNN	mittlere Standardabweichung normaler RR-Intervalle alle 5 Minuten
B6	siehe C57BL/6
Balb/c	Mausstamm (Bagg Albino Jackson Laboratory)
BP	Blood Pressure, Blutdruck
bpm	beats per minute, Einheit der Herzfrequenz in <i>Schläge/min</i>
C57BL/6	Mausstamm (Stamm C57 Black/Rasse 6)
CHF	Congestive Heart Failure
CK/CK-MB	Creatinkinase, Isoenzym MB der Creatinkinase, spezifisch für den Herzmuskel
CLP	Cecal Ligation and Puncture
D.m.	Diabetes mellitus
FD	Frequency Domain, beinhaltet die Parameter HF, LF und LF/HF-Ratio
FFT	Fast Fourier Transformation
FVB	Mausstamm (Friend Leukemia Virus B)
GDA	Glutardialdehyd
HCN	Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Cation Channel
hHCN2	Human Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Cation Channel 2
HF	High Frequency
HRV	Heart Rate Variability, Herzfrequenzvariabilität
IBI	Inter Beat Interval, siehe RR-Intervall
ICR	Mausstamm (Institute of Cancer Research, Synonym CD-1 [®])
I_f	Strom, der durch den kardialen Schrittmacherkanal HCN fließt
IL-1 β	Interleukin-1 β
i.p.	intraperitoneal
LD 50	Letale Dosis; Dosis einer Substanz, die in 50 % der applizierten Fälle tödlich ist
LF	Low Frequency
LF/HF-Ratio	Verhältnis der LF Power zur HF Power
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
meanAct3	mittlere motorische Aktivität der untersuchten Wildtyp-Mäuse in 3 Minuten
meanAct33	mittlere motorische Aktivität der untersuchten Wildtyp-Mäuse in dem

	die meanAct3 umgebenden 30 Minuten
meanNN	arithmetischer Mittelwert aller normalen RR-Intervalle eines EKGs in einem definierten Zeitraum (Kehrwert der Herzfrequenz)
MI	Myokardinfarkt
MODS	Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom
MSOF	Multiple-System-Organ-Failure
MW \pm SD	arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung
NMRI	Mausstamm (Naval Medical Research Institute)
NN-Abstand	siehe RR-Intervall
nu	normalized units
PAN	Peripheres Autonomes Nervensystem
PBS	Phosphate Buffered Saline
pNN6	relativer Anteil aufeinander folgender normaler RR-Abstände, die über 6 ms schwanken
pNN50	relativer Anteil aufeinander folgender normaler RR-Abstände, die über 50 ms schwanken
PNP	Periphere Neuropathie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RLA	Receiver-Modell
RMSSD	Root Mean Square of Successive Differences, Quadratwurzel der quadrierten Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle
RR-Intervall	Zeitintervall zwischen den R-Zacken zweier normaler, aufeinander folgender QRS-Komplexe im EKG, synonym gebraucht zu NN-Abstand und IBI
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SDNN	Standardabweichung aller normalen RR-Intervalle eines EKGs in einem definierten Zeitraum
SK	Sinusknoten
TD	Time Domain, beinhaltet die Parameter meanNN, SDNN, RMSSD und pNN6
TISS	Therapeutic Intervention Scoring System
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
VLF	Very Low Frequency

1 EINLEITUNG

Das aktuelle Konzept der Pathogenese eines Multiorgan-Dysfunktions-Syndroms (MODS) einschließlich der kardialen Beteiligung im Sinne einer septischen Kardiomyopathie zeigt unterschiedliche Mechanismen auf, die zur Erklärung dieses Krankheitsgeschehens herangezogen werden können (Abb. 1). Diesem Modell zufolge, und in den aktuellen Sepsisleitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin erneut betont, verursache ein infektiöser Stimulus als Auslöser einer Sepsis eine systemische, pro- und antiinflammatorische Kaskaden enthaltende Wirtsreaktion (Müller-Werdan et al., 2006a; Reinhart et al., 2010). Eine in diesem Rahmen überschießende, unkontrollierte und ungerichtete entzündungszell- und mediatorvermittelte Immunreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) könne im Sinne eines *horror autotoxicus* zu einer Schädigung des Wirts selbst führen (Baue, 1992; Redl et al., 1993). Dabei komme es durch das auslösende Agens, beispielsweise Endotoxin (Loppnow et al., 1993; Schletter et al., 1995), über eine Aktivierung von Granulozyten, Makrophagen bzw. Monozyten (van der Meer et al., 1988) und einer Reihe weiterer Wirtszellen zu einer Freisetzung zahlreicher Mediatoren, die das laborchemisch beschriebene Phänomen des *cytokine storm* erzeugen (Clark, 2007; Wang and Ma, 2008). Eine große Anzahl dieser Mediatoren konnte seit den 1980er-Jahren identifiziert werden (Redl et al., 1993; Waage et al., 1993). Die Aktivität proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise des Tumor Necrosis Factor α (TNF α) (Damas et al., 1989) und des Interleukin-1 β (IL-1 β , Okusawa et al., 1988) korrelieren eng mit der Entstehung eines Multiorgan-Dysfunktions-Syndroms. Die direkt kardiodepressive Wirkung dieser Mediatoren konnte 1996 (Kumar et al., 1996) und in der Folge in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden (Müller-Werdan et al., 1998; Cain et al., 1999).

In klinischen Studien der 1970er-Jahre wurde eine verringerte kardiale Auswurfleistung bei erhöhtem peripheren Widerstand im Sinne einer Myokarddepression bei Sepsis interpretiert und diese vorrangig als eine reaktive, kardiovaskuläre Beteiligung des Herzens im Rahmen des septischen Geschehens verstanden (Shoemaker, 1971; Nishijima et al., 1973; Hinshaw, 1974). Auch eine initiale hyperdynamie Kreislaufsituation mit normaler oder erhöhter Auswurfleistung und erniedrigtem peripheren Widerstand wurde beobachtet, diese jedoch als noch initial adäquate Beteiligung des Herzens bei Sepsis eingeordnet (Hinshaw, 1974). Margaret M. Parker wies eine eingeschränkte linksventrikuläre

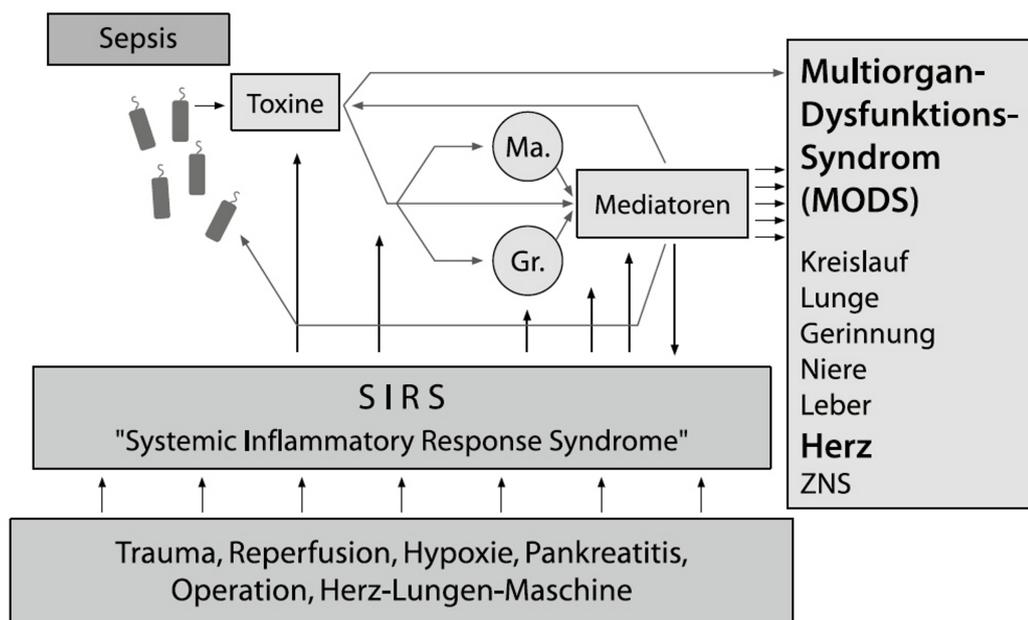


Abb. 1: Aktuelles Konzept der Pathogenese eines Multiorgan-Dysfunktions-Syndroms (MODS),
Ma.=Makrophagen, Gr.=Granulozyten (Müller-Werdan et al., 2006a).

Pumpfunktion bei Sepsis 1984 szintigraphisch nach (Parker et al., 1984). Bei genauer Betrachtung der Relation von kardialer Auswurfleistung und peripherem Widerstand zeigte sich in der Folge, dass die Pumpfunktion, auch wenn sie absolut zunächst normal oder erhöht erscheint, im Verhältnis zu der dramatischen Nachlastreduktion nicht adäquat gesteigert ist (Müller-Werdan et al., 2006a). Die septische Kardiomyopathie wurde zunächst als vorrangig „sekundäre“ verstanden (Hinshaw, 1974, verursacht durch z. B. peripheres Pooling, Myokardminderperfusion aufgrund von Hypotension oder tachykardiebedingte Minderversorgung). Im weiteren wurde auch von einer direkten Schädigung des Myokards durch zirkulierende Mediatoren wie beispielsweise Zytokine oder hohe Catecholaminkonzentrationen ausgegangen (Müller-Werdan et al., 1996).

Das Konzept der septischen Kardiomyopathie, welches die Schädigung des Herzens als eine eigene Entität im Rahmen der Systemerkrankung Sepsis begreift, gewinnt erst in jüngerer Zeit zunehmend an Bedeutung (Müller-Werdan et al., 2006b). Sie ist vorrangig eine klinische Diagnose, die durch verschiedene apparativ-diagnostische Befunde gestellt werden kann (Müller-Werdan et al., 2006b). Bisher konnten keine charakteristischen pathomorphologisch-histologischen Befunde der septischen Kardiomyopathie gefunden werden, die Schädigung des Herzens ist unspezifisch (Müller-Höcker and Haerty,

1993). Über 24 Stunden mit Endotoxin oder Tumor Necrosis Factor α (TNF α) inkubierte Rattenkardiomyozyten zeigen ebenso wenig morphologische Veränderungen unter dem Phasen-Kontrast-Mikroskop (Müller-Werdan et al., 1998), wie eine 6-stündige Lipopolysaccharid (LPS)-Inkubation humaner Vorhofkardiomyozyten (Zorn-Pauly et al., 2007). Auf Zellebene jedoch konnten in den letzten Jahren verschiedene funktionelle Beeinträchtigungen der Kardiomyozyten im Rahmen einer Sepsis aufgezeigt werden, die unter anderem die Induktion inflammatorischer Kaskaden, die Beeinflussung des Ca²⁺-Haushaltes, eine Mitochondriendysfunktion sowie die Modulierung autonomer Einflüsse umfassen und die Pumpfunktionseinschränkung mit erklären könnten (Flierl et al., 2008; Kneyber et al., 2009). Eine hochgradig eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität (HRV) stellt ein typisches, klinisches Charakteristikum der septischen Kardiomyopathie dar (Müller-Werdan et al., 2006b), dessen zelluläre Entstehungsmechanismen bisher ungeklärt sind.

Zum ersten Mal berichtete Christopher S. Garrard von einer autonomen Dysfunktion, die sich in einer eingeschränkten Herzfrequenzvariabilität im Rahmen einer Sepsis bei Intensivpatienten ausdrückte (Garrard et al., 1993). Verschiedene klinische Arbeiten validierten in der Folge diese Beobachtung und konnten gleichzeitig die negative prognostische Aussagekraft dieser HRV-Einengung aufzeigen (u. a. Piepoli et al., 1995; Ellenby et al., 2001; Schmidt et al., 2005; Schmidt et al., 2008a). Der pathophysiologische Hintergrund der HRV-Einschränkung und ihrer ungünstigen prognostischen Bedeutung bleiben weithin ungeklärt.

John J. Skillman beschrieb 1969 ein tödliches Syndrom mit einem gleichzeitigen Auftreten von respiratorischer Insuffizienz, Hypotension, Sepsis und Ikterus (Skillman et al., 1969). Die Arbeitsgruppe um Nicholas L. Tilney berichtete 1973, dass die postoperative Mortalität bei chirurgischen Patienten mit der Anzahl der dysfunktionalen Organsysteme korreliere – er beschrieb die Entwicklung eines MODS aus einem SIRS und die damit einhergehende hohe Sterblichkeit (Tilney et al., 1973; Godin and Buchman, 1996).

Ausgangspunkt für die Hypothese Paul J. Godins und Timothy G. Buchmans zur Entstehung eines MODS (Godin and Buchman, 1996) war das ab dem Ende der 1980er-Jahre aufkommende Verständnis physiologischer, biologischer Systeme als nonlineare, komplexe Gebilde untereinander kommunizierender, verschieden oszillierender Regulatoren (Goldberger and West, 1987b; Pool, 1989). Bereits 1973 beschrieb Saykrs, dass sich die in der HRV widerspiegelnden Regulationsschleifen und Oszillationen der Blutdruckregulation,

der Temperatur und der Atmung nonlinear verhalten und daher auf überraschende Art und Weise ineinander eingreifen und sich gegenseitig beeinflussen können (Saykrs, 1973).

Die HRV und deren Frequenzanalyse, insbesondere in der $1/f$ -Darstellung, ist nach Ary L. Goldberger der Beweis für eine physiologische, chaotisch erscheinende Interkonnektivität im Körper (Kobayashi and Musha, 1982; Goldberger and West, 1987a). Seine Hypothese würde um so mehr gestützt, als dass schwere Erkrankungen, wie die Cheyne-Stokes-Atmung und Herzrhythmusstörungen mit einer eingeschränkten HRV einhergehen (Goldberger et al., 1984).

Da in einem komplexen Netzwerk jede Komponente die anderen moduliert und jede Komponente von allen anderen moduliert werden kann, zeigt das messbare biometrische Ausgangssignal einer solchen Komponente eine sehr hohe Variabilität, wobei sich in komplexen Netzwerken bestimmte bevorzugte Interaktionszustände ausbilden (Seely and Christou, 2000), wie es beispielsweise an einem typischen, physiologischen HRV-Spektrum erkennbar ist. Steven Pincus leitete 1994 aus seinem mathematischen Modell der *approximate entropy* ab, dass eine zunehmende Regelmäßigkeit des Ausgangssignals einer Komponente aus einem komplexen, untereinander gekoppelten System als Isolation derselben in diesem System interpretiert werden kann (Pincus, 1994). Er schlussfolgerte, dass eine zunehmende Regelmäßigkeit eines biometrischen Signals, beispielsweise der Herzfrequenz, ein Zeichen seiner zunehmenden Isolation im Organismus sei. Eine starre Herzfrequenz könne somit als Zeichen einer Entkopplung verschiedener oszillierender Organsysteme gewertet werden und damit auf eine gestörte Interorgankommunikation hinweisen.

Godin und Buchman entwickelten daraufhin 1996 die Hypothese, dass die Entwicklung eines MODS aus einem initialen Stimulus, wie einer Infektion, durch solch eine Entkopplung der Interorgankommunikation entstände, die sich an der eingeschränkten HRV bei diesem Krankheitsgeschehen demonstriere (Godin and Buchman, 1996). Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass eine intakte Interorgankommunikation im Rahmen einer Infektion direkt durch das autonome Nervensystem, insbesondere durch den *cholinergic antiinflammatory pathway* gewährleistet werde, welcher im Rahmen einer Sepsis möglicherweise unterbrochen oder gestört sei (Tracey, 2007; Schmidt et al., 2008b).

Bisher ist sowohl unklar, wo die Interorgankommunikation unterbrochen wird, als auch, welche Substanzen an dieser Beeinträchtigung im Rahmen eines MODS involviert sind. Als eine Möglichkeit kommt die Störung des autonomen Einflusses direkt an den

Zielzellen, am Herzen an den kardialen Schrittmacherzellen, in Betracht (Garrard et al., 1993; Schmidt et al., 2008b).

Neben $\text{TNF}\alpha$, dessen Serumspiegel 2009 mit einer späten, langanhaltenden HRV-Einschränkung bei Sepsis in Korrelation gebracht werden konnte (Fairchild et al., 2009), könnten die eine Sepsis auslösenden Pathogene direkt für die septische Kardiomyopathie mit der für sie charakteristischen HRV-Einschränkung verantwortlich sein (Abb. 1).

1989 experimentell durchgeführte Endotoxinapplikationen an Menschen provozierten bei den Probanden eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion, die der Kardiomyopathie bei Patienten mit Sepsis gleicht (Suffredini et al., 1989). In weiteren Studien konnte eine deutliche dosisabhängige Einschränkung der HRV nach Endotoxinapplikation in Tieren (Goldstein et al., 1995) und am Menschen beobachtet werden (Godin et al., 1996). Die direkte Interaktion von Endotoxin, dem Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, mit den Zielstrukturen des Herzens, wie beispielsweise dem kardialen Schrittmacherkanal, könnte somit ein entscheidender Mechanismus in der Genese der HRV-Einschränkung bei Sepsis sein (Schmidt et al., 2007; Zorn-Pauly et al., 2007).

Die vorliegende Dissertation analysiert die Interaktion von Endotoxin mit den Schrittmacherzellen des Herzens *in vivo* als eine mögliche Ursache der gestörten Organkommunikation, welche sich in einer HRV-Einschränkung ausdrückt (Abb. 2). In Zellkulturexperimenten konnten im Voraus zwei mögliche Mechanismen der direkten Beeinflussung des I_f -Stroms durch Endotoxin aufgezeigt werden (Zorn-Pauly et al., 2007). Zum einen hemmt Endotoxin in Abwesenheit autonomer Einflüsse den I_f -Strom direkt, indem es den Stromfluss bei Membranpotentialen > -80 mV hemmt und die Aktivierung des Kanals verlangsamt (Abb. 2). Dies sollte theoretisch in einer Bradykardisierung resultieren. Zum anderen bahnt LPS in Anwesenheit sympathomimetischer Substanzen deren Einfluss auf den Schrittmacherstrom, wodurch sich eine Tachykardie ausbilden sollte. Beide Mechanismen könnten daher an der Entstehung einer prognoserelevanten HRV-Einschränkung bei Intensivpatienten mit MODS beteiligt sein und eine Ursache für die Unterbrechung der Interorgankommunikation auf Endorganebene darstellen.

In dieser Arbeit werden die im Zellkulturexperiment nachgewiesenen Mechanismen *in vivo* am Modell der Wildtyp-Maus untersucht. Dabei werden die EKGs der Mäuse mittels intraperitoneal platzierter Telemetrietransmitter erfasst, und aus ihnen verschiedene etablierte Parameter der Herzfrequenzvariabilität ermittelt (Malik et al., 1996; Thireau et al., 2008). Die unterschiedliche Datenlage zur Stabilisierung der Tiere und der HRV-

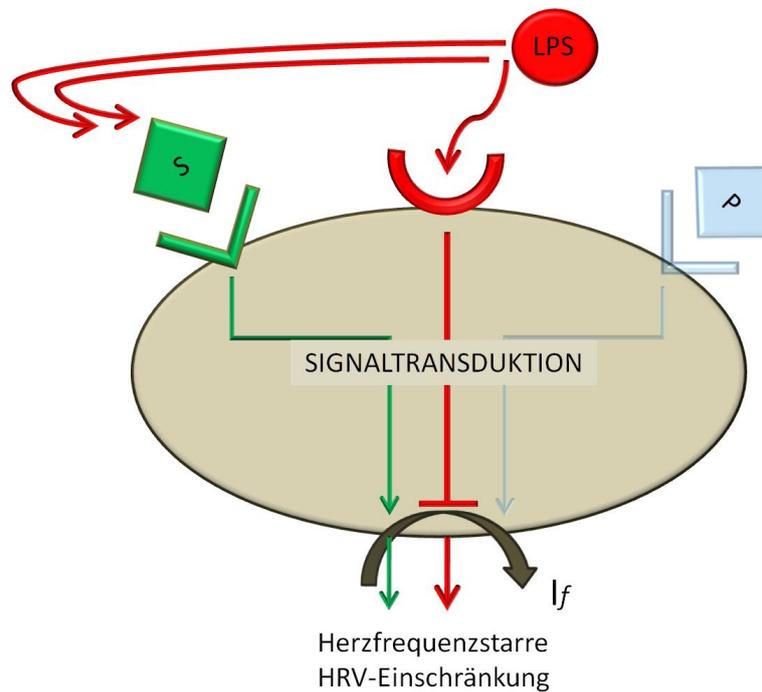


Abb. 2: Mögliche Beeinflussung des Schrittmacherstroms I_f durch Endotoxin. LPS zeigt in Zellkulturexperimenten einerseits einen direkt hemmenden Effekt auf den Schrittmacherstrom, andererseits bahnt es den Einfluss anwesender sympathomimetischer Substanzen auf I_f .
LPS=Lipopolysaccharid, S=Sympathikus, P=Parasympathikus.

Parameter nach der operativen Transmitterimplantation erfordert zunächst eine Evaluierung dieser Fragestellung unter den eigenen experimentellen Bedingungen. Die Arbeit untersucht anschließend, wie die Herzfrequenz und die Herzfrequenzvariabilität bei Mäusen in Ruhe und unter pharmakologischer Modulation des autonomen Nervensystems charakterisiert sind. Auf dieser Basis können der Einfluss von LPS auf die Herzfrequenz und die HRV bei Mäusen analysiert und Rückschlüsse auf die Modulation der autonomen Herzfrequenzregulation durch Endotoxin gezogen werden.

2 ZIELSTELLUNG

Ziel der Dissertation ist es, den vorangegangenen in-vitro-Nachweis der direkten Interaktion von Endotoxin mit dem Schrittmacherkanal des Herzens, in vivo am Modell der Wildtyp-Maus zu evaluieren und damit einen Beitrag zur Aufklärung der Entstehung einer hochgradig eingeschränkten Herzfrequenzvariabilität (HRV) bei Intensivpatienten mit Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (MODS) zu liefern. Für die Interpretation der durch Biopotentialtransmitter telemetrisch gewonnenen HRV-Daten ist die Beurteilung der postoperativen Stabilisierung und der autonomen Regulation der Ruheherzfrequenz der Wildtyp-Mäuse wesentlicher Ausgangspunkt. Daher werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welcher postoperative Erholungszeitraum ist nach Implantation der EKG-Transmitter für die Stabilisierung der Tiere notwendig?
2. Wie hoch ist die telemetrisch bestimmte Ruheherzfrequenz und wo liegen die Ruhe-HRV-Parameter bei ICR-Wildtyp-Mäusen?
3. Wie werden die Ruheherzfrequenz und die HRV bei ICR-Wildtyp-Mäusen durch das autonome Nervensystem moduliert?
4. Welchen Einfluss hat Endotoxin mit und ohne autonome Blockade auf die Herzfrequenz und die HRV?

Anhand dieser Fragestellungen soll die Entstehung der HRV-Einschränkung im Rahmen eines septischen MODS diskutiert und die mögliche Rolle des Endotoxins als Störfaktor der HRV-Regulation auf Endorganebene erörtert werden.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Experimente fanden im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg statt. Das Referat *Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten* des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt genehmigte die Durchführung der Versuche an den lebenden Tieren. Zur telemetrischen Datengewinnung wurden zehn adulte männliche ICR-Wildtyp-Mäuse (CD-1[®]-Mäuse, Harlan Winkelmann GmbH Borcheln) operativ mit einem intraperitonealen Transmittersystem versorgt. Nach 15-tägiger postoperativer Beobachtung und durchgängiger Registrierung der motorischen Aktivität sowie der Herzfrequenz begann die Durchführung der Injektions-Experimente.

Die konventionelle Haltung der Tiere erfolgte im ZMG. Sie richtete sich nach den Empfehlungen für Versuchstierhaltung der Europäischen Kommission von 2007 (Dimas, 2007). Während der Aufzeichnungsphase waren die Tiere in Einzelhaltung in Typ II-Normkäfigen (207 x 265 x 140 cm, insgesamt 363 cm² Bodenfläche) untergebracht. Die Polycarbonat-Käfige besitzen einen Edelstahlgitter-Deckel mit einer Futterraufe. Der Boden ist mit Weichholzfaser und Zellstoff ausgelegt; zudem befindet sich in jedem Käfig ein Maus-Iglu (Polycarbonat, 100 x 90 x 55 cm, rot-transparent).

Die Mäuse erhielten Allgemeinfuttermittel (Altromin 1324, Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG, Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage) und Leitungswasser über eine 300 ml-Trinkflasche ad libitum. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 1 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 64 ± 1 %. Im Wechsel von zwölf Stunden wurde der Tag-Nacht-Rhythmus simuliert.

3.2 Implantation der Telemetrie-Transmitter

Die Telemetrie-Transmitter *PhysioTelTM EA-F20* der Firma Data Science International (s. Kapitel 3.4, S. 12) wurden unter Inhalationsnarkose in die Bauchhöhle implantiert. Als Anästhetikum diente Isofluran in einer Einleitungskonzentration von 4 % und einer Erhaltungskonzentration von 1,5–2,5 % in Sauerstoff (van Zutphen et al., 1995.). Die Mäuse wurden gewogen, in Rückenlage auf eine Wärmeplatte bei 38 °C gelegt und fixiert. Die Analgesierung erfolgte mittels Carprofen (Rimadyl[®]) 5 mg/kg Körpergewicht (van Zutphen et al., 1995.), das subkutan in die Beinfalte appliziert wurde. Das Fell der gesamten Bauchfläche und der Fixationspunkte der Telemetrieelektroden wurde großflächig rasiert und mit Povidon-Iod-Lösung (Braunol[®], B. Braun Melsungen AG) desinfiziert.

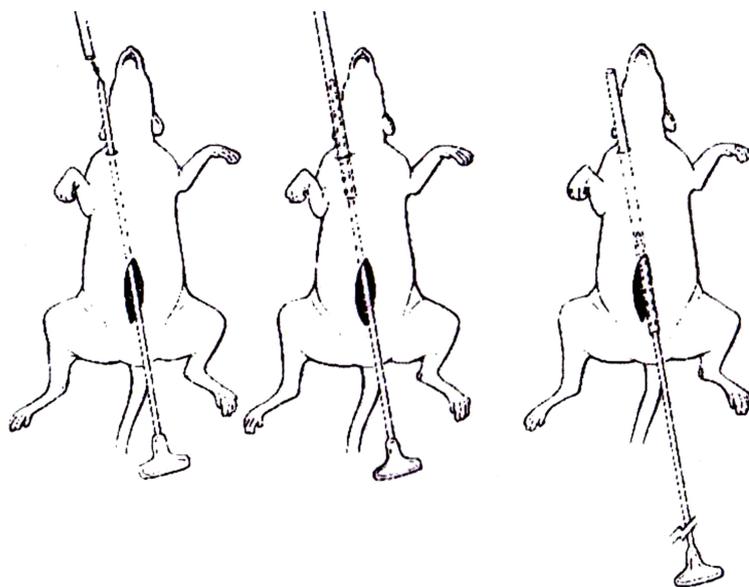


Abb. 3: Subkutane Tunnelung mittels Metallstab und Verlegung der Transmitterelektroden durch die Plastikhülle (Data Science International, 2008; S. 3-6, Abb. 5).



Abb. 4: Endgültige Lage des Transmitters (Data Science International, 2008; S. 3-5 Abb. 3).

Die Operation erfolgte nach Anleitung des Hardwareherstellers (Data Science International, 2008). Zunächst wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt: Entlang der Medianlinie erfolgte ein zwei Zentimeter langer Hautschnitt; das Peritoneum wurde stumpf abpräpariert und entlang der Linea alba eröffnet. Der Transmitter konnte nun steril in die Bauchhöhle eingeführt werden. Das Peritoneum wurde daraufhin lateral des Schnittes an zwei Punkten mit einer scharfen, großlumigen Kanüle durchstoßen und die Ableitelektroden durch die Kanüle hindurchgeführt, so dass diese nun extraperitoneal zum Liegen kamen. Die Peritonealwunde wurde mittels chirurgischer Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen (Polyglactin 910, VICRYL[®], 5-0).

Für die Platzierung der Ableitelektroden wurde ein Metallstab subkutan zu den Fixationspunkten am rechten Brustkorb in Höhe der rechten Vorderpfote für die negative Elektrode und unter den linken Rippenbogen für die positive Elektrode vorgeschoben und durch jeweils einen kleinen Hautschnitt wieder ausgeführt (Abb. 3). Über diesen wurde eine Plastikhülle gefädelt und der Metallstab herausgezogen. Die Ableitelektroden ließen sich nun durch die Hülle hindurchführen. Ihre Ausrichtung entspricht der Extremitätenableitung II nach Einthoven (Abb. 4). Die Sonden wurden mit dem *tip cover* an dem Muskel angenäht und dadurch fixiert. Nach Verschluss der Hautwunden mittels nicht-

Tab. 1: Dosierung, Bezug und Literaturnachweis der verwendeten Pharmaka

Pharmaka	Dosierung	Injektionsvolumen*	Lieferant/Hersteller	Hinweise zur Dosierung
Propranololhydrochlorid	20 mg/kg	ca. 900 μ l	MIBE GmbH Arzneimittel	Weiergräber et al., 2005
Atropinsulfat	1 mg/kg	ca. 200 μ l	B. Braun Melsungen AG	Weiergräber et al., 2005
LPS (1/100 der LD50)	0,4 mg/kg	ca. 200 μ l	Sigma Aldrich Logistik	Corral et al., 2005
Isoproterenolhydrochlorid	0.5 mg/kg	ca. 200 μ l	Sigma Aldrich Logistik	Stieber et al., 2006

*Empfehlung der GV-SOLAS zur Substanzapplikation bei Versuchstieren (GV-SOLAS, 2008).

resorbierbaren Nahtmaterial (Polypropylen, Prolene[®]) wurde die Narkose zeitnah beendet. Die Tiere erlangten innerhalb von fünf bis zehn Minuten das Bewusstsein wieder. Die Operation von Beginn der Narkose bis zur Ausleitung dauerte 35 ± 5 Minuten. Postoperativ erhielten die Mäuse für drei Tage zur Analgesie Carprofen 50 mg/l im Trinkwasser.

3.3 Postoperative Beobachtung, pharmakologische Beeinflussung des autonomen Nervensystems und Endotoxinapplikation

Während der 15 ersten Tage nach der operativen Transmitterimplantation wurden die Daten unter der Fragestellung der Entwicklung der Ruheherzfrequenz, der Bewegungsaktivität, der Stabilisierung der HRV-Parameter sowie des Eintretens zirkadianen Verhaltens kontinuierlich aufgezeichnet. Bei der statistischen Datenanalyse wurden der 1., 5. und 10. postoperative Tag verglichen (Thireau et al., 2008). Während dieser Phase fanden keine Injektions-Experimente statt; mit diesen wurde frühestens ab dem 16. postoperativen Tag begonnen (Abb. 5, Leon et al., 2004).

Das autonome Nervensystem wurde durch intraperitoneale Injektion verschiedener Pharmaka beeinflusst. Eine Übersicht der verwendeten Substanzen sowie deren Dosierungen gibt Tabelle 1. Propranololhydrochlorid und Atropinsulfat wurden als fertige Lösungen vom Hersteller bezogen und bei Raumtemperatur gelagert.

Isoproterenolhydrochlorid und Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) wurden als Pulver bezogen, in PBS gelöst und als hochkonzentrierte Stocklösungen bei -20 °C gelagert. Die Substanzen wurden 30 Minuten vor den Injektionen auf Raumtemperatur aufgetaut. Alle applizierten Pharmaka wurden unmittelbar vor den Versuchen mit Phosphate

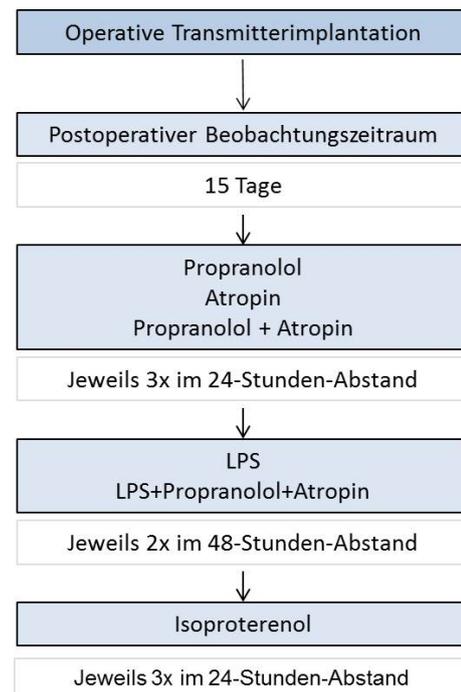


Abb. 5: Versuchsablauf.

Buffered Saline (PBS) auf die zu injizierenden Volumina verdünnt (Tab. 1).

Die insgesamt 16 Injektionen pro Maus wurden unter Kurznarkose mit 2,5 % Isofluran durchgeführt, wobei die Pharmaka über die Beinfalte oder bei Behinderung durch die Lage des Transmitters über den linken Unterbauch intraperitoneal appliziert wurden. Um den Einfluss physiologischer zirkadianer Schwankungen der Herzfrequenz und der Aktivität der Mäuse auf die Versuche so gering wie möglich zu halten, wurden alle Injektionen zwischen 16 und 18 Uhr durchgeführt. Sie erfolgten in drei Blöcken (Abb. 5).

Im ersten Block wurden je dreimal im Wechsel der nicht-selektive β -Blocker Propranolol, das Anticholinergikum Atropin und beide in Kombination zur Herstellung einer kompletten autonomen Blockade appliziert. Der zeitliche Mindestabstand dieser aufeinander folgenden Injektionen betrug 24 Stunden. In einem zweiten Block wurde der Effekt von LPS sowie LPS unter autonomer Blockade mittels Atropin und Propranolol auf die Herzfrequenzvariabilität getestet. Da eine länger andauernder Effekt von LPS auf den Organismus und die HRV zu erwarten war (Godin et al., 1996; Fairchild et al., 2009), wurde der zeitliche Mindestabstand zwischen den insgesamt vier Injektionen auf jeweils 48 Stunden erweitert.

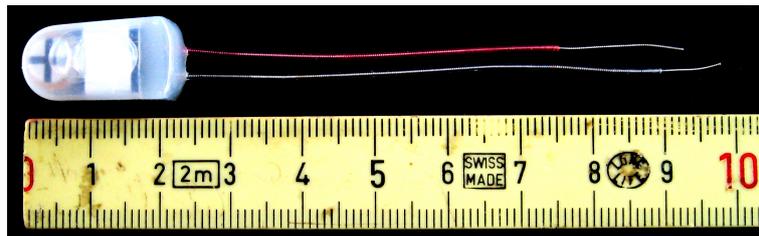


Abb. 6: Transmitter *PhysioTelTM EA-F20*, Data Science International, USA; Archiv der Verf.

Der dritte Versuchsblock umfasste die Injektion von Isoproterenol. Die Substanz wurde jeweils dreimal im Abstand von 24 Stunden verabreicht.

3.4 Datengewinnung und Datenaufzeichnung

Während der telemetrischen Datenaufzeichnung befanden sich die Mäuse in ihrer gewohnten Umgebung und konnten sich frei bewegen. Daten zur Beurteilung der Stabilisierung der HRV-Parameter und der Bewegung der Tiere nach der operativen Transmitterimplantation wurden von neun Wildtyp-Mäusen ausgewertet, eine Maus verstarb am 1. Tag nach der Transmitterimplantation. Von acht Wildtyp-Mäusen wurden Daten aus den Injektionsversuchen gewonnen; eine Maus verstarb nach dem postoperativen Beobachtungszeitraum von 15 Tagen noch vor Initiierung der Injektions-Experimente. Die für die Aufzeichnungen verwendete Hard- und Software wurde von Data Science International (DSI) bezogen (Data Science International, PhysioTel[®] and MultiplusTM Implant, St. Paul, Minnesota, USA). Die verwendeten Transmitter *PhysioTelTM EA-F20* (Abb. 6) eignen sich für mehrere aufeinander folgende Aufzeichnungen. Sie wurden nach Versuchsablauf und Tötung der Versuchstiere durch cervikale Dislokation aus der Bauchhöhle entfernt, manuell gesäubert und sterilisiert. Die Sterilisation erfolgte für 24 Stunden in 2%iger Glutardialdehyd (GDA)-Lösung. Nach Waschen der Transmitter mit sterilem PBS standen diese für eine neue Implantation zur Verfügung.

Die Transmitter wiegen zwischen 3,55 g und 3,80 g. Sie bestehen aus einem Silikonkörper (2 x 1 x 1 cm), der die Batterie und die elektronischen Bauelemente enthält (Abb. 6). Diese detektieren über die Ableitelektroden die Biopotential-Veränderungen, die elektrische Herzaktion, und senden die Daten mittels Radiowellen zu einem Receiver (Abb. 7). Der Transmitter kann magnetisch an- und ausgeschaltet werden. Die zwei Ableitelektroden (*biopotential leads*) sind mit Silikon ummantelt um Störsignale abzuschirmen. Am

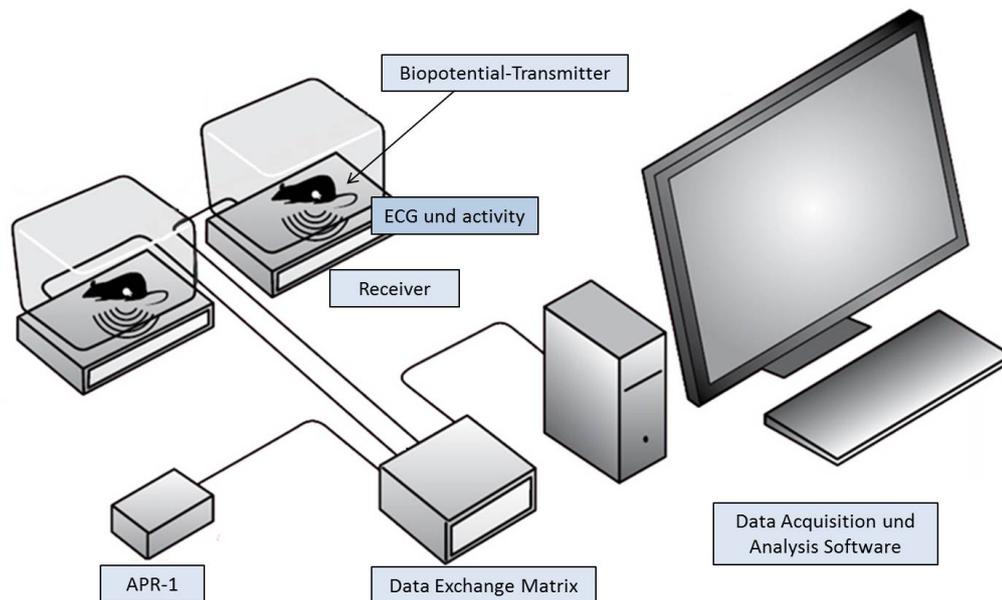


Abb. 7: Die Datengewinnung über das Telemetriesystem, modifiziert nach Data Science International, 2010.
ECG=Electrocardiogram, APR-1=Ambient Pressure Reference Monitor.

Ende der Elektroden befindet sich ein kurzes Stück frei gewundenes Kabel (*helix of wire*), über welches die Biopotentiale detektiert werden. Die Elektroden werden von jeweils einer Hülse (*tip cover*) vor Irritationen am Implantationsort geschützt. Es standen zwei Receiver (RLA) zur Verfügung, die in Form von Platten unter jeweils einem Mauerkäfig standen, so dass maximal zwei Aufzeichnungen parallel laufen konnten. Die Umwandlung der analogen in digitale Daten erfolgt mit einer Sampling-Frequenz von 2000 Hz ohne Signalfilter (Malik et al., 1996; Thireau et al., 2008). Diese findet im Transmitter selbst statt (Data Science International, 2008, vgl. Thireau et al., 2008).

Die Receiver leiten die digitalisierten Daten an die Data Exchange Matrix weiter, die diese Informationen bündelt und nach den einzelnen Transmittern aufgeschlüsselt, in einem für die dazugehörige Software (DSIs Dataquest A.R.T. Silver 3.1 Acquisition-System) lesbaren Datenformat weiterleitet. Die Bewegung der Mäuse (*activity, act*) wird durch die relative Änderung der Signalstärke der Radiowellen aus den Transmittern zu den Receivern ermittelt, die sich aus der Änderung der räumlichen Lage der Mäuse im Käfig ergibt. Je nach der Änderung der Signalstärke leitet die Data Exchange Matrix

einen oder mehrere digitale Impulse an den Computer weiter (Data Science International, 2009).

Mittels der *Acquisition*-Software (Dataquest A.R.T. 3.1 Silver) wurden die verschiedenen Transmitter kalibriert und den jeweiligen Receivern zugeordnet. Das EKG und die motorische Aktivität wurden aufgezeichnet und online graphisch dargestellt, so dass diese vom Benutzer aufzeichnungssynchron beobachtet werden konnten. Die Roh-Daten wurden automatisch in zuvor definierten Ordnern auf der Festplatte des Computersystems gespeichert, die dann für die Auswertung mittels der *Analysis*-Software abrufbar waren. Die Datenaufzeichnung erfolgte für die ersten 15 Tage postoperativ kontinuierlich. Sie wurde alle drei bis vier Tage kurz unterbrochen und unter einem neuen Speicherplatz neu gestartet, um die Größe der Datenpakete für die darauf folgende Bearbeitung handhabbar zu machen. Für die Injektionsversuche wurde die Aufzeichnung spätestens eine halbe Stunde vor der Injektion neu gestartet und für mindestens eine Stunde nach der Injektion fortgesetzt.

3.5 Datenverarbeitung

Die Daten wurden mit dem Programm *Analysis (DSI)* sowie *Microsoft Excel 2003* bearbeitet. Die EKG- und Bewegungsdaten wurden mittels zweier verschiedener Algorithmen importiert; zum einen für die Langzeitaufzeichnungen im postoperativen Beobachtungszeitraum, zum anderen für die Beurteilung der Pharmakaeffekte. Für beide wurden sowohl Time Domain als auch Frequency Domain Parameter gewonnen (Abb. 8).

Für die HRV-Analyse mussten zunächst die RR-Intervalle (NN-Abstände, Inter Beat Intervalle) aus dem EKG extrahiert werden (Abb. 8, Malik et al., 1996). Dafür wurden die QRS-Komplexe des importierten EKGs mittels automatischer R-Zacken-Erkennung detektiert und markiert. Mittels der Markierung konnten die RR-Intervalle errechnet werden und standen in einem neuen Datenpaket gebündelt für die Gewinnung der HRV-Parameter zur Verfügung.

Stabilisierung nach operativer Transmitterimplantation Die Stabilisierung nach der operativen Transmitterimplantation wurde anhand der Entwicklung von Herzfrequenz und HRV in der Ruhephase (Helligkeitsphase, 7–19 Uhr) des 1., 5. und 10. postoperativen Tags beurteilt (Thireau et al., 2008). Zudem wurde das Eintreten einer zirkadianen Rhythmik beobachtet. Für die Gewinnung der Time Domain Parameter wurden die EKG-Daten

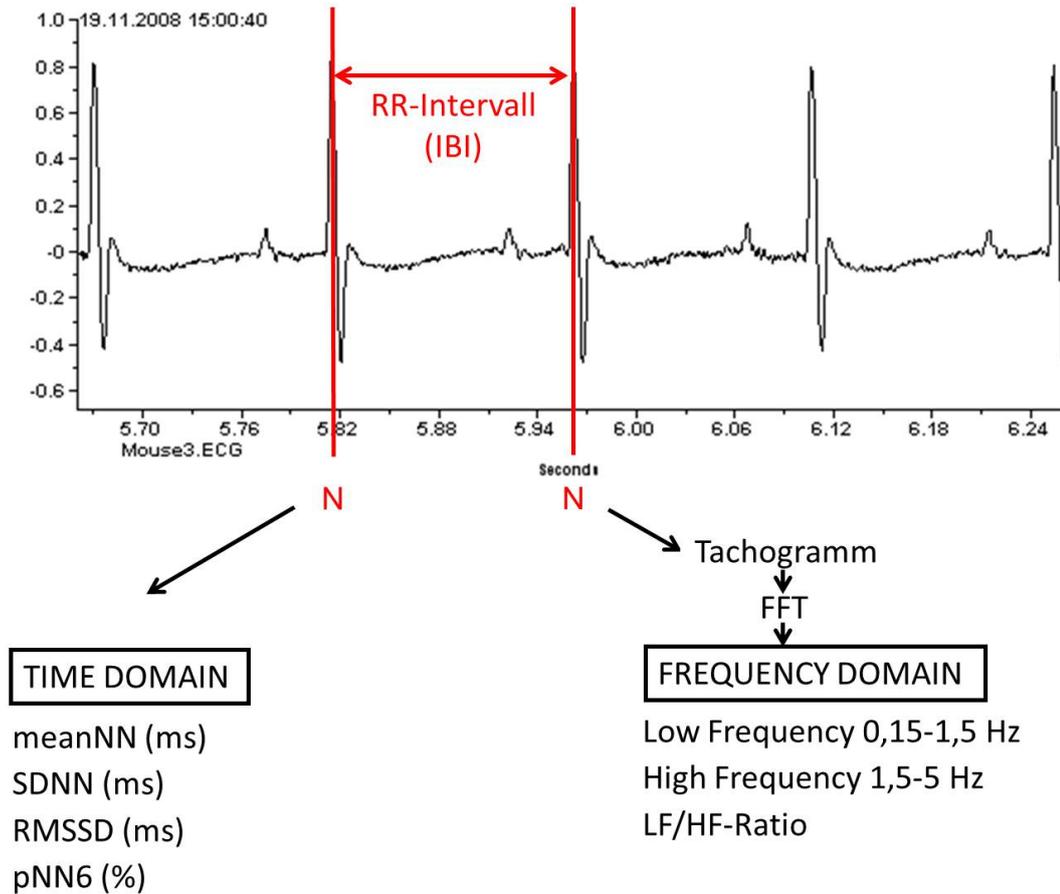


Abb. 8: Gewinnung der Time Domain und Frequency Domain Parameter aus dem Maus-EKG. RR-Intervall=Abstand zwischen zwei normalen aufeinanderfolgenden R-Zacken (N), FFT=Fast Fourier Transformation, meanNN=mittlerer RR-Abstand, SDNN=Standardabweichung des mittleren RR-Abstandes, RMSSD=root mean square of successive differences (Parameter der Kurzzeitvariabilität), pNN6=Prozent der aufeinanderfolgenden RR-Intervalle, die über 6 ms schwanken.

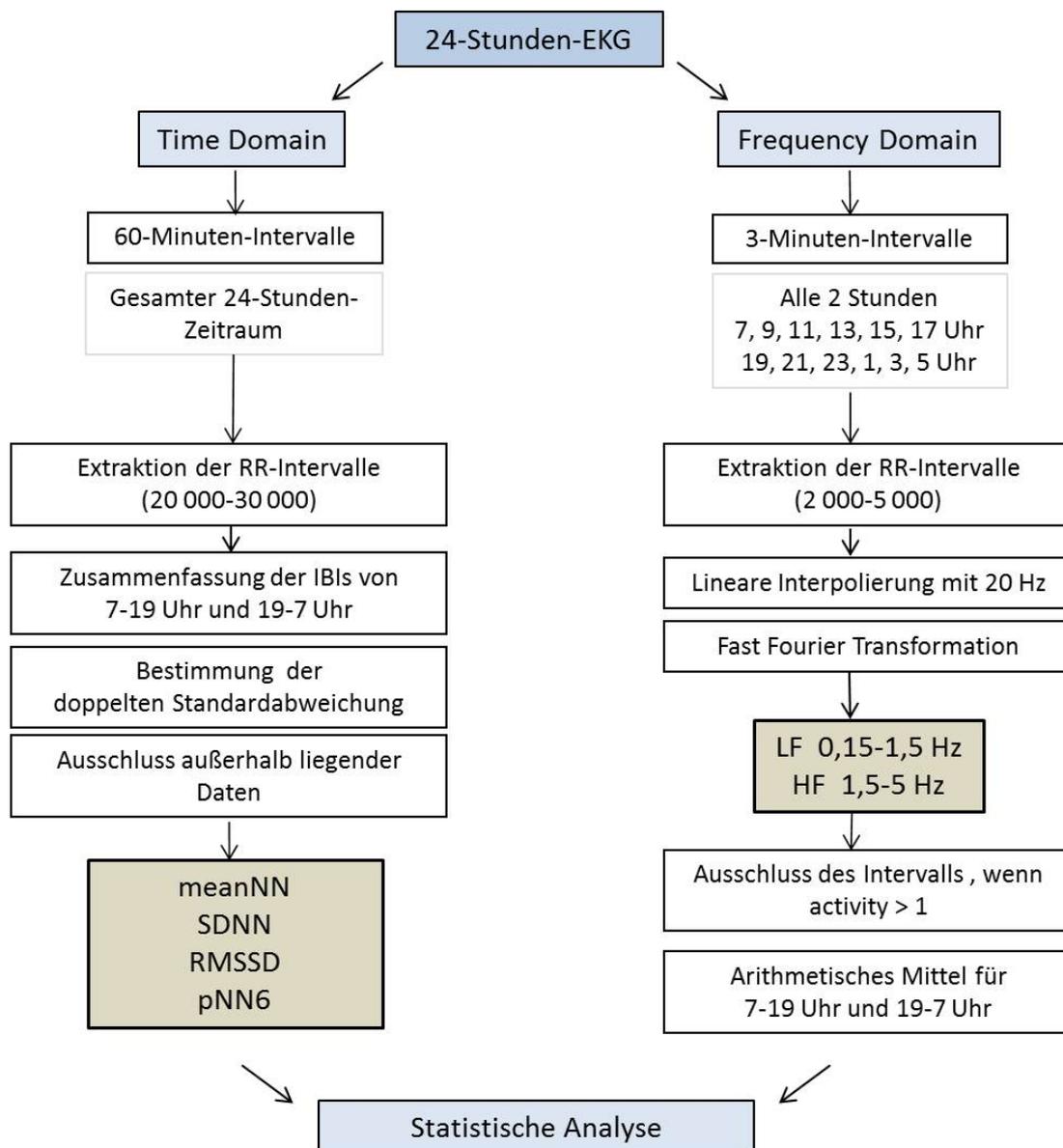


Abb. 9: Algorithmus der Datengewinnung in der Beobachtungsphase von 15 Tagen nach Transmitterimplantation. RR-Intervall=Abstand zwischen zwei normalen aufeinanderfolgenden R-Zacken, meanNN=mittlerer RR-Abstand, SDNN=Standardabweichung des mittleren RR-Abstandes, RMSSD=root mean square of successive differences (Parameter der Kurzzeitvariabilität), pNN6=Prozent der aufeinanderfolgenden RR-Intervalle, die über 6 ms schwanken, LF=Low Frequency, HF=High Frequency.

in 60-Minuten-Paketen importiert und die Ausgabe der RR-Intervalle, ca. 20 000–30 000 pro Paket, als Text-Datei gespeichert (Abb. 9). Zwölf 60-Minuten-Pakete wurden entsprechend der Hell- und Dunkelphasen, von 7–19 und 19–7 Uhr, zusammenhängend in eine Excel-Arbeitsmappe importiert. Aus den RR-Intervallen eines Zwölf-Stunden-Abschnitts wurde der Mittelwert und die doppelte Standardabweichung bestimmt und Werte entfernt, die außerhalb der doppelten Standardabweichung lagen (Thireau et al., 2008). Aus den selektierten Daten ließen sich die Time Domain Parameter meanNN, SDNN, RMSSD und pNN6 ermitteln (Tab. 2). Die Herzfrequenz (HR) wurde aus der meanNN bestimmt ($\text{HR} [\text{min}^{-1}] = 60 * 1000 / \text{meanNN} [\text{ms}]$).

Für die Frequency Domain Analyse wurden im Abstand von zwei Stunden (7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 1, 3 und 5 Uhr) jeweils drei 3-Minuten-Segmente aus den EKGs ausgewählt (Abb. 9). Die Bewegungsaktivität wurde für diese drei Minuten sowie für den umgebenden 30-Minuten-Zeitraum (insgesamt 33 Minuten) bestimmt. Für die Berechnungen wurden die EKG-Segmente nur dann verwendet, wenn die zugehörige Aktivität der Mäuse < 1 betragen hatte. Nach Extraktion der RR-Intervalle (ca. 2 000–2 500) aus dem EKG wurde ein Tachogramm erstellt, welches mit 20 Hz linear interpoliert wurde (Thireau et al., 2008). Für die anschließende Fast Fourier Transformation (FFT) wurde der Low Frequency (LF) Bereich von 0,15 bis 1,50 Hz festgelegt, der High Frequency (HF) Bereich von 1,5 bis 5,0 Hz (Just et al., 2000; Thireau et al., 2008). Die Power wurde in absoluten Einheiten in ms^2 für beide Bereiche aufgelistet und gespeichert. Das Ergebnis der FFT wurde von der Software automatisch mit einer Segmentlänge von 2048 Punkten graphisch in einem linearen Koordinatensystem dargestellt, wobei auf der Ordinate die Power Spektrum Density in ms^2/Hz gegen die Frequenz in Hz auf der Abszisse abgetragen wurde. Aus dieser Darstellungsweise ist die Power in ms^2 als Fläche unter der Kurve als Integral erkennbar (Malliani et al., 1991). Nach dem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus unterteilt, wurden die Daten separat in Excel importiert. Neben der absoluten LF und HF erfolgte hier die Ermittlung der LF/HF-Ratio (Tab. 3).

Autonomes Nervensystem und LPS-Effekt Die Erfassung der Kontrolldaten wurde aus je drei 3-Minuten-Segmenten der Ruhe-EKGs gewonnen, die 25–10 Minuten vor den Injektionen aufgezeichnet wurden. 20–40 Minuten nach der Injektion der verschiedenen Substanzen wurden drei weitere 3-Minuten-Abschnitte des EKGs ausgewählt, um den Effekt der Applikationen zu beurteilen (Abb. 10, Thireau et al., 2008).

Tab. 2: Time Domain Parameter und ihre Interpretation

Parameter	Beschreibung (Kleiger et al., 1995)	Interpretation
meanNN (<i>ms</i>)	Arithmetisches Mittel aller normalen RR-Intervalle eines Zeitintervalls (= Kehrwert der Herzfrequenz)	Wirksamkeitsgrad oder Ergebnis der kardiovaskulären Kontrollmechanismen (Akselrod, 1995)
SDNN (<i>ms</i>)	Standardabweichung des Mittelwerts aller normalen RR-Intervalle	umfasst die zur HRV beitragenden, zirkulären Herzfrequenzschwankungen aller Frequenzbereiche (Mallik et al., 1996)
RMSSD (<i>ms</i>)	Wurzel aus dem Quadrat der mittleren Summe der quadrierten Differenzen aufeinander folgender RR-Intervalle	Parameter der Kurzzeitvariabilität, beispielsweise respiratorische Einflüsse, v.a. parasympathisch beeinflusst (Stein et al., 1994)
pNN6 (%)	Anteil aufeinander folgender, normaler RR-Intervalle, deren Differenz über 6 ms beträgt	Parameter der Kurzzeitvariabilität, bester Repräsentant des parasympathischen Tonus, aber auch Parameter mit größter Variabilität und schwieriger Reproduzierbarkeit (Schroeder et al., 2004; Kuss et al., 2008)

Tab. 3: Frequency Domain Parameter und ihre Interpretation

Parameter	Frequenzbereich in dieser Arbeit	Interpretation
Low Frequency (<i>ms²</i>)	0,15 bis 1,5 <i>Hz</i>	Repräsentation sympathischer Einflüsse (Pagani et al., 1986; Malliani et al., 1991; Montano et al., 1994) oder gemischt sympathisch-parasympathisch Einflüsse (Akselrod et al., 1981; Appel et al., 1989) auf die Herzfrequenz
High Frequency (<i>ms²</i>)	1,5 bis 5 <i>Hz</i>	um 0,15 Hz beim Menschen, Repräsentation parasympathischer autonomer Einflüsse auf die Herzfrequenz (Akselrod et al., 1981; Pomeranz et al., 1985; Malliani et al., 1991), respiratorische Sinusarrhythmie (Akselrod, 1995)
LF/HF-Ratio	Verhältnis beider Frequenzbereiche zueinander	Sympathovagale Balance (Pagani et al., 1986; Malliani et al., 1991)

Die Auswahl der Segmente erfolgte manuell nach dem Kriterium der möglichst vollständigen Bewegungsfreiheit. Segmente mit einer motorischen *activity* > 1 wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Aus den 3-Minuten-EKGs wurden die RR-Intervalle extrahiert und für die Berechnung der Time Domain Parameter in *Excel* als Textdatei gespeichert. Für die Frequency Domain Analyse verblieben die RR-Intervalle in der EKG-Analyse-Software, wo sie mittels FFT weiterverarbeitet wurden.

Statistik Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm *WinStat 2001.1* für *Microsoft Excel 2003* durchgeführt. Die Auswertung des postoperativen Beobachtungszeitraums beruht auf der Datenauswahl von neun Wildtyp-Mäusen. Nicht in die Auswertung einbezogen werden konnte eine Wildtyp-Maus, die in Folge der Transmitterimplantation am zweiten postoperativen Tag verstarb. Nach Testung auf Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests erfolgte die Bestimmung der Signifikanz mit dem t-Test für verbundene Stichproben.

Die Beurteilung der Zirkadianität erfolgte anhand der Schwankung der meanNN (und Herzfrequenz) sowie der motorischen Aktivität von 7–19 Uhr und 19–7 Uhr des 1., 5. und 10. postoperativen Tages. Aus den jeweils sechs 3-Minuten- und umgebenden 30-Minuten-Aktivitäts-Intervallen pro Ruhe- (7–19 Uhr) und Aktivitätsphase (19–7 Uhr) wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Die Stabilisierung der Ruhe-HRV wurde anhand der während der Ruhephase der Tiere (7–19 Uhr) am 1., 5. und 10. postoperativen Tag gewonnenen Daten untersucht. Ein Vergleich der Time Domain erfolgte aus den Langzeitaufzeichnungen. Für die statistische Analyse der Frequency Domain wurden aus den jeweils sechs 3-Minuten-Abschnitten der Ruhephase (7–19 Uhr) die Intervalle mit einer 3-Minuten-Aktivität $< 1 \text{ count}/\text{min}$ ausgewählt. Die Aktivität in den umgebenden 30 Minuten lag bei den ausgewählten Intervallen unter $5 \text{ counts}/\text{min}$. Aus den verbliebenen Intervallen wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Für die Auswertung der Injektionsexperimente wurden alle Intervalle mit einer *activity* < 1 eingeschlossen. Als Kontrollwert diente für jede Maus der Mittelwert der jeweiligen 3-Minuten-Intervalle, die vor den Injektionen gewonnen wurden und eine *activity* < 1 aufwiesen. Nach Testung auf Normalverteilung erfolgte die Bestimmung des Signifikanzniveaus mit dem t-Test für verbundene Stichproben. Signifikante Unterschiede der Effekte verschiedener Pharmaka untereinander wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben bestimmt. Als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ festgelegt. Alle in den Tabellen und Abbildungen dargestellten Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben.

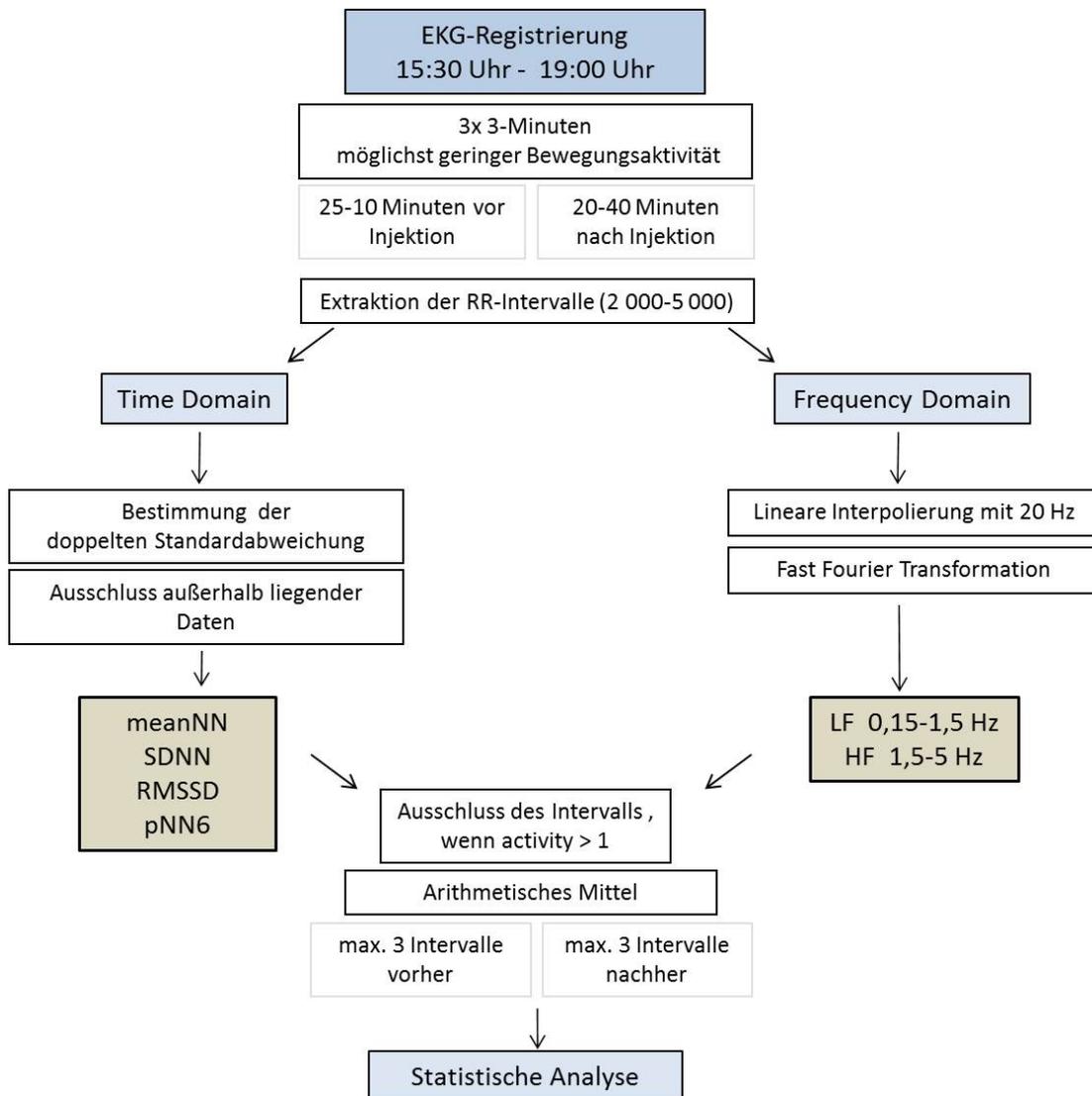


Abb. 10: Algorithmus der Datengewinnung aus den Injektionsversuchen. RR-Intervall=Abstand zwischen zwei normalen aufeinanderfolgenden R-Zacken, meanNN=mittlerer RR-Abstand, SDNN=Standardabweichung des mittleren RR-Abstandes, RMSSD=root mean square of successive differences (Parameter der Kurzzeitvariabilität), pNN6=Prozent der aufeinanderfolgenden RR-Intervalle, die über 6 ms schwanken, LF=Low Frequency, HF=High Frequency.

4 ERGEBNISSE

4.1 Stabilisierung und Eintreten einer zirkadianen Rhythmik nach operativer Transmitterimplantation

Neun von zehn ICR-Wildtyp-Mäusen zeigen unmittelbar nach der Transmitterimplantation einen guten Allgemeinzustand und im weiteren postoperativen Erholungszeitraum von 15 Tagen keine Auffälligkeiten (Hawkins, 2002). Anhand der 24-Stunden-Herzfrequenz-Aufzeichnungen ist die wellenförmige, helligkeitssynchrone Schwankung der Herzfrequenz und mit ihr die zirkadiane Herzfrequenzregulation erkennbar (Abb. 11). Zudem lässt sich die Herzfrequenzvariabilität an der Breite des schwarzen Aufzeichnungstreifens orientierend erkennen.

Das Gewicht ist bei den meisten Tieren nach 15 Tagen stabilisiert. Die zwei Monate alten Wildtyp-Mäuse nehmen deutlich an Gewicht zu (Tab. 4, $> 10\%$). Das Elektrokardiogramm und die Bewegungsaktivität der Mäuse können unmittelbar nach Ende der Operation durch die Telemetrieanlage aufgezeichnet und beobachtet werden, wobei die p-Wellen und QRS-Komplexe deutlich differenzierbar sind. Wie bereits bei der erstmaligen Aufzeichnung eines Maus-EKGs beschrieben (Goldberg et al., 1968), ist die T-Welle auch in den hier durchgeführten EKG-Aufzeichnungen nicht gesondert abgrenzbar (Abb. 8). Entladene Transmitterbatterien führten zu einer unvollständigen Datenaufzeichnung innerhalb des postoperativen Beobachtungszeitraums bei zwei Mäusen, bei weiteren zwei

Tab. 4: Eigenschaften der Versuchstiere

Maus (N = 10)	Alter (Mo)	Gewicht vor Transmitterimplantation (g)	Gewicht nach 15 Tagen (g)
1	4	47,5	46,1
2	4	40,2	40,5
3	13	44,2	41,9
4	7	37,2	40
5	11	40	40,1
6	11	39	37,4
7	2	30	36
8	2	34	38
9	2	31,5	35
10	8	38,8	-*

Es wurden 10 Wildtyp-Tiere untersucht. Alle Tiere waren männlich. Das Alter ist in Monaten (Mo) angegeben.

*Tod der Maus am 2. postoperativen Tag.

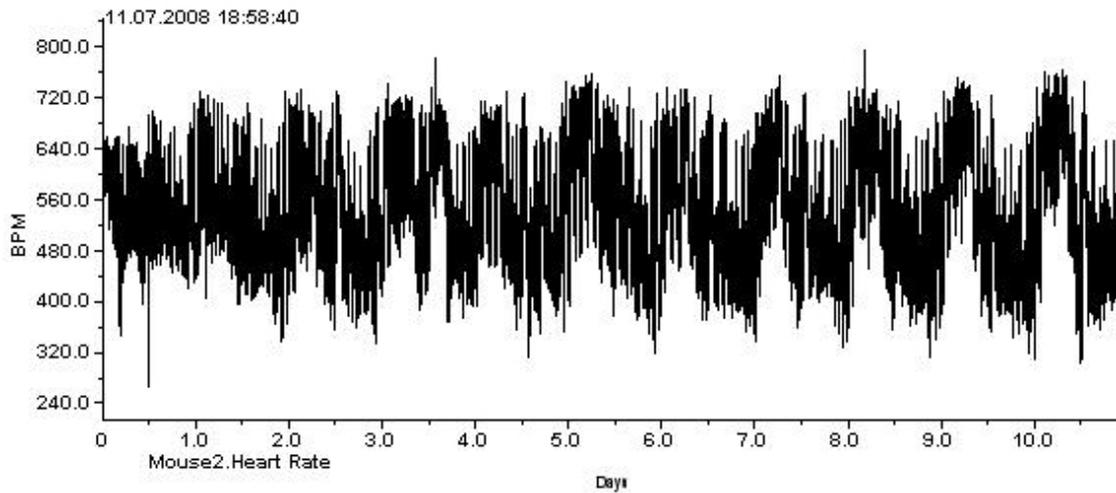


Abb. 11: Herzfrequenzregistrierung einer Wildtyp-Maus für 10 Tage nach Transmitterimplantation. Abszisse: Zeit in Tagen, Ordinate: Herzfrequenz in *BPM* (beats per minute).

Tieren wurde die Aufzeichnung aufgrund von Stromnetz-Schwankungen kurz unterbrochen, ohne dass sich hieraus jedoch Einschränkungen in Bezug auf die Verwertbarkeit der Aufzeichnungen ergeben.

Ruheherzfrequenz und Zirkadianität Die untersuchten Wildtyp-Mäuse zeigen in den ersten 24 Stunden nach der Transmitterimplantation weder einen Unterschied in der Herzfrequenz noch in der motorischen Aktivität zwischen Tag und Nacht (Tab. 5, Tag 1). Ein signifikanter Unterschied der Bewegungsaktivität zwischen Ruhe- und Aktivitätsphase zeigt sich sowohl in den 3-Minuten-Intervallen als auch in den umgebenden 30-Minuten-Intervallen ab dem zehnten postoperativen Tag (Tab. 5, Tag 10: $\text{meanAct3 } 2,4 \pm 1,4$ vs. $13,0 \pm 7,3$, $p = 0,010$; $\text{meanAct33 } 5,0 \pm 2,2$ vs. $9,4 \pm 3,2$, $p = 0,016$). Nachts (19–7 Uhr) ist die Aktivität der Mäuse höher als tags (7–19 Uhr). Der Tag wird als Ruhephase der Tiere deutlich, die Nacht als Aktivitätsphase (Clement et al., 1989).

Die beispielhafte Aktivitätsaufzeichnung einer Wildtyp-Maus über acht Stunden in der Ruhephase (7–19 Uhr), in welcher auch die Injektionsexperimente durchgeführt wurden, lässt das Bewegungsmuster der Tiere erkennen, in welchem sich relativ kurze Phasen starker Aktivität rasch mit Ruhephasen abwechseln (Abb. 12). Die Mäuse zeigen augenscheinlich auch in der Ruhephase kurze Episoden starker Aktivität. Dabei spiegelt sich ein Aktivitätsstoß in der Herzfrequenzaufzeichnung als simultaner, gipfförmiger Herzfrequenzanstieg und -abfall wider, woran eine situationsadaptierte Herzfrequenzregulation

Tab. 5: Herzfrequenz und motorische Aktivität der Wildtyp-Mäuse am 1., 5. und 10. Tag nach operativer Transmitterimplantation

Tag	Parameter	Ruhephase (7-19 Uhr)	Aktivitätsphase (19-7 Uhr)	
1 (N = 8)	meanNN (<i>ms</i>)	105 ± 9	108 ± 17	p = 0,61
	Herzfrequenz(<i>bpm</i>)	573 ± 52	568 ± 81	p = 0,84
	mittlere Aktivität in 3 Minuten (<i>counts/min</i>)	5,5 ± 8,4	7,1 ± 5,5	p = 0,81
	mittlere Aktivität in umgeben- den 30 Minuten (<i>counts/min</i>)	4,5 ± 2,4	6,8 ± 2,1	p = 0,21
5 (N = 6)	meanNN (<i>ms</i>)	110 ± 12	103 ± 11	p = 0,02
	Herzfrequenz (<i>bpm</i>)	548 ± 62	587 ± 61	p = 0,02
	mittlere Aktivität in 3 Minuten (<i>counts/min</i>)	3,9 ± 6,5	15,5 ± 10,0	p = 0,06
	mittlere Aktivität in umgeben- den 30 Minuten (<i>counts/min</i>)	6,1 ± 5,3	8,9 ± 2,5	p = 0,30
10 (N = 7)	meanNN (<i>ms</i>)	114 ± 9	100 ± 8	p = 0,002
	Herzfrequenz <i>bpm</i>)	527 ± 44	604 ± 44	p = 0,002
	mittlere Aktivität in 3 Minuten (<i>counts/min</i>)	2,4 ± 1,4	13,0 ± 7,3	p = 0,010
	mittlere Aktivität in umgeben- den 30 Minuten (<i>counts/min</i>)	5,0 ± 2,2	9,4 ± 3,2	p = 0,016

meanNN=mittlerer RR-Abstand in Millisekunden (*ms*), *bpm*=beats per minute.

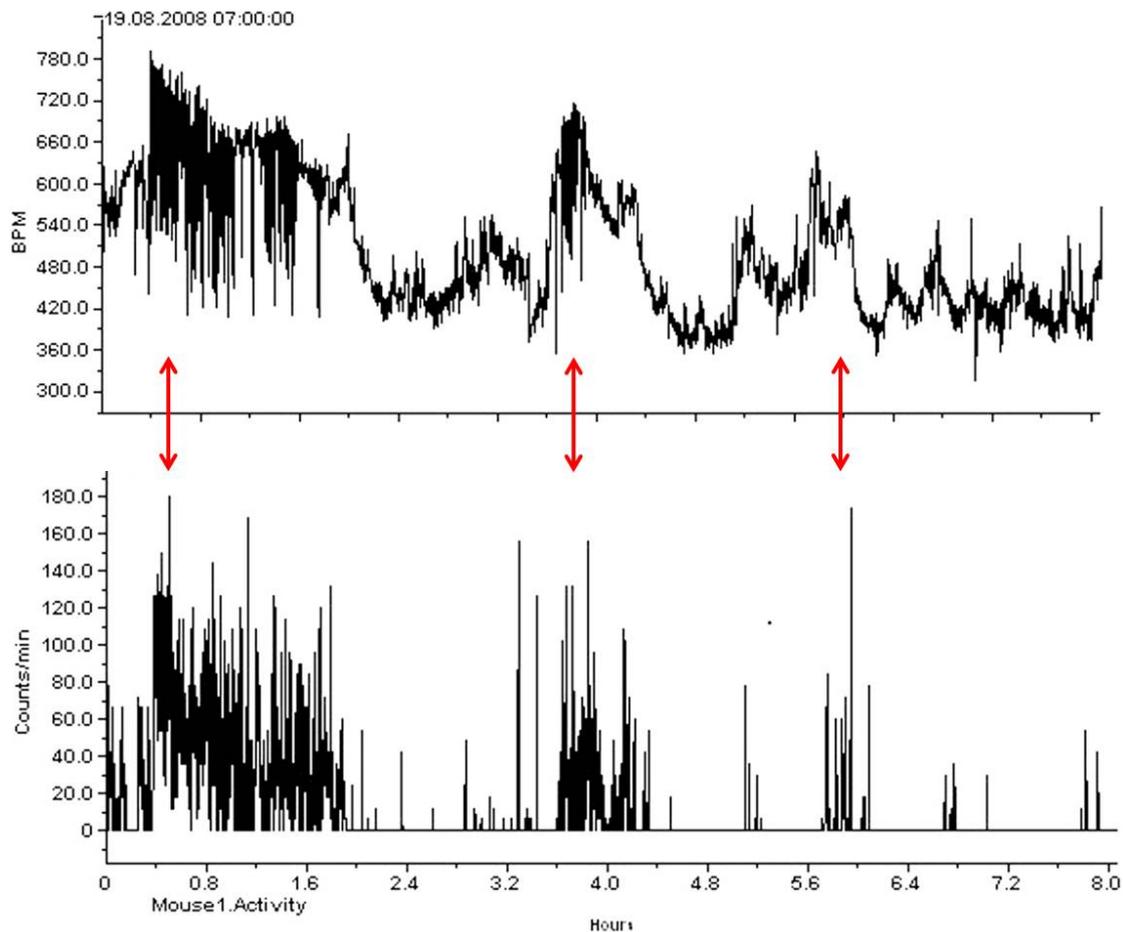


Abb. 12: Herzfrequenzschwankung und korrespondierende motorische Aktivität einer Wildtyp-Maus am Beispiel eines Aufzeichnungsausschnittes über 8 Stunden. Herzfrequenz in *bpm* (beats per minute), activity in *counts/min*.

erkennbar ist (Kramer et al., 1993; Desai et al., 1997).

Am ersten postoperativen Tag wird eine durchschnittliche Ruheherzfrequenz von 573 ± 52 *Schlägen/min* aufgezeichnet, am 5. postoperativen Tag beträgt sie durchschnittlich 548 ± 62 *Schläge/min* ($p = 0,009$). Das Eintreten der zirkadianen Herzfrequenzschwankung zeichnet sich bereits nach 24 Stunden ab und prägt sich kontinuierlich stärker aus (Abb. 11). Die zunehmende Amplitude und Regelmäßigkeit der Tag-Nacht-Schwankung in der Herzfrequenzaufzeichnung ist spätestens ab dem 5. postoperativen Tag eindeutig nachweisbar (548 ± 62 *Schläge/min* vs. 587 ± 61 *Schläge/min*, $p = 0,02$). Besonders fällt auf, dass die Variabilitätsbreite extrem hoch ist: Es werden Spitzenfrequenzen von ca. 720 *Schlägen/min* erreicht, während die Herzfrequenz in Ruhe um mehr als die Häl-

Tab. 6: Parameter der Herzfrequenzvariabilität in der Ruhephase bei ICR-Wildtyp-Mäusen am 1., 5. und 10. Tag nach operativer Transmitterimplantation

TD Parameter	Tag 1	Tag 5	Tag 5 vs. 1 (N = 6)	Tag 10	Tag 10 vs. 5 (N = 5)	Tag 10 vs. 1 (N = 7)
meanNN (<i>ms</i>)	105 ± 9	111 ± 12	p = 0,009	114 ± 9	p = 0,189	p = 0,010
SDNN (<i>ms</i>)	11,7 ± 3,1	16,4 ± 6,9	p = 0,114	17,4 ± 5,1	p = 0,115	p = 0,005
RMSSD (<i>ms</i>)	2,7 ± 1,2	6,5 ± 4,8	p = 0,136	6,2 ± 3,5	p = 0,618	p = 0,071
pNN6 (%)	1,5 ± 0,8	3,9 ± 3,3	p = 0,127	6,6 ± 4,5	p = 0,213	p = 0,029
FD Parameter	Tag 1	Tag 5	Tag 5 vs. 1 (N = 6)	Tag 10	Tag 10 vs. 5 (N = 4)	Tag 10 vs. 1 (N = 6)
LF (ms^2/Hz)	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,4	p = 0,321	1,3 ± 0,3	p = 0,284	p = 0,354
HF (ms^2/Hz)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	p = 0,660	0,4 ± 0,1	p = 0,374	p = 0,660
LF/HF-Ratio	3,9 ± 0,5	3,9 ± 0,3	p = 0,935	3,7 ± 0,3	p = 0,656	p = 0,509

TD=Time Domain, FD=Frequency Domain, meanNN=mittlerer RR-Abstand, SDNN=Standardabweichung aller normalen RR-Intervalle des Aufzeichnungsintervalls, RMSSD=root mean square of successive differences, pNN6= Anteil aufeinanderfolgender RR-Intervalle, die über 6 Millisekunden schwanken, LF=Low Frequency, HF=High Frequency, ms=Millisekunden.

te bis auf 320 *Schläge/min* sinken kann (Abb. 11). Die Schwankung drückt sich auch in den Mittelwerten der Tag- und Nachtfrequenzen aus (Tab. 5). In der Aktivitätsphase liegt die Herzfrequenz am 5. postoperativen Tag bei 587 ± 61 *Schläge/min* und ist damit signifikant höher als in der Ruhephase, in der sie 548 ± 62 *Schläge/min* beträgt (Tab. 5, Tag 5). An Tag 10 hat sich bei den Wildtyp-Mäusen eine Ruheherzfrequenz von 527 ± 44 *Schläge/min* eingestellt. Die Herzfrequenz in der Aktivitätsphase liegt zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich um 77 Schläge höher bei 604 ± 44 *Schläge/min* (Tab. 5, Tag 10).

Zusammenfassend tritt eine zirkadiane Herzfrequenzschwankung bei den Wildtyp-Mäusen bis spätestens zum 5. postoperativen Tag ein. Die Ruheherzfrequenz fällt in den ersten Tagen deutlich ab und wird während des gesamten Beobachtungszeitraums tendenziell langsamer.

Stabilisierung der HRV-Parameter Die SDNN ist bei den Wildtyp-Tieren am ersten Tag mit $11,7 \pm 3,1$ *ms* im Vergleich zum Ende des Beobachtungszeitraums eingeschränkt und zeigt ab dem zehnten Tag nach der operativen Transmitterimplantation signifikant höhere Werte (Tab. 6, Tag 10: $17,4 \pm 5,1$ *ms*, p = 0,005). Der Entwicklung der SDNN sehr ähnlich, zeigen sich in dem zunächst reduzierten pNN6 (Tab. 6, Tag 1: $1,5 \pm 0,8$ %) ab dem

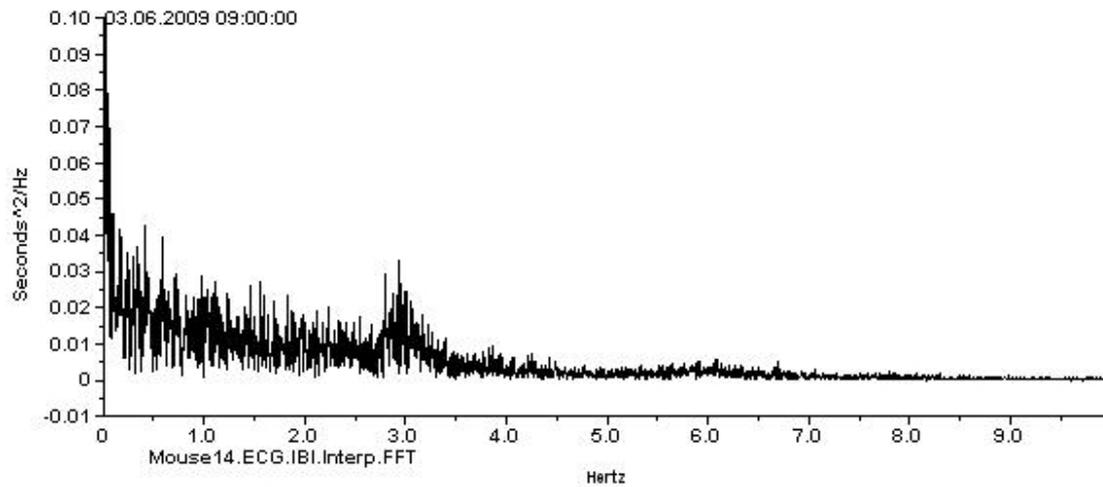


Abb. 13: Beispiel für einen typischen Peak im High Frequency Bereich eines Frequenzspektrums der Ruhephase, $activity = 0$.

zehnten Tag deutlich höhere Werte (Tab. 6, Tag 10: $6,6 \pm 4,5 \%$, $p = 0,029$). Die RMSSD beträgt am zehnten postoperativen Tag in Ruhe $6,2 \pm 3,5 \text{ ms}$. Sie verändert sich im Beobachtungszeitraum nicht. Ebenso zeigen die Frequency Domain Parameter LF, HF und die LF/HF-Ratio im postoperativen Beobachtungszeitraum keine relevanten Veränderungen. Am zehnten Tag beträgt die Power im Low Frequency Bereich $1,3 \pm 0,3 \text{ ms}^2/\text{Hz}$, im High Frequency Bereich $0,4 \pm 0,1 \text{ ms}^2/\text{Hz}$ und die LF/HF-Ratio liegt bei $3,7 \pm 0,3$ (Tab. 6).

In der grafischen Darstellung der Frequency Domain als Frequenzspektrum ($activity < 1$) lassen sich nicht immer eindeutige Peaks abgrenzen. Bei Betrachtung aller Spektren zeigt sich bei den Wildtyp-Mäusen dennoch ein gehäuftes Auftreten eines Peaks unterschiedlicher Amplitude zwischen $1,5$ und $3,5 \text{ Hz}$ (Abb. 13).

Es besteht zusammenfassend eine unmittelbar postoperative Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität in den Time Domain Parametern, wohingegen die Frequency Domain Analyse keine Beeinträchtigung erkennen lässt.

Tab. 7: Veränderung der Time Domain und Frequency Domain Parameter der Herzfrequenzvariabilität durch intraperitoneale Applikation von Propranolol (P), Atropin (A), unter autonomer Blockade (P+A), durch Isoproterenol (I), durch Endotoxin (LPS) sowie durch kombinierte LPS-Gabe und autonome Blockade (LPS+P+A) bei Wildtyp-Mäusen

	meanNN (ms)	SDNN (ms)	RMSSD (ms)	pNN6 (%)	LF (ms ² /Hz)	HF (ms ² /Hz)	LF/HF- Ratio
Kontrolle (N = 48)	128 ± 18	6,6 ± 3,0	6,0 ± 3,0	17,9 ± 17,0	1,7 ± 0,7	0,5 ± 0,2	3,7 ± 0,5
P (N = 11) vs. K	183 ± 51 p* = 0,002	8,0 ± 7,5 p = 0,345	9,4 ± 9,0 p = 0,104	21,3 ± 26,5 p = 0,182	1,7 ± 0,6 p = 0,507	0,4 ± 0,1 p = 0,699	4,5 ± 0,7 p = 0,049
A (N = 9) vs. K	102 ± 10 p = 0,006	2,8 ± 0,9 p = 0,004	2,8 ± 0,5 p = 0,012	0,7 ± 0,9 p = 0,017	1,0 ± 0,3 p = 0,003	0,3 ± 0,1 p = 0,002	3,4 ± 0,5 p = 0,593
P+A (N = 7) vs. K	146 ± 21 p = 0,217	4,2 ± 3,3 p = 0,143	7,5 ± 4,8 p = 0,687	12,8 ± 22,6 p = 0,18	1,8 ± 0,8 p = 0,334	0,5 ± 0,2 p = 0,521	3,8 ± 0,5 0,503
I (N = 6) vs. K	80 ± 2 p = 0,0004	0,8 ± 0,2 p = 0,014	2,1 ± 0,2 p = 0,081	0,3 ± 0,3 p = 0,066	0,9 ± 0,3 p = 0,114	0,4 ± 0,1 p = 0,320	2,6 ± 0,3 p = 0,0008
LPS (N = 8) vs. K vs. P+A	105 ± 16 p = 0,012 p = 0,001	3,6 ± 2,3 p = 0,052 p = 0,690	2,9 ± 1,3 p = 0,009 p = 0,047	2,2 ± 3,6 p = 0,018 p = 0,260	1,0 ± 0,2 p = 0,025 p = 0,022	0,3 ± 0,1 p = 0,133 p = 0,022*	3,7 ± 0,6 p = 0,866 p = 0,836
LPS+P+A (N = 7) vs. K vs. P+A vs. LPS	177 ± 15 p = 0,0006 p = 0,009 p < 0,0001	2,5 ± 1,0 p = 0,011 p = 0,248 p = 0,279	6,4 ± 1,0 p = 0,416 p = 0,585 p < 0,0001	7,1 ± 12,4 p = 0,600 p = 0,569 p = 0,349	1,6 ± 0,2 p = 0,186 p = 0,408 p = 0,0002	0,4 ± 0,1 p = 0,188 p = 0,292 p = 0,0271	4,0 ± 0,9 p = 0,400 p = 0,618 p = 0,527

*die Signifikanztestung erfolgte mittels t-Test. K=Kontrolle, meanNN=mittlerer RR-Abstand, SDNN=Standardabweichung aller normalen RR-Intervalle des Aufzeichnungsintervalls, RMSSD=root mean square of successive differences, pNN6= Anteil aufeinanderfolgender RR-Intervalle, die über 6 Millisekunden schwanken, LF=Low Frequency, HF=High Frequency, ms=Millisekunden.

4.2 Autonome Regulation der Ruheherzfrequenz und der Herzfrequenzvariabilität

Pharmakologische Beeinflussung der Ruheherzfrequenz Die durchschnittliche meanNN der Wildtyp-Mäuse aus den Kurzzeitanalysen (3-Minuten-Intervalle) beträgt 128 ± 18 ms bei einer *activity* < 1 (Tab. 7).

Alle applizierten Substanzen führen aus der Ruhe heraus zu einer signifikanten Veränderung des mittleren RR-Intervalls (Abb. 14). Die Sympathikusblockade durch Propranolol verursacht erwartungsgemäß einen deutlichen Anstieg des mittleren RR-Intervalls von 128 ± 18 ms auf 183 ± 51 ms (Tab. 7, p = 0,002, also eine Senkung der Herzfrequenz). Im

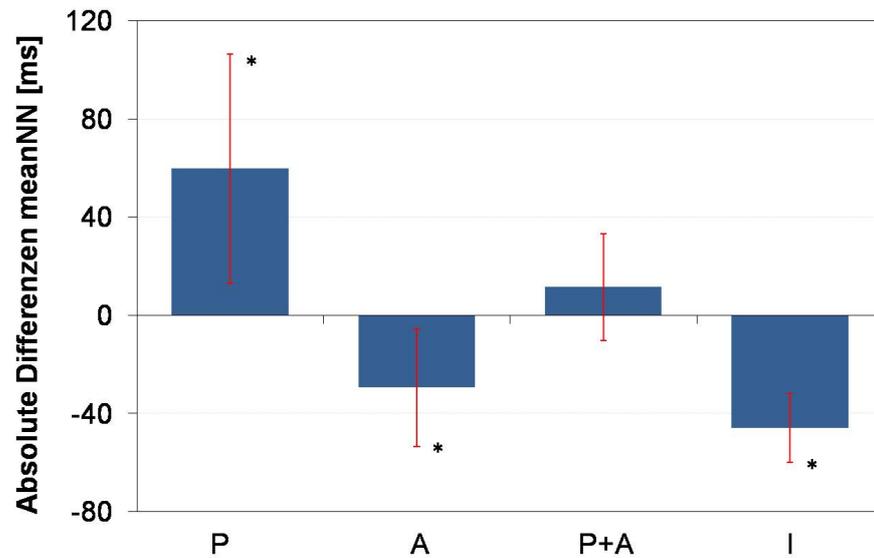


Abb. 14: Einfluss der intraperitonealen Gabe von Propranolol (P), Atropin (A), Isoproterenol (I) sowie der kombinierten autonomen Blockade durch Propranolol und Atropin (P+A) auf das mittlere RR-Intervall im Vergleich zum Ausgangswert vor Injektion. * = $p < 0,05$.

Gegenzug kommt es durch Isoproterenol zu einer Senkung des mittleren RR-Intervalls auf $80 \pm 2 \text{ ms}$ (Abb. 14, Tab. 7, $p = 0,0004$). Diese Reduktion ist stärker als die durch Atropin ebenfalls ausgelöste signifikante meanNN-Senkung (Abb. 14, $p = 0,006$); das mittlere RR-Intervall nach Atropinapplikation beträgt $102 \pm 10 \text{ ms}$ (Tab. 7).

Unter vollständiger autonomer Blockade, herbeigeführt durch kombinierte Gabe von Propranolol und Atropin, steigt das mittlere RR-Intervall von $128 \pm 18 \text{ ms}$ auf $146 \pm 21 \text{ ms}$ an. Diese leichte Bradykardisierung ist jedoch nicht signifikant (Abb. 14, Tab. 7, $p = 0,217$). Alle applizierten Pharmaka führen zusammenfassend zu einer signifikanten Änderung des mittleren RR-Intervalls bei ICR-Wildtyp-Mäusen, wobei Propranolol eine Bradykardisierung, Atropin und Isoproterenol eine Tachykardisierung auslösen. Durch eine komplette autonome Blockade kommt es zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der mittleren RR-Intervalle.

Pharmakologische Beeinflussung der Time Domain Parameter Die pharmakologische Modulation des autonomen Nervensystems hat einen unterschiedlichen Einfluss auf die Time Domain Parameter der Herzfrequenzvariabilität. Bei den Wildtyp-Mäusen betragen die Kontrollwerte für die SDNN $6,6 \pm 3,0 \text{ ms}$, für die RMSSD $6,0 \pm 3,0 \text{ ms}$ und für den pNN6 $17,9 \pm 17,0 \%$ (Tab. 7, S. 27).

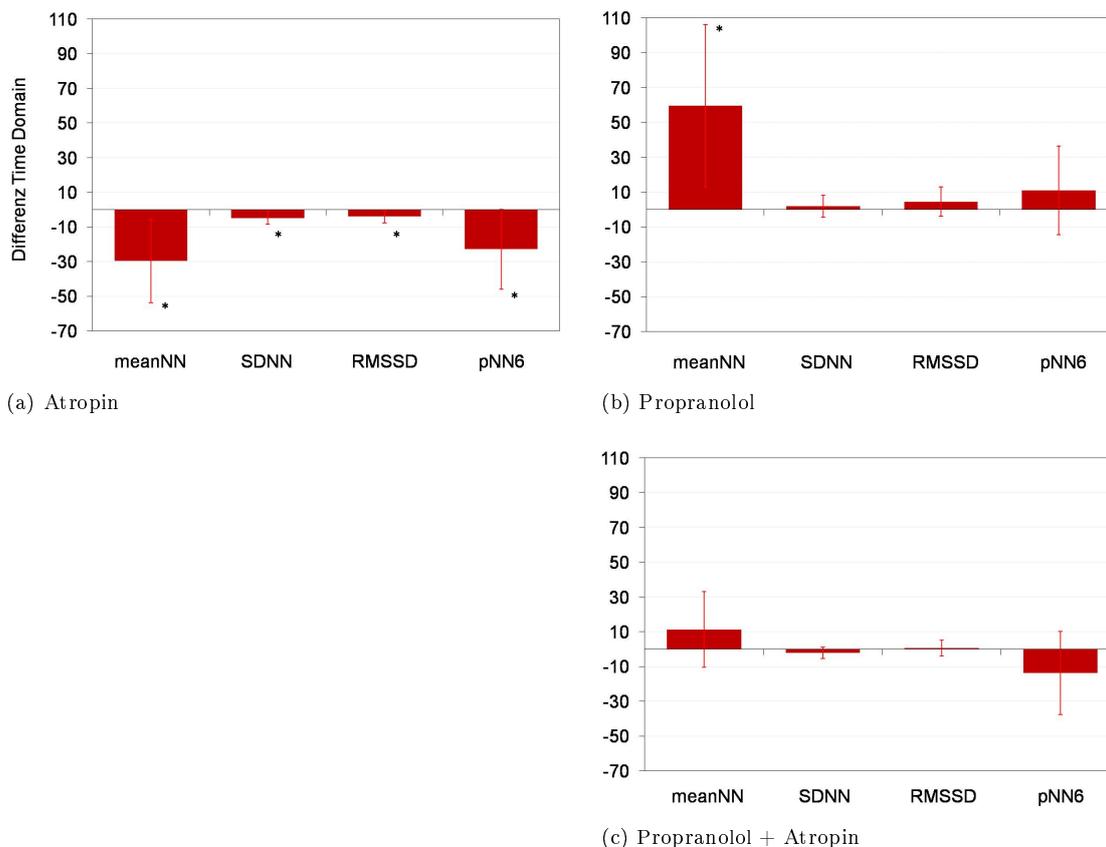


Abb. 15: Veränderung der Time Domain Parameter bei Wildtyp-Mäusen durch Applikation oben genannter Substanzen als Differenz zum Kontrollwert. meanNN=mittlerer RR-Abstand, SDNN=Standardabweichung aller normalen RR-Intervalle des Aufzeichnungsintervalls, RMSSD=root mean square of successive differences, pNN6= Anteil aufeinanderfolgender RR-Intervalle, die über 6 Millisekunden schwanken; meanNN, SDNN und RMSSD in *ms*, pNN6 in %, * = $p < 0,05$.

Parasympathikusblockade durch Atropin resultiert bei den Tieren in einer deutlichen Supprimierung aller Time Domain Parameter. Es hat damit den umfassendsten Effekt aller applizierten Pharmaka zur Beeinflussung des autonomen Nervensystems auf die HRV (Abb. 15a). Die SDNN wird von $6,6 \pm 3,0$ *ms* auf $2,8 \pm 0,9$ *ms* ($p = 0,004$), die RMSSD von $6,0 \pm 3,0$ *ms* auf $2,8 \pm 0,5$ *ms* ($p = 0,012$) und der pNN6 von $17,9 \pm 17,0$ auf $0,7 \pm 0,9$ % ($p = 0,017$) reduziert (Tab. 7, S. 27). Während Sympathikusstimulation durch Isoproterenol ebenfalls zu einer ausgeprägten Tachykardisierung führt, ist von den HRV-Parametern lediglich die SDNN mit $0,8 \pm 0,2$ *ms* stark eingeschränkt (Tab. 7, $p = 0,014$).

Auch die Werte der RMSSD und des pNN6 imponieren nach Isoproterenolapplikation als deutlich reduziert; die statistische Analyse zeigt jedoch, dass diese Veränderungen das definierte Signifikanzniveau verfehlen (Tab. 7).

β -Blockade mittels Propranolol führt bei den Mäusen neben der bereits beschrieb-

nen Bradykardisierung zu keiner signifikanten Veränderung der Time Domain Parameter (vgl. Tab. 7). Ebenso verursacht die autonome Blockade durch kombinierte Gabe von Propranolol und Atropin keine signifikanten Änderungen in der Time Domain (Abb. 15c, Tab. 7).

Zusammenfassend ist die Atropingabe bei den Wildtyp-Mäusen mit einer starken Supprimierung aller Time Domain Parameter der Herzfrequenzvariabilität verbunden, während Propranolol und die kombinierte autonome Blockade keine Veränderungen bewirken. Isoproterenolapplikation führt zu einer leichten Einschränkung der HRV mit einer signifikanten Reduktion der SDNN.

Pharmakologische Beeinflussung der Frequency Domain Parameter In Ruhe wird die Dominanz der Power (ms^2) im Low Frequency (LF) Bereich gegenüber dem High Frequency (HF) Bereich deutlich. Die LF Power beträgt bei den Wildtyp-Tieren $1,7 \pm 0,7 ms^2$, die HF Power $0,5 \pm 0,2 ms^2$, das Verhältnis der beiden wird durch die LF/HF-Ratio ausgedrückt und liegt in Ruhe bei $3,7 \pm 0,5$ (Tab. 7, S. 27).

Atropin führt zu einer signifikanten Senkung der Power in beiden Frequenzabschnitten (Tab. 7). Die LF wird von $1,7 \pm 0,7 ms^2$ auf $1,0 \pm 0,3 ms^2$ ($p = 0,003$) und die HF von $0,5 \pm 0,2 ms^2$ auf $0,3 \pm 0,1 ms^2$ ($p = 0,002$) reduziert. Die Blockierung des parasympathischen Einflusses durch Atropin führt zu einer Abschwächung der Power im gesamten Frequenzspektrum, wobei die Wirkung auf die verschiedenen Bereiche gleichsinnig ist. Das Verhältnis beider Frequenzbereiche zueinander, die LF/HF-Ratio, bleibt durch parasympathische Modulation unbeeinflusst (nach Atropinapplikation $3,4 \pm 0,5$ vs. Kontrollwert $3,7 \pm 0,5$, $p = 0,593$). Der Parasympathikus ist somit entscheidend an der Entstehung der Power in den untersuchten Frequenzbereichen bei Wildtyp-Mäusen beteiligt.

Die sympathische Modulation des Power Density Spektrums ist weniger durch eine eindeutige Veränderung eines einzelnen Frequenz-Bereichs charakterisiert, als durch eine Verschiebung des Spektrums, die sich in der deutlichen Änderung der LF/HF-Ratio zeigt. Durch β -Blockade wird die LF/HF-Ratio von $3,7 \pm 0,5$ auf $4,5 \pm 0,7$ angehoben (Tab. 7, S. 27, $p = 0,049$), durch sympathoadrenerge Erregung hingegen auf $2,6 \pm 0,3$ gesenkt (Tab. 7, S. 27, $p = 0,0008$).

Atropin führt somit bei den untersuchten Wildtyp-Mäusen zu einer Einschränkung der Frequency Domain in beiden untersuchten Frequenzbereichen. Der Einfluss des Sympathikus wird durch die LF/HF-Ratio charakterisiert. Kombinierte autonome Blockade beeinflusst die Frequency Domain nicht nachweisbar.

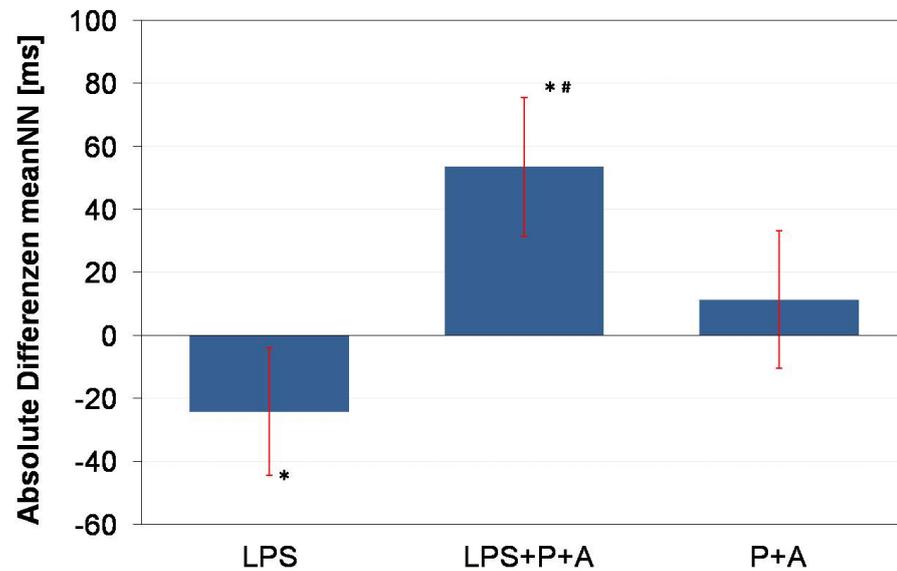


Abb. 16: Änderung des mittleren RR-Abstandes (meanNN) in Millisekunden (*ms*) durch die intraperitoneale Applikation von Endotoxin (LPS), durch Endotoxin unter autonomer Blockade (LPS+P+A) sowie unter alleiniger kombinierten Gabe von Propranolol und Atropin (P+A) bei Wildtyp-Mäusen. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle. # = $p < 0,05$ vs. P+A.

4.3 Einfluss von Endotoxin auf die Ruheherzfrequenz und die Herzfrequenzvariabilität

Die isolierte Applikation von Endotoxin (LPS $0,4 \text{ mg/kg}$) senkt das mittlere RR-Intervall von $128 \pm 18 \text{ ms}$ auf $105 \pm 16 \text{ ms}$ (Abb. 16, $p = 0,012$). Diese Herzfrequenzbeschleunigung ist im gewählten Auswertungszeitraum von 20 bis 40 Minuten nach Injektion nachweisbar, tritt also rasch nach der Injektion ein. Desweiteren führt die Injektion von Endotoxin sofort zu einer deutlichen Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität (Tab. 7, S. 27). Die RMSSD wird von $6,0 \pm 3,0 \text{ ms}$ auf $2,9 \pm 1,3 \text{ ms}$ ($p = 0,009$) und der pNN6 von $17,9 \pm 17,0 \%$ auf $2,2 \pm 3,6 \%$ ($p = 0,018$) reduziert (Abb. 17a, S. 32). Die SDNN sinkt von $6,6 \pm 3,0 \text{ ms}$ auf $3,6 \pm 2,3 \text{ ms}$ ($p = 0,052$). In der Frequency Domain dominiert die Beeinflussung der Low Frequency Power durch LPS-Applikation (Abb. 18). Diese wird von $1,7 \pm 0,7 \text{ ms}^2$ auf $1,0 \pm 0,2 \text{ ms}^2$ gesenkt (Tab. 7, S. 27, $p = 0,025$). Im High Frequency Bereich ist die Reduktion der Power von $0,5 \pm 0,2 \text{ ms}^2$ auf $0,3 \pm 0,1 \text{ ms}^2$ nicht signifikant ($p = 0,113$). Das Verhältnis beider Frequenzbereiche zueinander wird nicht beeinflusst. Die LF/HF-Ratio liegt unter Kontrollbedingungen bei $3,7 \pm 0,5$, nach LPS-Applikation bei $3,7 \pm 0,6$ ($p = 0,866$).

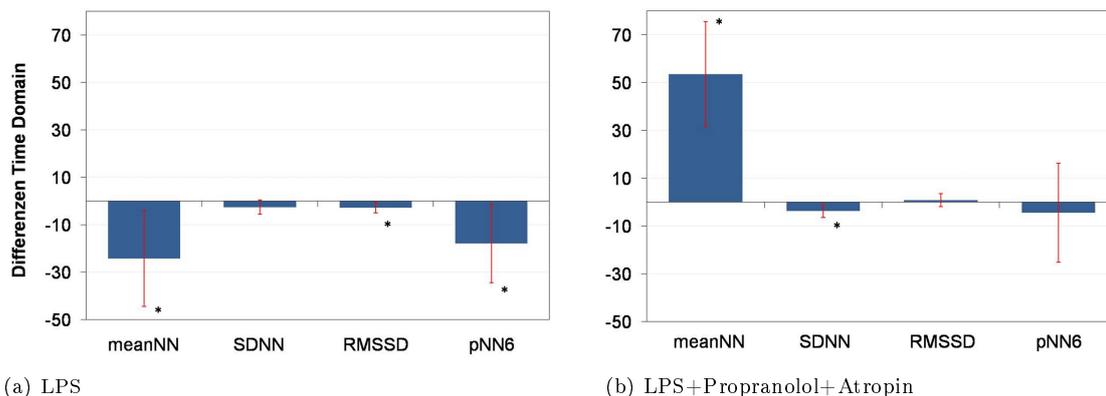


Abb. 17: Veränderung der Time Domain Parameter bei Wildtyp-Mäusen durch Applikation von Endotoxin (LPS) und Endotoxin unter autonomer Blockade. meanNN, SDNN, RMSSD in *ms*, pNN6 in *%*. * = $p < 0,05$.

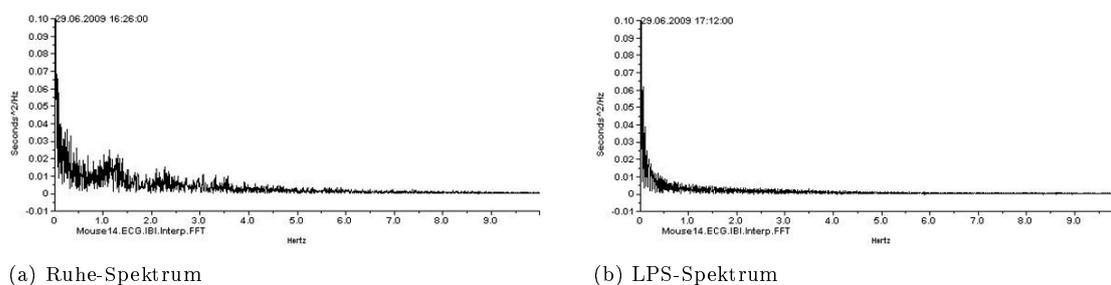
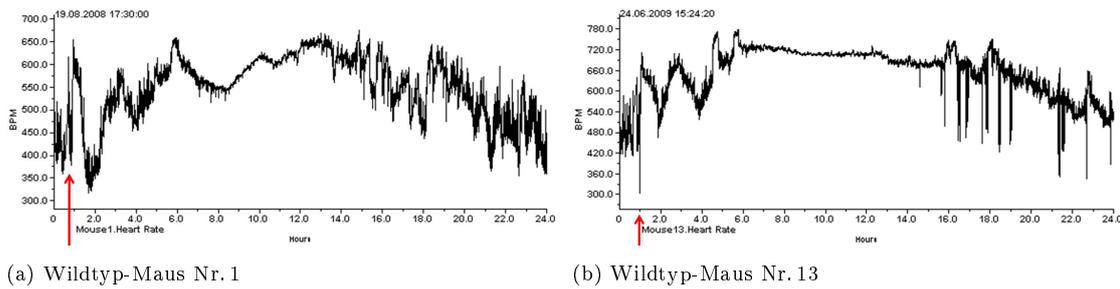


Abb. 18: Frequency Domain Spektrum vor (a) und nach (b) LPS-Applikation. Der reduzierende Effekt des LPS auf die LF- und HF Power zeigt sich in den Originalaufzeichnungen nicht immer, da in dem Ruhe-Spektrum einzelne Peaks nur selten abgrenzbar sind. Eine unspezifische Reduktion der Power ist jedoch häufig erkennbar.

In den graphischen Darstellungen der Herzfrequenzaufzeichnung ist die HRV-Einengung mit einer mehrstündigen Latenz erkennbar (Abb. 19). Bei den in Abbildung 19 dargestellten Aufzeichnungen zweier ICR-Mäuse kommt es initial nach LPS-Injektion zu einer Tachykardisierung. Bei der ersten Maus (Abb. 19a) fällt die Herzfrequenz daraufhin noch einmal kurz ab, bevor es zu einem zackenförmiger Anstieg kommt. Die Herzfrequenz der anderen Maus (Abb. 19b) steigt sofort zackenförmig an. Nach durchschnittlich vier bis sechs Stunden mündet der Anstieg in ein schmales, hohes Herzfrequenzplateau (Abb. 19). Die synchrone Verschmälerung des Aufzeichnungstreifens lässt die reduzierte Herzfrequenz-Undulation während dieser Phase erahnen. Diese Tachykardisierung und Herzfrequenzversteifung kann bis zu 15 Stunden nach der Injektion andauern. Während die hier präsentierten Daten der HRV-Einschränkung und Herzfrequenzbeeinflussung durch Endotoxin direkt nach der LPS-Applikation erhoben wurden (20–40 Minuten nach Injektion) und daher eine direkte LPS-Wirkung zu vermuten ist, handelt es sich



(a) Wildtyp-Maus Nr. 1

(b) Wildtyp-Maus Nr. 13

Abb. 19: Kontinuierliche EKG-Registrierung zweier Wildtyp-Mäuse eine Stunde vor bis 24 Stunden nach intraperitonealer Endotoxin-Applikation (LPS $0,4 \text{ mg/kg}$). Der Pfeil markiert den Injektionszeitpunkt. BPM= beats per minute.

bei dem Phänomen der langanhaltenden HRV-Suppression wahrscheinlich um sekundäre Effekte, z. B. durch das Immun- bzw. zentrale Nervensystem vermittelt, und sind nicht Folge einer direkten Interaktion von LPS am Herzen.

Im Gegensatz zu der sofort einsetzenden Tachykardie, die durch alleinige LPS-Applikation ausgelöst wird, führt eine Endotoxin-Gabe unter autonomer Blockade mittels Atropin und Propranolol bei ICR-Wildtyp-Mäusen unmittelbar zu einer ausgeprägten Bradykardisierung (Abb. 16, S. 31). Die meanNN steigt von $128 \pm 18 \text{ ms}$ auf $177 \pm 15 \text{ ms}$ an (Tab. 7, S. 27, $p = 0,0006$). Diese Reduktion der Herzfrequenz unterscheidet sich signifikant von der Veränderung der mittleren RR-Intervalle durch alleinige autonome Blockade (Abb. 16, S. 31; Tab. 7, $p = 0,009$). Der Einfluss des LPS auf die Herzfrequenzvariabilitätsparameter ist unter autonomer Blockade deutlich geringer ausgeprägt als unter isolierter LPS-Applikation. Von den Time Domain Parametern ist lediglich die SDNN von $6,6 \pm 3,0 \text{ ms}$ auf $2,5 \pm 1,0 \text{ ms}$ reduziert ($p = 0,011$). Die übrigen Time Domain Parameter verändern sich kaum (Tab. 7). Die durch Endotoxin ausgelöste Reduktion der Low Frequency Power ist unter autonomer Blockade nahezu vollständig aufgehoben.

LPS-Applikation führt zusammenfassend bei ICR-Wildtyp-Mäusen unmittelbar zu einer Tachykardisierung während Applikation von Endotoxin unter kombinierter autonomer Blockade eine Bradykardisierung bewirkt. LPS verursacht bei Wildtyp-Mäusen ca. 20-40 Minuten nach Applikation eine ausgedehnte Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität mit einer signifikanten Reduktion der RMSSD, des pNN6 sowie der LF Power. LPS unter autonomer Blockade führt zu einer deutlich geringer ausgeprägten HRV-Einschränkung.

5 DISKUSSION

5.1 Telemetrische Datengewinnung an Mäusen

Mit der Einführung kommerziell verfügbarer Telemetrie-Systeme und der damit verbundenen Möglichkeit, Operations- und Aufzeichnungstechniken sowie die telemetrische Datengewinnung zu standardisieren und vergleichbar zu machen, ist es seit dem Ende der 1980er-Jahre gelungen, eine Vielzahl biometrischer Daten von wachen, sich frei bewegenden Labormäusen zu gewinnen (Kramer and Kinter, 2003). John G. Clement führte 1989 die ersten telemetrischen Aufzeichnungen der Bewegungsaktivität mittels eines solch kommerziell verfügbaren Systems an männlichen ICR-Mäusen durch (Clement et al., 1989). Die Bewegungsaktivität und Körpertemperatur seiner Tiere hatten sich vier Tage nach dem operativen Eingriff stabilisiert.

Über die erste telemetrische Aufzeichnung eines Maus-EKGs und der Herzfrequenz von Mäusen berichtete 1993 Klaas Kramer (Kramer et al., 1993). Er beobachtete eine Normalisierung der Ruheherzfrequenz bereits einen Tag nach der operativen Systemimplantation, während die Normalisierung des Trink- und Fressverhaltens sowie des Bewegungsmusters nach vier Tagen eintrat. Auf die Notwendigkeit einer Stabilisierungs- und Erholungsphase nach der initial durch die Operation und die Anästhesie ausgelösten Stresssituation wiesen sowohl Clement als auch Kramer hin und empfahlen einen Regenerationszeitraum von einer Woche.

Über die Vorteile der telemetrischen Datengewinnung besteht Einigkeit (Kramer and Kinter, 2003; Hoyt et al., 2007). Mittels der Telemetrie ist es möglich, physiologische Parameter sich frei bewegender Tiere unter Reduktion experimenteller Stressfaktoren zu erfassen und damit möglichst realitätsnahe Messungen zu erhalten. Es werden jedoch unterschiedliche Zeitpunkte für den Beginn der Experimente nach operativer Transmitterimplantation als günstig erachtet. Mit den experimentellen Durchführungen begannen Studien 1 Tag (Desai et al., 1997), 3 bis 6 (Uechi et al., 1998), 3 bis 7 Tage (Gehrmann et al., 2000; Ishii et al., 1996), 6 (Shusterman et al., 2002), 7 Tage (Clement et al., 1989), 10 (Thireau et al., 2008) oder 14 Tage (Baudrie et al., 2007) nach der Implantation der Telemetrietransmitter.

Diese abweichenden Angaben ergeben sich aus der Nutzung unterschiedlicher Parameter, die zur Einschätzung der Beeinträchtigung der Tiere sowie der Stabilität der aufgezeichneten Daten herangezogen werden. Sie umfassen u. a. die Stabilisierung des Blut-

drucks, der Herzfrequenz, der Herzfrequenzvariabilität (HRV) und des Körpergewichts, das Eintreten eines zirkadianen Verhaltensmusters, das Putz-, Trink- und Fressverhalten, die Bewegungsaktivität, das Schmerzverhalten sowie die Gewöhnung an den implantierten Fremdkörper (Baumans et al., 2001; Leon et al., 2004). Weiterhin gelten die Verwendung verschiedener Operationstechniken (Gehrmann et al., 2000) oder unterschiedlicher Materialien (Baumans et al., 2001), das unterschiedliche postoperative Schmerz- und Tierhaltungs-Management (Leon et al., 2004), der Einsatz verschiedener Mausstämme (beispielsweise ICR, C57BL/6J und FVB) oder differierende Auswertungsalgorithmen als Grund für die unterschiedlichen Berichte. Einige Studien begründen die Wahl der Länge der Stabilisierungsphase nicht (Joaquim et al., 2004; Witte et al., 2004). Eine Übersicht über Studien an verschiedenen Wildtyp-Stämmen, die die telemetrische Herzfrequenz-Aufzeichnung mit einschließen, bietet Tabelle 8.

Während Kramer über eine Stabilisierung der Herzfrequenzaufzeichnungen bereits am 1. Tag nach Transmitterimplantation berichtet (Kramer et al., 1993), beobachtet Ben J. A. Janssen eine stabile 24-Stunden-Schwankung der Herzfrequenz ab dem 5. Tag (Janssen et al., 2000). Thireau unterbreitete 2008 den Vorschlag eines standardisierten Verfahrens zur Erfassung der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität bei Mäusen (Thireau et al., 2008), dem in der vorliegenden Arbeit gefolgt wurde. In diesem Zusammenhang berichtet er über eine Stabilisierung der Herzfrequenz am 4. Tag nach dem Eingriff. Durch die operative Implantation des Telemetrietransmitters würde die Herzfrequenzvariabilität hingegen zunächst überschätzt und zeige erst nach mindestens 10 Tagen eine ausreichende Stabilisierung.

Die hier untersuchten ICR-Wildtyp-Mäuse zeigen eine signifikante zirkadiane Herzfrequenzschwankung ab dem 5. Tag nach der intraperitonealen Transmitterimplantation mit hohen Herzfrequenzen in der Nacht und niedrigeren Herzfrequenzen am Tag. Die zirkadiane Schwankung der motorischen Aktivität ist ab dem 10. postoperativen Tag signifikant.

Die Ruheherzfrequenz der hier untersuchten ICR-Wildtyp-Mäuse ist am 1. Tag nach der Transmitter-Implantation, möglicherweise als Zeichen des operativen Stresses, erhöht (Just et al., 2000). Sie sinkt signifikant bis zum 5. Tag und liegt 10 Tage nach der Transmitterimplantation in dem Spektrum der für Mäuse als typisch geltenden Ruheherzfrequenzen von 450–550 *Schläge/min* (Desai et al., 1997; Hoyt et al., 2007).

Die Herzfrequenzvariabilität ist in den eigenen Untersuchungen direkt nach der Trans-

Tab. 8: Übersicht der telemetrischen Herzfrequenz- und HRV-Gewinnung an Wildtyp-Mäusen

Studie	Mausstamm	Ruhe-Hf (<i>bpm</i>)	Intervall nach Transmitterim- plantation	pharmakologische Veränderung der Hf
Kramer et al., 1993	Balb/c	450-500	Hf normal nach 1 Tag	
Ishii et al., 1996	ICR	576	3-7 Tage	A>B
Mansier et al., 1996	C57BL/6J	500	nicht publiziert	B>A
Desai et al., 1997	verschiedene*	503	24 Stunden	B>A
	ICR	539		
Uechi et al., 1998	C57BL/6J	568	3-6 Tage	B=A
Janssen et al., 2000	Swiss mice	670	5. Tag	B>A
Gehrmann et al., 2000	C57BL/6J	724	4-6 Tage	B>A
Just et al., 2000	C57BL/6J	662		B>A
Shusterman et al., 2002	FVB	680	6 Tage	B>A
	C57BL/6J	606	6 Tage	A>B
Williams et al., 2003	B6	548	10 Tage	nicht untersucht
Joaquim et al., 2004	C57BL/6J	540	6 Tage	nicht untersucht
Witte et al., 2004 ^o	Wildtyp	598	5 Tage	B deutlicher Effekt
Campen et al., 2005 [□]	C57BL/6J	630	5 Tage	nicht untersucht
	Balb/cJ	583		
Adachi et al., 2006	C57BL/6J	-	7 Tage	nicht untersucht
Ecker et al., 2006	FVB	638 (24h)	2 Wochen	nicht untersucht
Arras et al., 2007	NMRI	-	10 Tage	nicht untersucht
Baudrie et al., 2007	C57BL/6J	418	2 Wochen	A>B
Thireau et al., 2008	FVB/N	637 [†]	Hf 4 Tage; HRV 10 Tage	nicht untersucht
Fairchild et al., 2009	C57BL/6J	500-600 [‡]	6 Tage (Ruhe-HRV)	nicht untersucht
Eigene Studie	ICR	527	Hf und zirkadiane Schwankung 5 Tage, HRV 10 Tage	B=A

B= β -Blockade, A=Atropin. Hf=Herzfrequenz, HRV=Herzfrequenzvariabilität, *bpm*=beats per minute,

*durchschnittliche Herzfrequenz der sechs Mausstämmen C3H/HeNcrLBR, FVB/NcrLBR/, C57BL/6J, Swiss mice, SV129, ICR. ^oWildtyp nicht näher bezeichnet, durchschnittliche Hf über 24 h. [□]Es sind nur 2 von 6 untersuchten Mausstämmen aufgezeigt. Die Daten zeigen die *baseline*-Herzfrequenz ohne nähere Angaben.

[†]meanNN 94,13 ms, [‡]Ruheherzfrequenz nicht gesondert aufgezeigt.

mitterimplantation entgegen den Beobachtungen der Arbeitsgruppe Thireaus, deutlich eingeschränkt (Thireau et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass die HRV-Parameter unmittelbar nach Transmitterimplantation nicht den physiologischen autonomen Tonus der Tiere widerspiegeln, sondern deren postoperative Stress-Reaktion. Die SDNN und der pNN6 zeigen erst ab dem 10. Tag nach Transmitterimplantation signifikant höhere Werte. Der Anstieg der HRV, vor allem des pNN6 deutet auf die zunehmende Bedeutung des Parasympathikus in der Regulation der Ruheherzfrequenz mit der zunehmenden postoperativen Erholung hin und lässt umgekehrt den Schluss zu, dass in der postoperativen Phase zunächst ein stressbedingt erhöhter Sympathikotonus vorherrscht (Malliani et al., 1994; Ecker et al., 2006; Arras et al., 2007).

Eine Komponente dieses Stresses kann u. a. Schmerz sein. Margarete Arras verweist darauf, dass eine Tachykardisierung und HRV-Einschränkung bei leichten bis moderaten Schmerzen bei normal erscheinendem Verhalten und Aussehen der Tiere das einzige Hinweiszeichen auf Schmerz sein kann (Arras et al., 2007). Obwohl die Herzfrequenz und die HRV von vielen Faktoren beeinflusst werden, besteht bei den untersuchten Tieren trotz Analgesierung somit möglicherweise für mindestens 24 Stunden ein "Restschmerz". Ein intensiviertes Schmerzregime für die ersten drei postoperativen Tage sollte daher bei zukünftigen Implantationen erwogen werden.

Die zirkadiane Schwankung der Herzfrequenz entsteht vor allem durch das kontinuierliche Absinken der Ruheherzfrequenz. Die Herzfrequenz in der Aktivitätsphase ist im postoperativen Überwachungszeitraum durchgängig hoch: in Übereinstimmung mit der Entwicklung der HRV zu Beginn möglicherweise als Korrelat des operativ bedingten Stresses, mit der steigenden Bewegungsaktivität zum 10. Tag hin mehr und mehr als physiologisch situationsadaptiert. Diese Absenkung der Ruheherzfrequenz, die HRV-Steigerung und die situationsadaptierte Herzfrequenzerhöhung können als Zeichen der postoperativen Erholung der Tiere interpretiert werden. In Einklang mit Thireau und Veronique Baudrie stabilisieren sich die Herzfrequenz und die zirkadianen Schwankung bis zum 5. postoperativen Tag; die HRV-Normalisierung benötigt auch in den hier vorgestellten Experimenten die empfohlene Mindestdauer von 10 Tagen (Baudrie et al., 2007; Thireau et al., 2008).

Lisa Leon verwies darauf, dass trotz der in ihrer Arbeit ebenfalls beobachteten Stabilisierung der zirkadianen Bewegungsaktivität ab dem 5. postoperativen Tag die Normalisierung einer Vielzahl von Körperfunktionen erst deutlich später einträte (Leon et al.,

2004). So normalisiere sich beispielsweise das Körpergewicht erst nach 15 Tagen. Frühere Studien berichten über ein Wiedererlangen des Ausgangsgewichts nach 18–20 Tagen (Clement et al., 1989; Kramer et al., 1993). Baumans geht von einer vollständigen Erholung der Tiere aus, wenn das Gewicht nach 14 Tagen wieder die Ausgangswerte erreicht hat (Baumans et al., 2001). Die Normalisierung aller Körperfunktionen bei den untersuchten Mäusen ist umso wichtiger, als dass eine Reduktion der Herzfrequenz und eine Erhöhung der HRV u. a. durch verminderte Nahrungszufuhr ausgelöst werden können (Williams et al., 2003). Der Nachweis des Eintritts zirkadianen Verhaltens reiche Leon zufolge daher nicht aus, um die postoperative Erholung zu beurteilen, auch die Herzfrequenz- und HRV-Stabilisierung wären nur ein Hinweis (Arras et al., 2007). In den hier vorgestellten Untersuchungen war die postoperative Entwicklung der Körperfunktionen nicht Gegenstand der Untersuchung. Mit dem Verweis auf die Arbeit Leons und Baumans wurden nach der Stabilisierung der aufgezeichneten Parameter bis zum 10. Tag weitere 5 Tage zur Erholung der Körperfunktionen hinzugefügt (Baumans et al., 2001; Leon et al., 2004). Da die Mäuse in diesem Zeitraum keine Verhaltensauffälligkeiten zeigten und der Gewichtsverlust nach 15 Tagen deutlich unter 10 % lag, wurde davon ausgegangen, dass sich die Tiere am Ende der 15 Tage von der Operation komplett erholt hatten.

5.2 Herzfrequenzvariabilität in Mensch und Maus – Rückschlüsse auf die Regulation des autonomen Nervensystems

Die Herzfrequenzvariabilität (HRV) beschreibt die physiologische Schwankungsbreite des Sinusrhythmus, die sich zum einen in einer adäquaten situationsadaptierten Herzfrequenzanpassung, zum anderen in der Variation der einzelnen, aufeinander folgenden Sinuserregungen als Reaktion auf interne und externe Einflüsse in Ruhe ausdrückt (Abb. 20). Sie ist das Ergebnis der direkten Modulation des Schrittmacherstroms I_f des Herzens durch das autonome Nervensystem. In Interaktion mit dem zentralen Nervensystem, Hormonen, Zytokinen und weiterer Mediatoren vermittelt es physiologische Regulationsmechanismen im Körper, die sich in der HRV abbilden (Saykrs, 1973; Malik et al., 1996). Die HRV als messbares Ausgangssignal eines komplexen Netzwerks entsteht somit aus der intakten Kommunikation des Körpers mit seiner Umwelt und der Integrität des Körpers selbst (Pincus, 1994). Eine Einschränkung der physiologischen Variationsbreite der Herzfrequenz tritt beispielsweise mit zunehmendem Alter ein, zudem scheint es eine geschlechtsspezifische Variation zu geben (Moodithaya and Avadhany, 2012). Eine

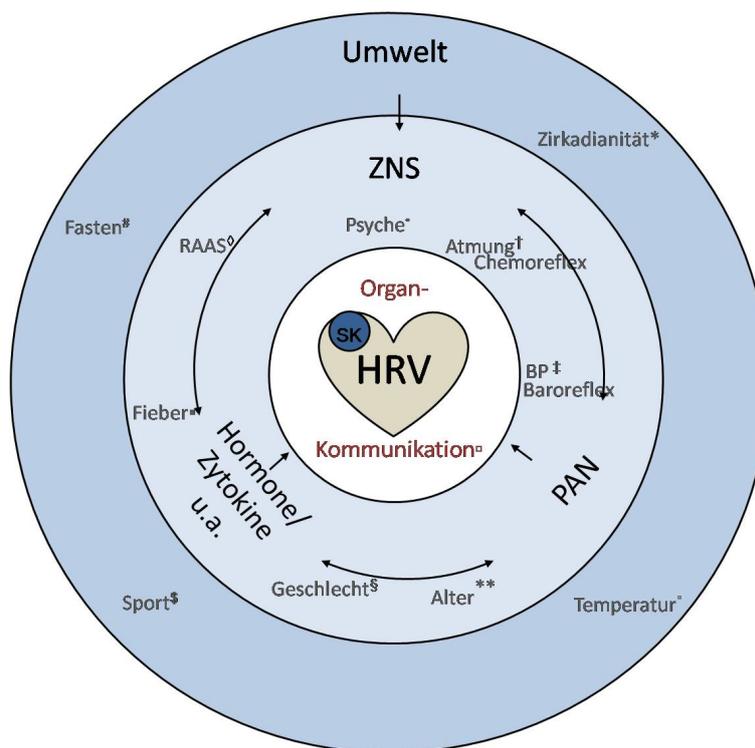


Abb. 20: Entstehungsmodell der Herzfrequenzvariabilität (HRV). Auswahl an Einflussfaktoren und Studien. ZNS=Zentrales Nervensystem, SK=Sinusknoten, PAN=peripheres autonomes Nervensystem, RAAS=Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem, °Akselrod et al., 1981. *Furlan et al., 1990; Fallen and Kamath, 1995. •Saykrs, 1973; Pagani et al., 1995. ‡Saykrs, 1973; La Rovere et al., 1995. #Williams et al., 2003. §Hottenrott et al., 2006. †Saykrs, 1973; Aysin and Aysin, 2006. §Moodithaya and Avadhany, 2012. **Pagani et al., 1986.

hochgradige Minderung der HRV hat pathologische Bedeutung und wird im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder beobachtet (z. B. Odemuyiwa, 1995; Casolo, 1995; Rechlin, 1995; Malik et al., 1996; Wang et al., 2000). Sie hat sich u. a. als starker negativer Prädiktor für den klinischen Verlauf von Patienten mit Multiorgan-Dysfunktionssyndrom herausgestellt (Schmidt et al., 2005).

Initiale Beobachtungen der Kopplung und gegenseitigen Beeinflussung physiologischer Regulationskreise wurden bereits im 18. Jh. für Herzfrequenz und Atmung und im 19. Jh. für Herzfrequenz und Blutdruck datiert (Berntson et al., 1997). Die Verbindung von HRV und autonomen Nervensystem wurde Gary G. Berntson zufolge Anfang des 20. Jh. erkannt, wobei die Bedeutung der vagalen Kontrolle hervorgehoben wurde. Matthew N. Levy betonte 1971 die entscheidende Rolle zentraler autonomer Einflüsse

für die Funktion des Herzens und deren komplexe Interaktion (Levy, 1971). Er stellte dabei heraus, dass die parasympathische Regulation der Herzfunktion die sympathische übergeordnet beeinflussen kann und dem N. vagus daher die dominierende Rolle in der autonomen Kontrolle beim Menschen zukomme. Mit der Entwicklung der Spektralanalyse seit dem Ende des 19. Jh. und der Etablierung automatisierter, computergestützter Verfahren der Fast Fourier Transformation vor allem ab den 1960er-Jahren (Kay and Marple, 1981) wurde diese zur Untersuchung von Herzfrequenzschwankungen genutzt und ein $1/f$ -Spektrum mit typischen Peaks beobachtet (Akselrod, 1995; Cerutti et al., 1995). Vor dem Hintergrund der großen Bedeutung des autonomen Nervensystems in der Herzfrequenzregulation stellten sich eine Vielzahl an Studien die Frage nach der Präsentation der autonomen Partner in den HRV-Parametern (beispielsweise Chess et al., 1975; Akselrod et al., 1981; Pomeranz et al., 1985; Pagani et al., 1986; Hayano et al., 1991).

Die HRV-Guidelines der *Task Force of The European Society of Cardiology and The Northern American Society of Pacing and Electrophysiology* unterscheiden die zeitabhängige Analyse (Time Domain) und die frequenzabhängige Analyse (Frequency Domain) der HRV. In der Time Domain geben der mittlere RR-Abstand (meanNN) und die Standardabweichung der mittleren RR-Abstände (SDNN) einen allgemeinen Hinweis auf die HRV und berücksichtigen die Langzeit- und die Kurzzeitvariabilität (Malik et al., 1996). Die Höhe der Herzfrequenz kann dabei ein entscheidender Hinweis auf die Dominanz des autonomen Partners geben – eine hohe Herzfrequenz ist unter physiologischen Bedingungen Hinweis auf die Dominanz des Sympathikus, eine niedrige Frequenz auf die des Parasympathikus (Malliani et al., 1994).

Über die Ruhe-meanNN kann die Reaktion der Herzfrequenz auf die experimentelle Applikation von Pharmaka, die den autonomen Einfluss am Herzen modifizieren, abgeschätzt werden (Shusterman et al., 2002). Die RMSSD (Wurzel aus dem Quadrat der Summe der quadrierten Differenzen aufeinanderfolgender RR-Abstände) und der pNN50 (Anteil der aufeinanderfolgenden RR-Abstände, die über 50 ms differieren) präsentieren beim Menschen vor allem den parasympathischen Einfluss auf die Herzfrequenz und mit diesem den Atemrhythmus (Malik et al., 1996). Die parasympathische Dominanz in sämtlichen HRV-Parametern wurde ebenfalls beschrieben (Hayano et al., 1991).

Die Frequenz-Analyse der Herzfrequenzvariabilität zeigt mehrere typische Peaks, die beim Menschen klassisch in die Low Frequency Domain von 0,04–0,15 Hz und die High Frequency Domain von 0,15–0,4 Hz eingeteilt werden (Malik et al., 1996). Hinzu kommt

die Very Low Frequency im Bereich sehr niedriger Frequenzen (Cerutti et al., 1995). Die High Frequency Power entsteht in Übereinstimmung vieler Studien beim Menschen durch den Parasympathikus. Die vagale Präsentation in der High Frequency bei Menschen und großen Säugetieren wurde mittels elektrischer Vagusstimulation (Akselrod et al., 1981), durch Blockade muskarinerg Acetylcholinrezeptoren (Pomeranz et al., 1985; Hayano et al., 1991) und durch Vagotomie (Malliani et al., 1991) gezeigt.

Über den Einfluss der autonomen Partner auf die Entstehung des Low Frequency Peaks bestehen unterschiedliche Meinungen. Viele Autoren verstehen die LF vorrangig als sympathische Präsentation (Rimoldi et al., 1990; Malliani et al., 1991; Montano et al., 1994; Pagani et al., 1986). Andere kommen zu dem Schluss, dass neben dem Sympathikus auch der Parasympathikus an der Entstehung der LF Power beteiligt ist und sie daher beide autonome Partner repräsentiert (Akselrod et al., 1981; Appel et al., 1989; Hayano et al., 1991; Houle and Billman, 1999).

Die LF/HF-Ratio wird dem zufolge von einigen Autoren als Parameter interpretiert, der die sympathovagale Balance widerspiegelt (Malliani et al., 1994), andere Autoren halten die LF/HF-Ratio nicht uneingeschränkt für einen geeigneten Parameter zur Messung dieses Verhältnisses (Eckberg, 1997). Die VLF wird durch viele Regelkreise, wie beispielsweise die Thermoregulation und die Plasma-Renin-Aktivität (Akselrod et al., 1981) beeinflusst. Aktuellere Studien beschreiben eine Reduktion der VLF als negativen prognostischen Marker bei Sepsis (Schmidt et al., 2005).

Die Ruhe-HRV bei Menschen wird durch den parasympathischen Einfluss dominiert (Hayano et al., 1991). 1996 wurde die übergeordnete Bedeutung des Parasympathikus in der Regulation der HRV in den HRV-Guidelines betont (Malik et al., 1996). Eine HRV-Reduktion, die als negativer Marker für die Entwicklung vieler Erkrankungen und die Entstehung von Komplikationen zunehmend an diagnostischer Bedeutung gewinnt, kann als Zeichen einer herabgesetzten parasympathischen Aktivität beim Menschen interpretiert werden (Malliani et al., 1994). Der Parasympathikus scheint somit für die Integrität der Körperfunktionen eine entscheidende Bedeutung zu haben. Ein Verlust der Parasympathikusaktivität bedeutet möglicherweise eine Unterbrechung der Interorgankommunikation, die zu einer Entkopplung der Organfunktionen mit ungünstiger Prognose führen kann (Schmidt et al., 2001).

Über die autonome Regulation der Ruheherzfrequenz und der Herzfrequenzvariabilität bei Mäusen existieren viele Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen und Schlussfol-

gerungen. Neben der Untersuchung von Mäusen mit Mutationen im sympathischen und parasympathischen kardialen Signaltransduktionsweg (Uechi et al., 1998; Gehrman et al., 2002; Ecker et al., 2006), gewannen eine Vielzahl von Arbeiten ihre Erkenntnisse durch pharmakologische Experimente an Wildtyp-Mäusen, mit deren Hilfe das autonome Nervensystem moduliert wurde.

Véronique Baudrie schlussfolgerte beispielsweise aus einem relativ stärkeren Anstieg der Herzfrequenz nach Atropin-Gabe im Gegensatz zu der weniger stark ausgeprägten Senkung durch β -Blockade, dass der Parasympathikus bei Wildtyp-Mäusen in Ruhe dominiert (Baudrie et al., 2007). Diese Vermutung sei durch eine im Vergleich zu anderen Arbeiten niedrigere Herzfrequenz der Mäuse gestützt (Tab. 8). Über einen gegenüber dem β -Blocker stärkeren Atropineffekt berichten ebenfalls Ishii und Shusterman (Ishii et al., 1996; Shusterman et al., 2002). Auch eine ausgeglichene Reaktion auf pharmakologische Sympathikus- und Parasympathikus-Blockade wurde beobachtet und auf einen ausgeglichenen autonomen Ruhetonus bei Wildtyp-Mäusen geschlossen (Uechi et al., 1998).

Aus der Mehrzahl der HRV-Untersuchungen an Wildtyp- und transgenen Mäusen leitet sich ein sympathisch dominierter Ruhetonus ab (Ishii et al., 1996; Desai et al., 1997; Gehrman et al., 2000; Janssen et al., 2000; Just et al., 2000; Thireau et al., 2008), der daher in der Literatur als für Mäuse charakteristisch beschrieben wird (Hoyt et al., 2007). Dieser zeige sich in einer Herzfrequenzsenkung bei kombinierter autonomer Blockade. Josef Gehrman schloss auf das Vorherrschen des Sympathikus in der Ruheherzfrequenz, da weder Atropin- noch Isoproterenol-Applikation zu einer Herzfrequenzerhöhung führt, wobei die Mäuse in seiner Arbeit eine vergleichsweise hohe Herzfrequenz von 724 *Schlägen/min* aufwiesen (Gehrman et al., 2000). Bei Arnim Just bewirkte Atropin-Applikation eine moderate Tachykardie und β -Blockade eine starke Bradykardie bei einer Ruheherzfrequenz der Tiere von 662 *Schlägen/min* (Tab. 8, Just et al., 2000).

In der vorliegenden Untersuchung liegt die Ruheherzfrequenz der Wildtyp-Tiere in dem beschriebenen, für Mäuse typischen Bereich (s. Tab. 8, Hoyt et al., 2007). In den Injektionsexperimenten führt β -adrenerge Blockade mittels Propranolol zu einer deutlichen Herzfrequenzsenkung, während Atropin eine ebenfalls deutliche Tachykardisierung bewirkt. Kombinierte autonome Blockade senkt die Herzfrequenz leicht, jedoch nicht signifikant. Dies deutet in Einklang mit Uechi auf einen ausgeglichenen autonomen Einfluss auf die Ruheherzfrequenz bei den hier untersuchten ICR-Wildtyp-Mäusen hin (Uechi et al., 1998).

Die Herzfrequenzvariabilität bei Mäusen wird entsprechend der HRV-Messung beim Menschen und bei großen Säugetieren mit analog definierten Parametern bestimmt (Gehrmann et al., 2000; Thireau et al., 2008). Die Time Domain Parameter meanNN, SDNN und RMSSD werden gleichartig errechnet. Dem pNN50 beim Menschen entspricht der pNN6 bei Mäusen, der durch Atropin-Applikation bei Shusterman und Thireau sowie in der vorliegenden Arbeit nahezu vollständig aufgehoben wird (Shusterman et al., 2002; Thireau et al., 2008).

Das Frequency Domain Spektrum der HRV bei Mäusen wird ungefähr mit dem Zehnfachen des menschlichen Frequenzspektrums angesetzt (Just et al., 2000). Die Zuordnung der verschiedenen Frequenzbereiche zu den konkreten Komponenten des autonomen Nervensystems bei Mäusen ist uneinheitlich, ebenso die Abgrenzung der Bereiche (Baudrie et al., 2007, Stauss, 2007). Die hier gewählte Grenzsetzung orientiert sich an den Empfehlungen von Thireau zur standardisierten, telemetrischen Datengewinnung bei Mäusen (Thireau et al., 2008). In Anlehnung an Vladimir Shusterman und Dwain L. Eckberg wurden die LF und HF in absoluten Einheiten (ms^2) ermittelt (Eckberg, 1997; Shusterman et al., 2002). In Einklang mit Uechi und Shusterman überwiegt in den eigenen Untersuchungen bei Wildtyp-Mäusen in Ruhe die LF Power gegenüber der HF Power; die LF/HF-Ratio liegt bei 3,7.

Atropin-Applikation hat bei Wildtyp-Mäusen den deutlichsten Effekt auf die HRV und führt zu einer signifikanten Reduktion aller Parameter. In der Frequency Domain bewirkt die Substanz eine gleichgerichtete Einschränkung der Power im Low Frequency- und High Frequency-Bereich ohne nennenswerte Beeinflussung der LF/HF-Ratio. Josef Gehrmann beobachtete nach Atropin-Applikation bei Wildtyp-Mäusen einen komplett reduzierenden Effekt auf alle Time Domain Parameter, die LF und HF Power und die LF/HF-Ratio (Gehrmann et al., 2000). Armin Just berichtet über ein Absinken der HRV in allen Frequenzbereichen nach Atropin-Applikation mit abnehmender Intensität $< 1 Hz$ (Just et al., 2000), Véronique Baudrie über eine Einschränkung des gesamten Frequenzspektrums mit dem stärksten Effekt im LF Bereich ($< 2,5 Hz$, Baudrie et al., 2007). Atropin-Applikation führt zu einer Einschränkung der LF und HF Power bei Keiji Ishii und Thireau (Ishii et al., 1996; Thireau et al., 2008).

Aus diesen Beobachtungen kann auf den entscheidenden Einfluss des Parasympathikus in der Entstehung der HRV allgemein und insbesondere im gesamten Frequenzspektrum der Frequenzanalyse geschlossen werden. Über die komplette Reduktion der HRV

durch Atropin berichten in der Literatur viele Studien einstimmig (Ishii et al., 1996; Gehrman et al., 2000; Just et al., 2000; Baudrie et al., 2007; Thireau et al., 2008). Die entscheidende Bedeutung des Parasympathikus in der physiologischen Regulation der HRV bei Mäusen und damit die Ähnlichkeit zu der autonomen Modulation der HRV beim Menschen kann somit als gesichert angesehen werden.

Eine Tachykardisierung per se ist in der Lage, die Total Power der Frequency Domain zu reduzieren, was die gleichzeitige Einschränkung der LF und HF durch Atropin erklären könnte (Pomeranz et al., 1985). Dass in den vorliegenden Experimenten die Tachykardisierung allein die HRV-Einschränkung nicht erklären kann, verdeutlichen die Applikationen von Isoproterenol, welche bei Wildtyp-Mäusen eine ausgeprägten Tachykardisierung ohne signifikante Beeinflussung der absoluten LF und HF Power hervorrufen.

Über den Einfluss des Sympathikus auf die Herzfrequenzvariabilität bei Mäusen bestehen – analog der Diskussion beim Menschen – verschiedene Ansichten. In der vorliegenden Arbeit haben die Propranolol-Applikationen bei den Wildtyp-Mäusen weder einen relevanten Effekt auf die Time Domain Parameter noch auf die LF oder HF. Dies ist vergleichbar mit Berichten am Mensch (Hayano et al., 1991) sowie anderen Studien an der Maus (Ishii et al., 1996; Just et al., 2000; Baudrie et al., 2007). Isoproterenol reduziert, wie auch in humanen Studien beobachtet, die SDNN signifikant. Eine eingeschränkte SDNN könnte demnach auf einen reduzierten parasympathischen Tonus oder auf einen erhöhten Sympathikotonus hinweisen (Malliani et al., 1994).

Bei Mäusen wurde, wie oben beschrieben, eine gleichgerichtete Senkung der Power im LF und im HF Bereich durch Parasympathikus-Blockade berichtet. Die LF/HF-Ratio ist daher in Einklang mit Gehrman, Ecker und Just nicht unbedingt als Marker der sympathovagalen Balance bei Mäusen zu interpretieren. In der vorliegenden Arbeit charakterisiert die LF/HF-Ratio den Einfluss des Sympathikus auf die Frequency Domain der Herzfrequenzanalyse bei Wildtyp-Mäusen adäquat: Sympathikusstimulation reduziert den Parameter, β -Blockade erhöht ihn. Auch diese Beobachtungen können mit bisherigen Studienergebnissen in Einklang gebracht werden. Bei Gehrman kommt es durch Propranolol-Applikation zu einer Anhebung der LF/HF-Ratio (Gehrman et al., 2000). Über eine deutlich reduzierte LF/HF-Ratio berichtet Uechi bei Mäusen mit einer Überexpression des kardialen $G_{s\alpha}$ -Proteins (Uechi et al., 1998), wohingegen Ecker bei insgesamt erhöhter HRV eine reduzierte LF/HF-Ratio bei β_1 -knock-out-Mäusen beobachtet (Ecker et al., 2006). Kombinierte autonome Blockade führt analog der Ergebnisse Janssens, aber

im Gegensatz zu den Ergebnissen Gehrmanns zu keiner Veränderung der HRV, was möglicherweise ein Resultat der tendenziell entgegengerichteten Effekte von Propranolol und Atropin ist.

In der Übersicht zeigt sich zusammengefasst eine starke Variation in den Ergebnissen zum autonomen Ruhetonus und der Beeinflussung der HRV bei Wildtyp-Mäusen sowohl zwischen den verschiedenen Studien als auch zwischen den verschiedenen Mausstämmen. Aufgrund dieser Unterschiede erscheint es sinnvoll, dass in jeder Studie, die die HRV-Analyse bei Mäusen zum Inhalt hat, zunächst der autonome Tonus des zu untersuchenden Mausstamms unter den individuellen experimentellen Bedingungen bestimmt wird. Dies ist umso wichtiger, solange sich ein standardisiertes Verfahren zur HRV-Gewinnung nicht allgemein durchgesetzt hat.

5.3 Die Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität bei Sepsis und MODS

In der ersten klinischen Arbeit, die von einer eingeschränkten Herzfrequenzvariabilität bei Intensivpatienten mit einer Sepsis berichtete, zeigten 17 Patienten mit Sepsis eine signifikante Reduktion der Total Power und der LF in normalized units (nu), die invers mit dem APACHE II und TISS Score korrelierte (Garrard et al., 1993, zu Sepsisscores siehe Cullen et al., 1974 und Knaus et al., 1985).

Christopher S. Garrard beobachtete eine zunehmende HRV-Einengung mit zunehmender Schwere der Erkrankung. Als mögliche Ebenen für die gestörte autonome Kontrolle der HRV wurden das ZNS, die Transmitterebene oder das veränderte Reaktionsvermögen auf Endorganebene angesehen. Piepoli berichtete über ein annäherndes Verschwinden der LF nu bei 12 Patienten im septischen Schock, von denen zwei verstarben. Bei den Überlebenden kam es zu einem Wiederanstieg dieses Wertes (Piepoli et al., 1995).

1999 berichteten Djillali Annane und Konstantin M. Heinroth über eine HRV-Einschränkung inklusive einer Reduktion der LF/HF-Ratio, als häufig genutzter Parameter der sympathovagalen Balance bei Patienten mit septischen Schock (Annane et al., 1999) und Patienten mit Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (Heinroth et al., 1999). Annane zog Rückschlüsse auf die autonome Regulation mit einer ungenügenden sympathischen Aktivierung zu Beginn des septischen Geschehens, während Heinroth die Betonung auf die zunehmende HRV-Einengung mit der Erkrankungsschwere und deren prognostischen Wert bei MODS legte, unabhängig von einer septischen oder nicht-septischen Genese.

Steffen Schaefer stellte in seiner Dissertation ebenfalls eine signifikant verminderte

HRV mit zunehmenden APACHE-Score heraus (Schaefer, 2005). In der Studie Marion Korachs korrelierte eine eingeschränkte LF/HF-Ratio mit der Gesamtmortalität internistischer Intensivpatienten, obwohl die mit diesem Parameter evaluierte sympathovagale Balance individuell sehr unterschiedlich war (Korach et al., 2001). Sie schloss auf die Nutzbarkeit dieses Wertes als diagnostischen Marker bei Sepsis, wenn die Ratio $< 1,0$ sei. Miles S. Ellenby stellte ergänzend bei pädiatrischen Patienten mit einer Sepsis die ungünstige prognostische Bedeutung einer erniedrigten LF/HF-Ratio und einer erniedrigten Total Power fest (Ellenby et al., 2001).

Hendrik Schmidt konnte 2005 eine Einschränkung sämtlicher HRV-Parameter mit Ausnahme der RMSSD bei MODS nachweisen (Schmidt et al., 2005). Er betonte ebenfalls, dass die beobachtete Abschwächung der gesamten autonomen Funktion, die sich in der HRV-Einschränkung niederschlägt, prognostische Bedeutung habe: Als negativer Marker für das Outcome von Patienten mit Herzinsuffizienz bei MODS sei besonders die Reduktion der SDNN geeignet. Die lnVLF konnte von der Arbeitsgruppe als bester Prognosefaktor für die 28-Tage-Mortalität identifiziert werden, wobei in der zitierten Studie die Aussagekraft dieses Parameters der des APACHE II Scores entsprach.

1996 führte Godin experimentelle Endotoxin-Injektionen an gesunden Probanden durch (Godin et al., 1996). Eine Einschränkung der HRV setzte nach ein bis zwei Stunden ein, erreichte ihr Maximum nach vier bis fünf Stunden und hielt für maximal 8 Stunden an. Nach experimenteller Cecal ligation and puncture (CLP) an Ratten stellte sich eine Stunde später eine Tachykardisierung und eine Einschränkung der Total Power, der LF und LF/HF-Ratio ein (Pancoto et al., 2008). Experimentelle Endotoxin-Applikationen führten bei Mäusen zu einer vergleichbaren HRV-Einschränkung bis zu fünf Stunden (Adachi et al., 2006) und ab einer bis neun Stunden (Fairchild et al., 2009). Die Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die zugrundeliegenden Mechanismen der HRV-Einschränkung während einer Sepsis bei Wildtyp-Mäusen, Ratten und Menschen ähnlich sind.

Der verzögert eintretende und langanhaltende HRV-supprimierende Effekt nach LPS-Applikation wird dabei auf zentral und systemisch induzierte, mediatorvermittelte Effekte zurückgeführt. Nach Endotoxinapplikation kann ein Anstieg des Serum-TNF α bereits nach ein bis zwei Stunden bei Mäusen und Ratten beobachtet werden (Redl et al., 1993; Meng et al., 1998). Karin Fairchild konnte bei Mäusen die Serumkonzentration von TNF α und anderen Zytokinen mit einer lang andauernden HRV-Suppression korre-

lieren (Fairchild et al., 2009). Diese langanhaltende Suppression und starke Zytokinausschüttung zeigt Fairchild für eine LPS-Dosierung von 10 mg/kg i.p., der 25-fachen der hier verwendeten Dosis. Die HRV-Einschränkung und die Dauer der Suppression sind in Fairchilds Studie dosisabhängig bis zu einer Konzentration von $0,01 \text{ mg/kg}$ (drei bis sechs Stunden) nachweisbar, wobei die Zytokinausschüttung für diese niedrige LPS-Dosierung nicht untersucht wurde. Eine niedrigere LPS-Dosierung löst jedoch auch eine geringere inflammatorische Reaktion aus (Corral et al., 2005).

Gegenüber den Langzeiteffekten verursacht Endotoxinapplikation in den hier durchgeführten Experimenten an Wildtyp-Mäusen meist eine sofortige, ausgeprägte Tachykardisierung. Diese geht einher mit einer hochgradig eingeschränkten Herzfrequenzvariabilität (signifikante Reduktion der RMSSD, der pNN6 und der LF Power). Diese Ergebnisse ähneln denen aus Zellkulturexperimenten. Mit Endotoxin inkubierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten zeigen eine Reduktion des pNN50 und pNN30 sowie der RMSSD, bei unbeeinflusster SDNN (Schmidt et al., 2007). Es wird die Hypothese gestärkt, dass Endotoxin selbst eine entscheidende Rolle in der Entstehung der HRV-Einschränkung bei Sepsis einnimmt (Zorn-Pauly et al., 2007). Eine direkte Endotoxin-Interaktion mit den Zielzellen könnte im Gegensatz zu den mediatorvermittelten Langzeiteffekten des LPS initial für die ausgeprägte HRV-Einschränkung und mit ihr für die Entkopplung der Interorgan-Kommunikation verantwortlich sein.

Pincus Modell der *approximate entropy*, dessen zufolge die Regularität eines Signals in einem System dessen Isolierung offenbart, wurde in weiteren Studien über das Verhalten gekoppelter Systeme ausgebaut. Paul J. Godin und Timothy G. Buchman stellten aus dieser Entwicklung heraus 1996 die Theorie auf, dass die Entkopplung der Organe bei Sepsis ursächlich für die Entstehung eines MODS sei (Godin and Buchman, 1996). Eine eingeschränkte HRV im Sinne einer kardialen autonomen Dysfunktion kann diese bereits eingetretene Entkopplung der Interorgankommunikation aufzeigen, die in der Konsequenz möglicherweise zu einem MODS führt (Schmidt et al., 2008b; Werdan et al., 2008).

Die negative prognostische Stärke der eingetretenen HRV-Einschränkung in vielen Studien wäre diesem Modell zufolge eine logische Schlussfolgerung: die HRV-Suppression offenbart sich nicht nur als Symptom oder diagnostisches Charakteristikum der septischen Kardiomyopathie, sondern weist auch auf die gestörte Interorgankommunikation als wahrscheinliche Teilursache dieser Krankheitsentität hin. Es handelt sich bei der septischen Kardiomyopathie daher möglicherweise auch um eine *Isolierungserkrankung*, zu der

die spezifische Interaktion von LPS und den kardialen Schrittmacherzellen mit beitragen könnte. Durch die gestörte Kommunikation wäre das Herz nicht in der Lage, sich aus einer sinnvollen sympathisch-parasympathischen Interaktion heraus, den Bedürfnissen des Körpers adäquat anzupassen (Levy, 1971; Hainsworth, 1995). Die Reversibilität funktioneller Störungen bei der Erholung von der Erkrankung (Müller-Werdan et al., 2006a), die mit einer Wiedererlangung der HRV als ein Zeichen einer einsetzenden Integration des Herzens in den Organismus durch eine funktionierende Kommunikation einhergeht, spricht für diese Annahme Godins.

Eine direkte Verminderung der myokardiale Kontraktilität durch Endotoxinapplikation wird berichtet, die intrazellulären Mechanismen, die dies vermitteln, sind verschieden (u. a. Flesch et al., 1999). Die Ursache für die charakteristische HRV-Einengung als Ausdruck der autonomen Dysfunktion im Rahmen eines MODS ist somit möglicherweise auch in der direkten Interaktion von Endotoxin mit den Schrittmacherzellen des Herzens mitbegründet.

5.4 Die Rolle von Endotoxin in der gestörten Interorgankommunikation

1980 wurde über die gramnegative Sepsis als Hauptursache für das Multiple-System-Organ-Failure (MSOF) mit konsekutiver hoher Sterblichkeit bei chirurgischen Patienten auf der Intensivstation berichtet (Fry et al., 1980). Die Krankenhaussterblichkeit der schweren Sepsis und des septischen Schocks betrug einer 2007 publizierten, multizentrischen Studie des Kompetenznetzwerks Sepsis (SepNet) zufolge im Jahr 2003 55 %, die Prävalenz in der Stichprobe der Intensivstationen lag bei 11 % (Engel et al., 2007). Die Inzidenz der Sepsis läge bei ca. 79 000 Einwohnern, die der schweren Sepsis und des septischen Schocks bei 75 000 Einwohnern pro Jahr (116 bzw. 110 pro 100 000, Reinhardt et al., 2006; Engel et al., 2007). Septische Erkrankungen stellen demnach die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar, wobei jedoch nur in circa einem Drittel der Fälle ein Erreger nachgewiesen werden kann (Reinhart et al., 2010).

Während Christoph Engel zufolge gramnegative Infektionen genauso häufig auftreten wie grampositive (Engel et al., 2007), machen sie in anderen Studien den Hauptanteil der Infektionen aus und gehen dabei deutlich gehäuft mit schweren Verläufen der Sepsis, wie dem septischen Schock einher (Alberti et al., 2002). Bereits früher wurde ein deutlich ungünstigerer klinischer Verlauf eines septischen Schocks beobachtet, wenn der initiale Fokus der Gastrointestinaltrakt darstellte (Nishijima et al., 1973). Aktuell nimmt der

Anteil gramnegativer Bakteriämien auf den Intensivstationen zu, wobei vor allem das multiresistente Keimspektrum an Bedeutung gewinnt (Arndt et al., 2011). Ihr Stellenwert bei der Entwicklung eines MODS und der damit assoziierten Mortalität ist als sehr hoch einzuschätzen (Alberti et al., 2002).

1986 verwies Charles Natanson in einer Studie auf den direkt kardiodepressiven Effekt, den eine Endotoxinapplikation auslöst (Natanson et al., 1986). Er ergänzte 1989 durch Experimente an Hunden, dass eine vergleichbare Myokarddepression ebenfalls durch grampositive Keime ausgelöst werden kann (Natanson et al., 1989). Diese Beobachtung bestätigte sich in klinischen Studien (Pilz et al., 1994). Natanson stellte die Hypothese in den Vordergrund, dass der Myokarddepression bei einem durch Infektion ausgelösten MODS ein allgemeingültiger, durch die Infektion ausgelöster Mechanismus zugrunde liege. Das Auftreten einer der septischen Kardiomyopathie ähnelnden Herzfunktionseinschränkung bei SIRS unterstützt diese Annahme (Smail et al., 1996; Müller-Werdan et al., 2006b). Die Rolle reaktiv ausgeschütteter Zytokine, insbesondere des $\text{TNF}\alpha$ und des IL-1, konnten in der Folge nachgewiesen und mit einer Myokarddepression in Verbindung gebracht werden (Hesse et al., 1988; Kumar et al., 1996; Meng et al., 1998; Cain et al., 1999).

Neben diesen Faktoren ist es auch wahrscheinlich, dass Endotoxin selbst zur Entstehung eines MODS und zu der Isolierung des Herzens im Organismus beiträgt. Die experimentelle Applikation von LPS an freiwilligen Probanden verursacht eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion, die der Kardiomyopathie bei Patienten mit Sepsis stark ähnelt (Suffredini et al., 1989). Robert L. Danner zeigte 1991, dass ein MODS 10 mal häufiger und eine linksventrikuläre Dysfunktion 5 mal häufiger bei Patienten mit gramnegativer Endotoxinämie ausgelöst wurde, als bei Patienten mit septischen Schock ohne Endotoxinämie. Eine Endotoxinämie ging zudem mit einer erhöhten Mortalität einher (Danner et al., 1991).

Verschiedene Studien konnten im Weiteren (neben den bereits genannten indirekten kardiodepressiven Mechanismen) auch eine direkte Interaktion von Endotoxin und dem Arbeitsmyokard als eine mögliche Ursache der septischen Kardiomyopathie aufzeigen. LPS führte unter anderem zu einer Veränderung der Kardiomyozytenreagibilität auf autonome Einflüsse. Hierbei konnte sowohl eine erhöhte Sensibilisierung auf positiv inotrope Einflüsse durch β -adrenerge Stimulation (Rubin et al., 1994) als auch eine Abschwächung beobachtet werden (Silverman et al., 1993). Ursula Müller-Werdan zeigte 1998 beispiels-

weise eine fehlende Steigerung der Kontraktionskraft auf Isoproterenol-Stimulation bei Endotoxin-inkubierten Ratten-Kardiomyozyten, während die Reaktion auf α -adrenerge Stimulation unbeeinflusst ist (Müller-Werdan et al., 1998). Auch über eine Verstärkung der inhibitorischen Effekte von Acetylcholin mit einer Reduktion der Kontraktilität wurde berichtet (Sulakhe et al., 1996). Endotoxin ist in der Lage, über verschiedene Mechanismen eine direkte Verkürzung des Aktionspotentials an Kardiomyocyten hervorzurufen, die die Antwort auf autonome Einflüsse modulieren könnten (diskutiert bei Zorn-Pauly et al., 2007). Najah Abi-Gerges zeigte 1999 an isolierten Rattenkardiomyozyten einen durch Endotoxin gesteigerten stimulierenden Effekt von Isoproterenol auf I_{Ca} für 12 Stunden, der durch Stimulation der Adenylatzyklase nachgeahmt werden konnte. Der antiadrenerge Effekt von Acetylcholin auf I_{Ca} war erst nach 26 Stunden deutlich gesteigert (Abi-Gerges et al., 1999). Er äußerte die Hypothese, dass eine zeitabhängige Veränderung des Adenylatzyklase-Pathways in den Kardiomyozyten über die autonome Kontrolle von I_{Ca} zur myokardialen Dysfunktion bei Sepsis führen könnte.

Vor dem Hintergrund der hohen Katecholamin-Konzentrationen im Serum bei Sepsis (Müller-Werdan et al., 1996; Annane et al., 1999) und dem therapeutischen Einsatz von Katecholaminen mit dem gleichzeitig bekannten Phänomen der verminderten Responsivität der Zielorgane könnte der Sensibilisierung der Kardiomyozyten für sympathische Einflüsse durch Endotoxin möglicherweise eine besondere Bedeutung zukommen. Diese Potenzierung sympathischer Einflüsse findet wahrscheinlich ebenfalls an den Schrittmacherzellen des Herzens statt, was durch elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Vorhofkardiomyozyten untermauert wird (Zorn-Pauly et al., 2007).

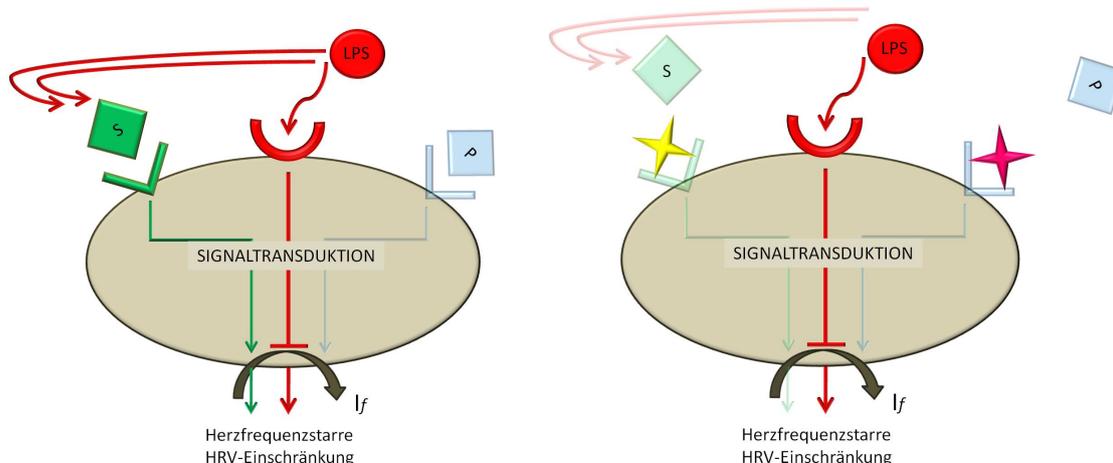
Der direkte Einfluss von Endotoxin auf die Schrittmacherzellen des Herzens *in vivo* wurde bisher noch nicht untersucht. Da experimentelle Endotoxin-Applikationen wiederholt zu einer ausgeprägten Tachy- oder Bradykardisierung mit hochgradig eingeschränkter HRV führten, was ein wesentliches prognoserelevantes Charakteristikum der septischen Kardiomyopathie darstellt, ist die Frage nach einer direkten Interaktion von besonderem Interesse. Dem Schrittmacher-Kanal als taktgebende Zielstruktur des Herzens, der sympathisch und parasympathisch moduliert wird (Baruscotti et al., 2005; Barbuti and DiFrancesco, 2008), kommt dabei als möglicher Ort der Beeinträchtigung autonomer Einflüsse am Herzen während einer Sepsis und einem MODS eine besondere Bedeutung zu. Auf die Möglichkeit der direkten Interaktion von LPS und dem Schrittmacherstrom I_f verwies Schmidt 2007, in dessen Untersuchungen es nach experimenteller

LPS-Applikation zu einer Verminderung der HRV an isolierten, spontan kontrahierenden Rattenkardiomyocyten kam (Schmidt et al., 2007). Die Interaktionsmechanismen von LPS mit dem I_f -Strom, die Klaus Zorn-Pauly in Zellkulturexperimenten an humanen Vorhofkardiomyozyten 2007 nachwies, stellen möglicherweise einen entscheidenden Mechanismus in der Entstehung der HRV-Einschränkung bei Sepsis dar (Zorn-Pauly et al., 2007; Werdan et al., 2008; Ebel and Werdan, 2010).

Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen konnten zwei spezifische Effekte des LPS auf die hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN-Kanäle) als Träger des I_f aufgezeigt werden (Abb. 21). Zum einen führt LPS-Applikation in Anwesenheit der sympathomimetischen Substanz Isoproterenol zu einer Potenzierung des sympathischen Einflusses an den Zellen (Abb. 21a). Dieser für den Sympathikus sensibilisierende Effekt könnte für die bereits oben beschriebene Tachykardisierung nach LPS-Applikation bei den hier untersuchten Mäusen verantwortlich sein. Alleinige Isoproterenolapplikation reduziert die HRV-Parameter zwar deutlich, jedoch nicht signifikant. Die HRV-supprimierende Wirkung des Endotoxins könnte somit als eine Bahnung des sympathischen Einflusses interpretiert werden.

Der genaue Mechanismus dieser Beeinflussung des I_f -Stroms ist derzeit unklar. Eine Rolle könnte die in Kardiomyocyten beschriebene Beeinflussung der second-messenger-Kaskaden durch Endotoxin spielen. Eine direkte Interaktion von Endotoxin mit dem human hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 (hHCN2) in-vitro konnte bereits ebenfalls nachgewiesen werden (Klößner et al., 2014).

Für den direkten Einfluss des Endotoxins auf den Schrittmacherkanal spricht die Geschwindigkeit, mit der der Effekt nachweisbar ist. Die HRV-Einschränkung nach LPS-Applikation tritt in der vorliegenden Arbeit bereits nach 20–40 Minuten ein. Auch wird über die Schnelligkeit anderer durch LPS-Applikation hervorgerufener Kreislaufeffekte berichtet (Savci and Ulus, 1997). Gestützt wird die Vermutung einer ursächlich direkten Interaktion von LPS und I_f weiterhin durch die Beobachtungen Javier Corral, der bei Verwendung einer identischen subletalen LPS-Dosierung wie in der vorliegenden Arbeit kaum eine inflammatorische Reaktion bei seinen untersuchten Mäusen feststellen konnte (Corral et al., 2005). Xianzhong Meng beobachtete einen Anstieg des Serum-TNF α bei Ratten nach LPS-Applikation in einer Dosierung von 0,5 mg/kg frühestens nach 1 bis 2 Stunden (Meng et al., 1998), Heinz Redl bei Mäusen nach frühestens einer Stunde (Redl et al., 1993).



(a) Alleinige LPS-Applikation erhöht die Ansprechbarkeit des I_f -Stroms auf sympathische Reize. Dies resultiert in einer ausgeprägten Tachykardisierung. Die Herzfrequenzvariabilität (HRV) ist hochgradig eingeschränkt.

(b) Unter autonomer Blockade mit Propranolol und Atropin (=Sterne) kann die Beeinflussung des Sympathikus durch Endotoxin ausgeblendet werden. Es stellt sich eine ausgeprägte Bradykardisierung ein, welche das Ergebnis des in Zellkulturexperimenten nachgewiesenen direkt hemmenden Effekts auf I_f sein könnte. Die HRV ist weniger stark eingeschränkt.

Abb. 21: Mögliche Beeinflussung des Schrittmacherstroms I_f durch Endotoxin nach Zorn-Pauly et al., 2007. LPS=Lipopolysaccharid (Endotoxin), P=Parasympathikus, S=Sympathikus, I_f =Schrittmacherstrom, HRV=Herzfrequenzvariabilität, Sterne=Propranolol und Atropin.

Die Tachykardisierung und HRV-Einschränkung sind in der vorliegenden Arbeit ca. 20 Minuten nach LPS-Applikation nachweisbar, was eine indirekte, z. B. zytokinvermittelte Ursache weniger wahrscheinlich macht. Ergänzend zeigt sich bei der klinisch beobachteten Einschränkung der kardialen Pumpfunktion im Rahmen eines Traumas (SIRS) in einigen Studien keine Beeinflussung der Herzfrequenz (Smaïl et al., 1996). Die die Tachykardisierung begleitende HRV-Einschränkung könnte additiv zur Sympathikusbahnung das Resultat der direkten LPS- I_f -Interaktion sein und ginge mit der von Zorn-Pauly berichteten verringerten Reagibilität des I_f -Kanals auf autonome, oder zumindest vagale Reize unter LPS-Einfluss einher.

Einen zweiten Effekt an den untersuchten Zellen zeigte Zorn-Pauly in seinen Zellkulturexperimenten: eine direkte, spezifische Hemmung des Schrittmacherstroms, die per se zu einer Bradykardisierung führen sollte (Abb. 21b). Diese Situation wurde in der vorliegenden Arbeit in vivo durch die LPS-Applikation in Abwesenheit autonomer Einflüsse simuliert, hervorgerufen durch kombinierte autonome Blockade. Die Wildtyp-Mäuse zeigen in dieser Situation nach LPS-Gabe tatsächlich eine ausgeprägte Bradykardisierung,

die sich signifikant von der Herzfrequenzänderung nach alleiniger autonomer Blockade unterscheidet, und eine weniger stark ausgeprägte HRV-Einschränkung. Die vorliegende in vivo-Arbeit bestätigt damit in funktioneller Hinsicht den im Zellkultorexperiment gezeigten hemmenden Effekt von LPS auf die kardialen Schrittmacherzellen.

Am Modell der Wildtyp-Maus können in der vorliegenden Arbeit beide von Zorn-Pauly aufgezeigten LPS-Effekte funktionell bestätigt werden. Die Arbeit trägt damit zur Erklärung der Genese einer prognoserelevanten HRV-Einschränkung mit gleichzeitig bestehender Tachykardie im Rahmen einer Sepsis bei.

Auf dem Konzept Godins beruhend, demzufolge das MODS als Resultat einer gestörten Organkommunikation zu verstehen ist, rückte in den letzten Jahren die Bedeutung einer Beeinträchtigung des *cholinergic antiinflammatory pathways* als Ursache für diese gestörte Organkommunikation in den Blickpunkt (Schmidt et al., 2008b). Hinweise auf die Aktivierung des Parasympathikus sowie auf die antiinflammatorische Potenz des intakten Parasympathikus während einer Infektion lieferten verschiedene Studien (Borovikova et al., 2000; Hansen et al., 2001; Saeed et al., 2005; Bauhofer and Torossian, 2007; Huston et al., 2007; Tracey, 2007; Bruchfeld et al., 2010). Schmidt schlussfolgerte 2005 aus einer reduzierten Baroreflexaktivität und der HRV-Einschränkung bei intensivmedizinischen Patienten mit Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom auf eine reduzierte vagale Aktivität bei MODS (Schmidt et al., 2005) als ein Zeichen der Abschwächung dieses *cholinergic antiinflammatory pathways*. Warum es im Rahmen eines infektiösen Geschehens zu einer Störung dieser postulierten protektiven Rückkopplungsschleife kommen kann und wo genau diese Störung lokalisiert ist, die in der Konsequenz zu der Entstehung eines MODS und der septischen Kardiomyopathie beitragen könnte, ist bisher unklar (Schmidt et al., 2008b).

Die beiden in dieser Arbeit funktionell bestätigten Effekte des Endotoxins, Sympathikusbahnung und direkte Hemmung an den kardialen Schrittmacherzellen in vivo sind womöglich eine Ursache für die inadäquate Reaktion des Herzens auf vagale Einflüsse: als reduziert zeigten sich nach LPS-Applikation bei Wildtyp-Mäusen die typischerweise den Parasympathikus präsentierenden Parameter RMSSD und pNN6 sowie die LF-Power (die bei den Mäusen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls vom Parasympathikus reguliert wird). Die Reaktion ähnelt am ehesten der Atropinapplikation. Der sympathikusbahnende Effekt (Tachykardie und möglicherweise auch intensivere Suppression der HRV) mag die autonome Reagibilität in der septischen Kardiomyopathie ebenfalls vermindern.

Vor dem Hintergrund der zugrunde liegenden Zellkulturexperimente, deren Komponenten der LPS-Interaktion hier einzeln *in vivo* nachvollzogen werden konnten, scheint die Endotoxin-induzierte HRV-Einschränkung durch ein Zusammenwirken beider Interaktionsmechanismen am HCN-Kanal zu entstehen. Die Arbeit stellt deren möglichen zentralen Stellenwert bei der Entwicklung der autonomen Dysfunktion des Herzens im Rahmen eines MODS zur Diskussion.

5.5 Studienlimitierung und Forschungsexposé

Mit den Leitlinien zur standardisierten HRV-Messung beim Menschen entwickelte die *Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology* 1994 eine einheitliche Nomenklatur und reproduzierbare Methoden der HRV-Erfassung, die eine Vergleichbarkeit und diagnostische Nutzbarkeit der HRV-Daten aus klinischen und experimentellen Situationen ermöglichte und beförderte (Malik et al., 1996). Obwohl die HRV-Messung auch in tierexperimentellen Studien für unterschiedlichste Fragestellungen genutzt wird, haben sich standardisierte Versuchs- und Messprotokolle bisher nicht durchgesetzt. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den verschiedenen Studien ist daher nur begrenzt möglich und zeigt sich beispielsweise in den unterschiedlichen Daten zur autonomen Regulation der Herzfrequenz bei Mäusen.

Die vorliegende Dissertation folgte den vorgeschlagenen Richtlinien von Thireau et al. zur HRV-Messung bei Mäusen (Thireau et al., 2008), um die Idee einer standardisierten Datengewinnung bei Versuchstieren zu unterstützen und eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen. Die Bestimmung der Time Domain und der Frequency Domain Parameter mittels Fast Fourier Transformation (FFT) nach dem dort vorgeschlagenen Algorithmus erbringt unter den gleichen technischen Voraussetzungen valide Ergebnisse, die eine Einschätzung der postoperativen Stabilisierung, der pharmakologischen Effekte und insbesondere der Effekte des Endotoxins zulassen. Die eigenen Ergebnisse zur autonomen Regulation der Herzfrequenz reihen sich in frühere Arbeiten zur HRV bei Mäusen ein, wobei nur ein Teil der Studien zu ähnlichen Ergebnissen und Schlussfolgerungen gekommen war wie die vorliegende Arbeit. Vor dem Hintergrund, dass es aufgrund der hohen Herzfrequenz bei Mäusen schwierig ist, ausreichend lange Intervalle mit einer ausreichenden Signalstabilität zu sammeln, die für die Durchführung der FFT notwendig sind (Cerutti et al., 1995), stellen die von Thireau et al. vorgeschlagenen 3 Minuten in absoluter Ruhe zur Erfassung der FD einen guten Kompromiss zwischen Datenausbeute

und Auswertungsaufwand dar (Thireau et al., 2008). Die ähnliche Reaktion der Mäuse auf die autonome Modulation und auf die LPS-Applikation zu einer Vielzahl muriner und humaner Studien bestätigte die Nutzbarkeit der Methodik zur Evaluierung pharmakologischer und toxikologischer Fragestellungen und erlaubt Rückschlüsse auf humane Funktionsmechanismen.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden keine zusätzlichen Kreislauf- oder Laborparameter zur Beurteilung der Schwere des durch Endotoxin-Applikation hervorgerufenen Krankheitsbildes bei den Mäusen herangezogen. Es lässt sich daher nicht von der verwendeten subletalen Endotoxindosis auf eine Ähnlichkeit der Kreislaufreaktion zu der klinisch beobachteten Sepsis mit MODS schließen. Vor dem Hintergrund, dass Endotoxin-Injektionen an Tieren ähnliche Effekte auslösen, wie das septische Geschehen bei Patienten auf der Intensivstation (beispielsweise Savci and Ulus, 1997), fokussierte sich die vorliegende Arbeit auf den in-vivo-Nachweis der in Zellkulturexperimenten nachgewiesenen Interaktion von LPS mit den kardialen Schrittmacherzellen. Als Marker der septischen Kardiomyopathie weist die hochgradige HRV-Einschränkung der ICR-Wildtyp-Mäuse durch die intraperitoneale Endotoxin-Applikation große Ähnlichkeit zu anderen experimentellen und klinischen Beobachtungen bei Patienten mit Sepsis und MODS auf. Um den Effekt der Interaktion von LPS und dem HCN-Kanal näher zu charakterisieren, wurde zwischenzeitlich bereits mit der Fortsetzung der Experimente an HCN4-Knock-out-Mäusen begonnen. Desweiteren könnte in diesem Rahmen untersucht werden, ob pharmakologische Hemmer des I_f (z. B. Ivabradin) den Einfluss von LPS auf die HRV beeinflussen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Vor dem Hintergrund der prognoserelevanten autonomen kardialen Dysfunktion bei Patienten mit einem Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (MODS) wird in der vorliegenden Dissertation der Fragestellung des direkten Einflusses von Endotoxin auf die Schrittmacherzellen des Herzens nachgegangen und dessen Auswirkung auf die Herzfrequenzvariabilität (HRV) bei ICR-Wildtyp-Mäusen untersucht. Mittels telemetrischer Aufzeichnungsverfahren können die Bewegungsaktivität und die Herzfrequenz der Tiere in vivo unter Normalbedingungen erfasst werden. Die HRV wird nach international etablierten Methoden und Parametern ermittelt, hierbei wird ein Auswertungsalgorithmus zur standardisierten HRV-Gewinnung bei Mäusen von 2008 angewendet (Thireau et al., 2008). Auf diese Weise ist es möglich, die Stabilisierung nach der Transmitterimplantation und das autonome Nervensystem der untersuchten Tiere zu charakterisieren sowie den Einfluss von Endotoxin auf die Herzfrequenz und die HRV zu beurteilen.

Eine zirkadiane Schwankung der Herzfrequenz setzt frühzeitig bis spätestens zum 5. Tag nach operativer Transmitterimplantation ein, während die HRV-Stabilisierung bis zum 10. postoperativen Tag andauert. Die Ergebnisse zur Erholung und Stabilisierung der HRV-Parameter nach der Transmitterimplantation bestätigen die Befunde einer Reihe von Arbeitsgruppen, wobei die Ergebnisse die Notwendigkeit eines längeren postoperativen Erholungszeitraums verdeutlichen.

Die Experimente zeigen einen ausgeglichenen autonomen Einfluss zwischen Sympathikus und Parasympathikus bei der Regulation der Ruheherzfrequenz bei Wildtyp-Mäusen. Die Reduktion sämtlicher HRV-Parameter inklusive der Low und High Frequency Power durch Atropin bei nur geringem Effekt der Propranolol-Applikationen deutet auf die vornehmliche Bedeutung des Parasympathikus in der Entstehung der HRV hin. Der Einfluss des Sympathikus zeigt sich in der LF/HF-Ratio, wobei sympathomimetische Stimulation die Ratio senkt, β -Blockierung die Ratio anhebt.

Endotoxin führt unmittelbar (d. h. innerhalb von 20 Minuten) nach Injektion bei Wildtyp-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz. Unter autonomer Blockade bewirkt es dagegen eine ausgeprägte Bradykardisierung. Die HRV ist nach Endotoxin-Applikation unmittelbar hochgradig eingeschränkt. Unter autonomer Blockade ist diese LPS-induzierte HRV-Einschränkung weniger ausgeprägt.

Die Applikation von LPS verursacht Veränderungen der Herzfrequenz und der HRV,

wie sie in klinischen Studien sowie bei Mensch und Tier in experimenteller Situation im Rahmen einer Sepsis, eines MODS oder einer künstlich hervorgerufenen Endotoxinämie bereits zuvor beobachtet wurden. Als ein möglicher Mechanismus dieser charakteristischen Herzfrequenzveränderung und HRV-Einschränkung bei Patienten mit MODS kommt die direkte Interaktion von Endotoxin mit den Schrittmachzellen, insbesondere dem Schrittmacherstrom I_f in Betracht. Die in Zellkulturexperimenten beschriebene direkte Hemmung des I_f -Schrittmacherstroms und dessen Sympathikus-Sensibilisierung durch Endotoxin können in den hier vorgestellten *in vivo*-Experimenten an Wildtyp-Mäusen funktionell bestätigt werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

LITERATUR

- Abi-Gerges N, Tavernier B, Mebazaa A, Faivre V, Paqueron X, Payen D, Fischmeister R, Méry PF (1999) Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1196–1204.
- Adachi Y, Nakajima Y, Satomoto M, Morita K, Doi M, Sato S (2006) The heart rate variability in mice: telemetric evaluation of endotoxin shock. *Masui* 55:436–440.
- Akselrod S: Components of Heart Rate Variability: Basic Studies. In: Malik M, Camm AJ (eds): *Heart Rate Variability*. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 147–163.
- Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Barger AC, Cohen RJ (1981) Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat to beat cardiovascular control. *Science* 213:220–222.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall JR (2002) Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 28:108–121.
- Annane D, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, Gajdos P (1999) Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. *Am J Respir Crit Care Med* 160:458–465.
- Appel ML, Berger RD, Saul JP, Smith JM, Cohen RJ (1989) Beat to beat variability in cardiovascular variabilities: noise or music? *J Am Col Cardiol* 14:1139–1148.
- Arndt S, Lauf H, Weiss G, Lodes U, Mroczkowski P, Schulz HU, Lippert H, König W, Meyer F (2011) Erreger- und Resistenzspektrum einer chirurgischen ITS im systematischen 10-Jahres-Vergleich 1996–2005 im Rahmen des mikrobiologischen Routinemonitorings. *Zentralbl Chir* 136:152–158.
- Arras M, Rettich A, Paolo C, Kasermann HP, Burki K (2007) Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Vet Res* 3:16.
- Aysin B, Aysin E (2006) Effect of respiration in heart rate variability (HRV) analysis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1:776–779.
- Barbuti A, DiFrancesco D (2008) Control of cardiac rate by “funny” channels in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1123:213–223.
- Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D (2005) Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol Ther* 107:59–79.
- Baudrie V, Laude D, Elghozi JL (2007) Optimal frequency ranges for extracting information on cardiovascular autonomic control from the blood pressure and pulse interval spectrograms in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R904–R912.

- Baue AE (1992) The horror autotoxicus and multiple-organ failure. *Arch Surg* 127:1451–1462.
- Bauhofer A, Torossian A (2007) Mechanical vagus nerve stimulation—a new adjunct in sepsis prophylaxis and treatment? *Crit Care Med* 35:2868–2869.
- Baumans V, Bouwknecht JA, Boere H, Kramer K, Van Lith HA, Van de Weerd HA, Van Herck H (2001) Intra-abdominal transmitter implantation in mice: effects on behaviour and body weight. *Anim Wel* 10:291–302.
- Berntson G, Bigger JT, Eckberg DL, Grossman P, Kaufmann PG, Malik M, Nagaraja HN, Porges SW, Saul JP, Stone PH, van der Molen MW (1997) Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiology* 34:623–648.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405:458–462.
- Bruchfeld A, Goldstein RS, Chavan S, Patel NB, Rosas-Ballina M, Kohn N, Qureshi AR, Tracey KJ (2010) Whole blood cytokine attenuation by cholinergic agonists ex vivo and relationship to vagus nerve activity in rheumatoid arthritis. *J Intern Med* 268:94–101.
- Cain BS, Meldrum DR, A DC, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken AH (1999) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 27:1309–1318.
- Campen MJ, Tagaito Y, Jenkins TP, Balbir A, O'Donnell CP (2005) Heart rate variability responses to hypoxic and hypercapnic exposures in different mouse strains. *J Appl Physiol* 99:807–813.
- Casolo G: Heart Rate Variability in Patients with Heart Failure. In: Malik M, Camm AJ (eds): *Heart Rate Variability*. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 449–466.
- Cerutti S, Bianchi AM, Mainardi LT: Spectral Analysis of the Heart Rate Variability Signal. In: Malik M, Camm AJ (eds): *Heart Rate Variability*. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 63–74.
- Chess GF, Tam RMK, Calaresu FR (1975) Influence of cardiac neural inputs on rhythmic variations of heart period in the cat. *Am J Physiol* 228:775–780.
- Clark IA (2007) The advent of the cytokine storm. *Immunol Cell Biol* 85:271–273.
- Clement JG, Mills P, Brockway B (1989) Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. *J Pharmacol Methods* 21:129–140.
- Corral J, Yélamos J, Hernández-Espinosa D, Monreal Y, Mota R, Arcas I, Miñano A, Parrilla P, Vicente V (2005) Role of lipopolysaccharide and cecal ligation and puncture on blood coagulation and inflammation in sensitive and resistant mice models. *Am J Pathol* 166:1089–1098.

- Cullen DJ, Civetta JM, Briggs BA, Ferrara LC (1974) Therapeutic intervention scoring system: a method for quantitative comparison of patient care. *Crit Care Med* 2:57–61.
- Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P (1989) Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 17:975–978.
- Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE (1991) Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 99:169–175.
- Data Science International (2008) ETA, CTA, EA or CA Device Surgical Manual. 4211 Lexington Avenue North Suite 2244. St.Paul, MN 55126-6164 U.S.A.
- Data Science International (2009) DSI Data Exchange Matrix. URL <http://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/telemetry-hardware/data-exchange-matrix>, eingesehen am 24.09.2009.
- Data Science International (2010) DSI System Brochure. URL <http://www.datasci.com/pdf/products/DSISystemBrochure.pdf>, eingesehen am 15.10.2010.
- Desai KH, Sato R, Schauble E, Barsh GS, Kobilka BK, Bernstein D (1997) Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. *Am J Physiol* 272:H1053–1061.
- Dimas S (2007) Empfehlung der Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG). Amtsblatt der Europäischen Union vom 30.07.2007.
- Ebelt H, Werdan K (2010) Sepsis und Herz. *Internist* 51:844–849.
- Eckberg DL (1997) Sympathovagal balance: a critical appraisal. *Circulation* 96:3224–3232.
- Ecker PM, Lin CC, Powers J, Kobilka BK, Dubin AM, Bernstein D (2006) Effect of targeted deletions of β 1- and β 2-adrenergic-receptor subtypes on heart rate variability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H192–H199.
- Ellenby MS, McNames J, Lai S, McDonald BA, Krieger D, Scلابassi RJ, Goldstein B (2001) Uncoupling and recoupling of autonomic regulation of the heart beat in pediatric septic shock. *Shock* 16:274–277.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007) Epidemiology of sepsis in germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33:606–618.
- Fairchild KD, Saucerman JJ, Raynor LL, Sivak JA, Xiao Y, Lake DE, Moorman JR (2009) Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R1019–R1027.

- Fallen EL, Kamath MV: Circadian Rhythms of Heart Rate Variability. In: Malik M, Camm AJ (eds): Heart Rate Variability. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 293–310.
- Flesch M, Kilter H, Cremers B, Laufs U, Südkamp M, Ortmann M, Müller FU, Böhm M (1999) Effects of endotoxin on human myocardial contractility— involvement of nitrite oxid and peroxynitrite. *J Am Col Cardiol* 33:1062–1070.
- Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Sarma JV, Ward PA (2008) Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med* 14:327–336.
- Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HCJ (1980) Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. *Arch Surg* 115:136–140.
- Furlan R, Guzzetti S, Crivellaro W, Dassi S, Tinelli M, Baselli G, Cerutti S, Lombardi F, Pagani M, Malliani A (1990) Continuous 24-hour assessment of the neural regulation of systemic arterial pressure and RR variabilities in ambulant subjects. *Circulation* 81:537–547.
- Garrard CS, Kontoyannis DA, Piepoli M (1993) Spectral analysis of heart rate variability in the sepsis syndrome. *Clin Auton Res* 3:5–13.
- Gehrmann J, Hammer PE, Maguire CT, Wakimoto H, Triedman JK, Berul CI (2000) Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:733–740.
- Gehrmann J, Meister M, Maguire CT, Martins DC, Hammer PE, Neer EJ, Berul CI, Mende U (2002) Impaired parasympathetic heart rate control in mice with a reduction of functional G protein $\beta\gamma$ -subunits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H445–H456.
- Godin PJ, Buchman TG (1996) Uncoupling of biological oscillators: a complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 24:1107–1116.
- Godin PJ, Fleisher LA, Eidsath A, Vandivier RW, Preas HL, Banks SM, Buchman TG, Suffredini AF (1996) Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: results from a prospective, randomized, crossover trial. *Crit Care Med* 24:1117–1124.
- Goldbarg AN, Hellerstein HK, Bruell JH, Daroczy AF (1968) Electrocardiogram of the normal mouse, *mus musculus*: general considerations and genetic aspects. *Cardiovasc Res* 2:93–99.
- Goldberger AL, West BJ (1987a) Applications of nonlinear dynamics to clinical cardiology. *Ann N Y Acad Sci* 504:195–213.
- Goldberger AL, West BJ: Chaos in Physiology: Health or Disease? In: Degn H, Holden AV, Olsen LF (eds): Chaos in Biological Systems. Plenum Press, New York, 1987b, pp 1–4.
- Goldberger AL, Findley LJ, Blackburn MR, Mandell AJ (1984) Nonlinear dynamics in heart failure: implications of long-wavelength cardiopulmonary oscillations. *Am Heart J* 107:612–615.

- Goldstein B, Kempinski MH, Stair D, Tipton RB, DeKing D, DeLong DJ, DeAsla R, Cox C, Lund N, Woolf PD (1995) Autonomic modulation of heart rate variability during endotoxin shock in rabbits. *Crit Care Med* 23:1694–1702.
- GV-SOLAS (2008) Empfehlung der GV-SOLAS zur Substanzapplikation bei Versuchstieren. URL <http://www.bv-solas.de/auss/tie/index.html>, eingesehen am 01.07.2008.
- Hainsworth R: The Control and Physiological Importance of Heart Rate. In: Malik M, Camm AJ (eds): *Heart Rate Variability*. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 3–19.
- Hansen MK, O'Connor KA, Goehler LE, Watkins LR, Maier SF (2001) The contribution of the vagus nerve in interleukin-1 β -induced fever is dependent on dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R929–934.
- Hawkins P (2002) Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Lab Anim* 36:378–395.
- Hayano J, Sakakibara Y, Yamada A, Yamada M, Mukai S, Fujinami T, Yokoyama K, Watanabe Y, Takata K (1991) Accuracy of assessment of cardiac vagal tone by heart rate variability in normal subjects. *Am J Cardiol* 67:199–204.
- Heinroth KM, Kuhn C, Stache N, Witthaut R, Müller-Werdan U, Werdan K, Prondzinsky R (1999) Eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität bei Patienten mit septischem und nicht-septischem Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom. *Intensivmed* 36:436–445.
- Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MAJ (1988) Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *SGO* 166:147–153.
- Hinshaw LB (1974) Role of the heart in the pathogenesis of endotoxin shock. *J Surg Research* 17:134–145.
- Hottenrott K, Hoos O, Esperer HD (2006) Herzfrequenzvariabilität und Sport. *Herz* 31:544–552.
- Houle MS, Billman GE (1999) Low-frequency component of the heart rate variability spectrum: a poor marker of sympathetic activity. *Am J Physiol* 276:H215–H223.
- Hoyt RFJ, Hawkins JV, St Claire MB, Kennet MB: *Mouse Physiology*. In: Fox G (ed): *The Mouse in Biomedical Research*. Elsevier Amsterdam, Boston, Heidelberg and others, 2007, pp 23–90.
- Huston JM, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yuan R, Rosas-Ballina M, Ashok M, Goldstein RS, Chavan S, Pavlov VA, Metz CN, Yang H, Czura CJ, Wang H, Tracey KJ (2007) Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis. *Crit Care Med* 35:2762–2768.
- Ishii K, Kuwahara M, Tsubone H, Sugano S (1996) Autonomic nervous function in mice and voles (*Microtus arvalis*): investigation by power spectral analysis of heart rate variability. *Lab Anim* 30:359–364.

- Janssen BJA, Leenders PJA, Smits JFM (2000) Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R215–R225.
- Joaquim LF, Farah VM, Bernatova I, Fazan RJ, Grubbs R, Morris M (2004) Enhanced heart rate variability and baroreflex index after stress and cholinesterase inhibition in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H251–H257.
- Just A, Faulhaber J, Ehmke H (2000) Autonomic cardiovascular control in conscious mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R2214–R2221.
- Kay SM, Marple SL (1981) Spectrum analysis—a modern perspective. *Proc IEEE* 69:1380–1914.
- Kleiger RE, Stein PK, Bosner MS, Rottman JN: Time-Domain Measurements of Heart Rate Variability. In: Malik M, Camm AJ (eds): *Heart Rate Variability*. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 33–45.
- Klößner U, Rueckschloss U, Grossmann C, Matzat S, Schumann K, Ebel H, Müller-Werdan U, Loppnow H, Werdan K, Gekle M (2014) Inhibition of cardiac pacemaker channel hHCN2 depends on intercalation of lipopolysaccharide into channel-containing membrane microdomains. *J Physiol* 592:1199–1211.
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13:818–829.
- Kneyber MCJ, Gazendam RP, Niessen HWM, Kuiper JW, Dos Santos CC, Slutsky AS, Plötz FB (2009) Mechanical ventilation during experimental sepsis increases deposition of advanced glycation end products and myocardial inflammation. *Crit Care* 13:R87.
- Kobayashi M, Musha T (1982) 1/f fluctuation of heartbeat period. *IEEE Trans Biomed Eng* 29:456–457.
- Korach M, Sharshar T, Jarrin I, Fouillot JP, Raphaël JC, Gajdos P, Annane D (2001) Cardiac variability in critically ill adults: influence of sepsis. *Crit Care Med* 29:1380–1385.
- Kramer K, Kinter LB (2003) Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiol Genomics* 13:197–205.
- Kramer K, van Acker SA, Voss HP, Grimbergen JA, van der Vijgh WJ, Bast A (1993) Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. *J Pharmacol Toxicol Methods* 30:209–215.
- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE (1996) Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 183:949–958.
- Kuss O, Schumann B, Kluttig A, Greiser KH, Haerting J (2008) Time domain parameters can be estimated with less statistical error than frequency domain parameters in the analysis of heart rate variability. *J Electrocardiol* 41:287–291.

- La Rovere MT, Mortara A, Pinna GD, Bernardi L: Baroreflex Sensitivity and Heart Rate Variability in the Assessment of the Autonomic Status. In: Malik M, Camm AJ (eds): Heart Rate Variability. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 189–206.
- Leon LR, Walker LD, DuBose DA, Stephenson LA (2004) Biotelemetry transmitter implantation in rodents: impact on growth and circadian rhythms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R967–R974.
- Levy MN (1971) Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. *Circ Res* 29:437–445.
- Loppnow H, Flad HD, Rietschel ET, Brade H: The Active Principle of Bacterial Lipopolysaccharides (Endotoxins) for Cytokine Induction. In: Schlag G, Redl H (eds): Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1993, pp 405–416.
- Malik M, Bigger JT, Camm AJ, Kleiger RE, Malliani A, Moss AJ, Schwartz PJ (1996) Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology: Heart rate variability standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Euro Heart J* 17:354–381.
- Malliani A, Pagani M, Lombardi F, S C (1991) Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84:482–492.
- Malliani A, Lombardi F, Pagani M (1994) Power spectrum analysis of heart rate variability: a tool to explore neural regulatory mechanisms. *Heart* 71:1–2.
- Mansier P, Médigue C, Charlotte N, Vermeiren C, Coraboeuf E, Deroubai E, Ratner E, Chevalier B, Clairambault J, Carré F, Dahkli T, Bertin B, Briand P, Strosberg D, Swynghedauw B (1996) Decreased heart rate variability in transgenic mice overexpressing atrial β_1 -adrenoceptors. *Am J Physiol* 271:H1465–H1472.
- van der Meer JWM, Endres S, Lonnemann G, Cannon JG, Ikejima T, Okusawa S, Gelfand J, Dinarello CA (1988) Concentrations of immunoreactive human tumor necrosis factor alpha produced by human mononuclear cells in vitro. *J Leuk Biol* 43:216–223.
- Meng X, Ao L, Meldrum DR, Cain BS, Shames BD, Selzman CH, Banerjee A, Harken AH (1998) TNF- α and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am J Physiol* 275:R502–R508.
- Montano N, Ruscone TG, Porta A, Lombardi F, M P, Malliani A (1994) Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 90:1826–1831.
- Moodithaya S, Avadhany ST (2012) Gender differences in age-related changes in cardiac autonomic nervous function. *J Aging Res* .

- Müller-Höcker J, Haerty A: Pathomorphological Aspects of the Heart in Septic Patients. In: Schlag G, Redl H (eds): Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1993, pp 853–858.
- Müller-Werdan U, Reithmann C, Werdan K: Cytokines and the Heart: Molecular Mechanisms of Septic Cardiomyopathy. Springer New York, 1996, pp 21–52.
- Müller-Werdan U, Schumann H, Loppnow H, Fuchs R, Darmer D, Stadler J, Holtz J, Werdan K (1998) Endotoxin and tumor necrosis factor α exert a similar proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. *J Mol Cell Cardiol* 30:1027–36.
- Müller-Werdan U, Buerke M, Christoph A, Flieger RR, Heinroth K, Herklotz A, Ruß M, Schlitt A, Schmidt H, Söffker G, Werdan K (2006a) Septische Kardiomyopathie. *Intensivmed* 43:486–497.
- Müller-Werdan U, Buerke M, Ebel H, Heinroth KM, A H, Loppnow H, Ruß M, Schlegel F, Schlitt A, Schmidt HB, Söffker G, Werdan K (2006b) Septic cardiomyopathy—A not yet discovered cardiomyopathy? *Exp Clin Cardiol* 11:226–236.
- Natanson C, Fink MP, Ballantyne HK, MacVittie TJ, Conklin JJ, Parrillo JE (1986) Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *J Clin Invest* 78:259–270.
- Natanson C, Danner R, Elin R, Hosseini J, Peart K, Banks S, MacVittie T, Walker R, Parrillo J (1989) Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. *J Clin Invest* 83:243–251.
- Nishijima H, Weil MH, Shubin H, Cavanilles J (1973) Hemodynamic and metabolic studies on shock associated with gram negative bacteremia. *Medicine* 52:287–294.
- Odemuyiwa O: Heart Rate Variability and Risk Stratification after Acute Myocardial Infarction: Change in Heart Rate Variability after Acute Myocardial Infarction. In: Malik M, Camm AJ (eds): Heart Rate Variability. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 363–368.
- Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA (1988) Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 81:1162–1172.
- Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E (1986) Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* 59:178–193.
- Pagani M, Lucini D, Rimoldi R, Furlan R, Piazza S, Biancardi L: Effects of Physical and Mental Exercise on Heart Rate Variability. In: Malik M, Camm A (eds): Heart Rate Variability. Futura Publishing Company, Inc., New York, 1995, pp 245–266.
- Pancoto JA, Corrêa PB, Oliveira-Pelegrin GR, Rocha MJ (2008) Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Auton Neurosci* 138:57–63.

- Parker M, Shelhamer J, Bacharach S, Green M, Natanson C, Frederick T, Damske B, Parrillo J (1984) Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 100:483–490.
- Piepoli M, Garrard CS, Kontoyannis DA, Bernardi L (1995) Autonomic control of the heart and peripheral vessels in human septic shock. *Intensive Care Med* 21:112–119.
- Pilz G, McGinn P, Boekstegers P, Käab S, Weidenhöfer S, Werdan K (1994) Pseudomonas sepsis does not cause more severe cardiovascular dysfunction in patients than non-Pseudomonas sepsis. *Circ Shock* 42:174–182.
- Pincus SM (1994) Greater signal regularity may indicate increased system isolation. *Math Biosci* 122:161–181.
- Pomeranz B, Macaulay RJB, Caudill MA, Kutz I, Adam D, Gordon D, Kilborn KM, Barger AC, Shannon DC, Cohen RJ, Benson H (1985) Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am J Physiol* 248:H151–H153.
- Pool R (1989) Is it healthy to be chaotic? *Science* 243:604–607.
- Rechlin T (1995) Die Bedeutung von Herzfrequenzanalysen bei psychiatrischen Fragestellungen. *Fortschr Neurol Psychiatr* 63:106–120.
- Redl H, Schlag G, Bahrami S, Davies J, Waage A, Ceska M, Buurman WA, Adolf G: The Cytokine Network in Trauma and Sepsis I: TNF and IL-8. In: Schlag G, Redl H (eds): *Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure*. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1993, pp 468–490.
- Reinhardt K, Brunkhorst FM, Bone HG, Gerlach H, Gründling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Stüber F, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Weiler N, Welte T, Werdan K (2006) Diagnose und Therapie der Sepsis, S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *Clin Res Cardiol* 95:429–454.
- Reinhardt K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger P, W Kujath, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T (2010) Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin. URL <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/079-001.html>, eingesehen am 12.09.2012.
- Rimoldi O, Pierini S, Ferrari A, Cerutti S, Pagani M, Malliani M (1990) Analysis of short-term oscillations of R-R and arterial pressure in conscious dogs. *Am J Physiol* 258:H967–H976.
- Rubin LJ, Keller RS, Parker JL, Adams HR (1994) Contractile dysfunction of ventricular myocytes isolated from endotoxemic guinea pigs. *Shock* 2:113–120.

- Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, Tracey KJ, Al-Abed Y, Metz CN (2005) Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med* 201:1113–1123.
- Savci V, Ulus IH (1997) Cardiovascular effects of central choline during endotoxin shock in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:667–675.
- Saykrs BM (1973) Analysis of heart rate variability. *Ergonomics* 16:17–32.
- Schaefer S (2005) Arrhythmien und eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität bei Patienten mit Score-quantifizierter Sepsis und Score-quantifiziertem MODS—eine prospektive Studie auf einer internistischen Intensivstation. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET (1995) Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 164:383–389.
- Schmidt H, Müller-Werdan U, Hoffmann T, Francis DP, Piepoli MF, Rauchhaus M, Prondzinsky R, Loppnow H, Buerke M, Hoyer D, Werdan K (2005) Autonomic dysfunction predicts mortality in patients with multiple organ dysfunction syndrome of different age groups. *Crit Care Med* 33:1994–2002.
- Schmidt H, Saworski J, Werdan K, Müller-Werdan U (2007) Decreased beating rate variability of spontaneously contracting cardiomyocytes after co-incubation with endotoxin. *J Endotoxin Res* 13:339–342.
- Schmidt H, Hoyer D, Hennen R, Heinroth K, Rauchhaus M, Prondzinsky R, Hottenrott K, Buerke M, Müller-Werdan U, Werdan K (2008a) Autonomic dysfunction predicts both 1- and 2-month mortality in middle-aged patients with multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 36:967–970.
- Schmidt H, Müller-Werdan U, Werdan K: The Consequences of Cardiac Autonomic Dysfunction in Multiple Organ Dysfunction Syndrome. In: Vincent J (ed): *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 2008b, pp 55–64.
- Schmidt HB, Werdan K, Müller-Werdan U (2001) Autonomic dysfunction in the ICU patient. *Curr Opin Crit Care* 7:314–322.
- Schroeder EB, Whitsel EA, Evans GW, Prineas RJ, Chambless LE, Heiss G (2004) Repeatability of heart rate variability measures. *J Electrocardiol* 37:163–172.
- Seely AJE, Christou NV (2000) Multiple organ dysfunction syndrome: exploring the paradigm of complex nonlinear systems. *Crit Care Med* 28:2193–2200.
- Shoemaker WC (1971) Cardiorespiratory patterns in complicated and uncomplicated septic shock: physiologic alterations and their therapeutic implications. *Ann Surg* 174:119–125.
- Shusterman V, Usiene I, Harrigal C, Lee JS, Kubota T, Feldman AM, London B (2002) Strain-specific patterns of autonomic nervous system activity and heart failure susceptibility in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H2076–H2083.

- Silverman HJ, Penaranda R, Orens JB, Lee NH (1993) Impaired β -adrenergic receptor stimulation of cyclic adenosine monophosphate in human septic shock: association with myocardial hyporesponsiveness to catecholamines. *Crit Care Med* 21:31–39.
- Skillman JJ, Bushnell LSB, Goldman H, Silen W (1969) Respiratory failure, hypotension, sepsis, and jaundice. *Am J Surg* 117:523–530.
- Smaïl N, Descorps Declère A, Duranteau J, Vigué B, Samii K (1996) Left ventricular function after severe trauma. *Intensive Care Med* 22:439–442.
- Stauss HM (2007) Power spectral analysis in mice—what are the appropriate frequency bands? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R902–R903.
- Stein PK, Bosner MS, Kleiger RE, Conger BM (1994) Heart rate variability: a measure of cardiac autonomic tone. *Am Heart J* 127:1376–1381.
- Stieber J, Wieland K, Stöckl G, Ludwig A, Hofmann F (2006) Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors. *Mol Pharmacol* 69:1328–1337.
- Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE (1989) The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *New Eng J Med* 321:280–287.
- Sulakhe PV, Sandirasegarane L, Davis JP, Vo XT, Costain WJ, Mainra RR (1996) Alterations in inotropy, nitric oxide and cyclic GMP synthesis, protein phosphorylation and ADP-ribosylation in the endotoxin-treated rat myocardium and cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 163:305–318.
- Thireau J, Zhang B, Poisson D, Babuty D (2008) Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol* 93:83–94.
- Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP (1973) Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg* 178:117–122.
- Tracey KJ (2007) Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 117:289–296.
- Uechi M, Asai K, Osaka M, Smith A, Sato N, Wagner TE, Ishikawa Y, Hayakawa H, Vatner DE, Shannon RP, Homcy CJ, Vatner SF (1998) Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac $G_{s\alpha}$. *Circ Res* 82:416–423.
- Waage A, Redl H, Schlag G, Schade U: The Cytokine Network in Sepsis II: IL-1 and IL-6. In: Schlag G, Redl H (eds): *Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure*. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1993, pp 491–501.
- Wang H, Ma S (2008) The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med* 26:711–715.

- Wang YH, Huang TS, Lin JL, Hwang JJ, Chan HL, Lai JS, Tseng YZ (2000) Decreased autonomic nervous system activity as assessed by heart rate variability in patients with chronic tetraplegia. *Arch Phys Med Rehabil* 81:1181–1184.
- Weiergräber M, Henry M, Südkamp M, de Vivie ER, Hescheler J, Schneider T (2005) Ablation of $Ca_v2.3$ /E-type voltage-gated calcium channel results in cardiac arrhythmia and altered autonomic control within the murine cardiovascular system. *Basic Res Cardiol* 100:1–13.
- Werdan K, Schmidt H, Ebelt H, Zorn-Pauly K, Koidl B, Hoke RS, Heinroth K, Müller-Werdan U (2008) Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. *Can J Physiol Pharmacol* 87:266–274.
- Williams TD, Chambers JB, Gagnon SP, Roberts LM, Henderson RP, Overton JM (2003) Cardiovascular and metabolic responses to fasting and thermoneutrality in A^y mice. *Physiol Behav* 78:615–623.
- Witte K, Engelhardt S, Janssen BJ, Lohse M, Lemmer B (2004) Circadian and short-term regulation of blood pressure and heart rate in transgenic mice with cardiac overexpression of the β_1 -adrenoceptor. *Chronobiol Int* 21:205–216.
- Zorn-Pauly K, Pelzmann B, Lang P, Mächler H, Schmidt H, Ebelt H, Werdan K, Koidl B, Müller-Werdan U (2007) Endotoxin impairs the human pacemaker current *I_f*. *Shock* 28:655–661.
- van Zutphen L, Baumans V, Beynen A: Grundlagen der Versuchstierkunde: ein Beitrag zum tierschutzgerechten Umgang mit Versuchstieren und zur Qualität tierexperimenteller Ergebnisse. Stuttgart, 1995.

8 THESEN

1. Die prognoserelevante Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität (HRV) bei Intensivpatienten mit einem Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (MODS) kann das Resultat einer gestörten Organkommunikation durch Fehlregulation des autonomen Nervensystems sein.
2. Die im Zellkultorexperiment nachgewiesene direkte Interaktion von Lipopolysaccharid (LPS) mit dem Schrittmacherstrom I_f stellt einen möglichen Mechanismus dar, der an der gestörten Herzfrequenzregulation beteiligt sein könnte.
3. Für die Überprüfung dieser Hypothese am Mausmodell, wird ein standardisiertes Verfahren für die telemetrische Registrierung von Biopotentialen an Mäusen als tierexperimentelle Methode am Universitätsklinikum Halle (Saale) etabliert.
4. Die postoperative Stabilisierung der Mäuse nach Implantation der EKG-Transmitter und der Aufzeichnungen sind mit den Ergebnissen anderen Arbeitsgruppen vergleichbar.
5. Die für die Beurteilung des LPS-Effekts notwendige Charakterisierung der autonomen Regulation der Herzfrequenz unter Normalbedingungen ergibt einen ausgeglichenen autonomen Ruhetonus bei ICR-Wildtyp-Mäusen.
6. Der Parasympathikus hat einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der HRV.
7. Endotoxinapplikation führte unmittelbar zu einer Tachykardisierung sowie zu einer starken Reduktion sämtlicher HRV-Parameter bei ICR-Wildtyp-Mäusen.

8. Endotoxin unter pharmakologischer autonomer Blockade führt dagegen zu einer ausgeprägten Bradykardisierung, die HRV-Einschränkung ist weniger stark ausgeprägt.

9. Die in Zellkulturexperimenten nachgewiesene sympathikusbahnende Wirkung des Endotoxins und der direkt blockierende Effekt auf den I_f -Strom, erkennbar unter autonomer Blockade, können somit in vivo in funktioneller Hinsicht bestätigt werden.

ANHANG

CURRICULUM VITAE

Name	Sara Ruccius, geb. Hettrich
Geburtsdatum	08.10.1984
Geburtsort	Berlin
Email	sararuccius@gmx.de

Aktuelle Tätigkeit

Seit 01/2014	Assistenzärztin am Kardiocentrum der Klinik Rotes Kreuz, Frankfurt am Main
10/2012-12/2013	Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie und Nephrologie im Helios Klinikum Berlin-Buch

Ausbildung

04/2012–06/2012	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,5
10/2010–09/2012	Studium der Humanmedizin an der Charité Berlin
08/2007–09/2007	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,5
10/2005–09/2010	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2004–09/2005	Studium der Publizistik und Musikwissenschaft an der HU und FU Berlin
06/2004	Abitur an der Georg-Friedrich-Händel-Oberschule Berlin, Note 1,3

Stipendien

03/2008–06/2012	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
-----------------	---

Sprachen

Englisch	Gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Latein	Caesar-Lektüre

Frankfurt, den 10.08.2015

Sara Ruccius

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt, den 10.08.2015

Sara Ruccius

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Frankfurt, den 10.08.2015

Sara Ruccius

Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Henning Ebel für die vielen zielführenden Ratschläge und richtungsweisenden Denkanstöße, nicht zuletzt für die langanhaltende Geduld. Weiterhin danke ich allen Kollegen und Kommilitonen, insbesondere Prof. Dr. med. Karl Werdan, Prof. Dr. rer. nat. Harald Loppnow, Dr. rer. medic. Ying Zhang, Volker Otto und Dr. Ing. Holger Lehnich, für die gemeinsame Forschungsarbeit, außerdem dem Doktorandenkolloquium der Universitätsklinik Halle (Saale), in welchem ebenfalls anregend diskutiert werden konnte. Ich bedanke mich sehr bei meinem Mann und meinem Sohn, meinen Eltern und meiner Schwester.

Frankfurt, den 10.08.2015

Sara Ruccius